JUSTUS-LIEBIG-
UNIVERSITÄT
GIESSEN

Corticosteroidrezeptor-abhängige Expressionsregulation des sekretorischen Zelladhäsionsmoleküls Ependymin im Hinblick auf die Gedächtnisbildung bei *Teleostei*

"Corticosteroid receptor-dependent expression regulation of the secretory cell adhesion molecule ependymin in regard to memory formation in teleost fish"

INAUGURALDISSERTATION

eingereicht am Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von Diplom-Biologe
Donato Penninella
geboren am 07.10.1983 in Gießen

Gießen, 2016

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden an der
Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit der Justus-Liebig-Universität Gießen
unter der Leitung von Prof. Rupert Schmidt durchgeführt.

Erstgutachter:	Prof. Dr. Reinhard Lakes-Harlan Fachbereich 08 – Biologie und Chemie Integrative Sinnesphysiologie Justus-Liebig-Universität Gießen
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Michael U. Martin Fachbereich 08 – Biologie und Chemie Professur für Immunologie Justus-Liebig-Universität Gießen
Tag der Promotion:	01.12.2016

Widmung

an meinen Vater

“I sometimes feel, in reviewing the evidence
on the localization of the memory trace,
that the necessary conclusion is that
learning is just not possible”

(Karl Spencer Lashley)

KURZFASSUNG

Ependymine sind sekretorische Zelladhäsionsmoleküle, die den Hauptproteinanteil in der Extrazellulärflüssigkeit im Zentralnervensystem vieler Knochenfische (*Teleostei*) ausmachen. Sie sind an der Gedächtnisbildung, an der synaptischen Plastizität und an neuronalen Regenerationsprozessen beteiligt. Studien zeigten, dass die Ependymin-Expression auf mRNA-Ebene nach aversiver Verhaltenskonditionierung und anderen Lernereignissen in der inneren Schicht der Endomeninx ansteigt. Anschließend kommt es zur Sekretion und Umverteilung des Proteins im neuralen Parenchym. Demgegenüber führt eine Stressprozedur mit gleichen aber randomisierten Stimuli zu einer verminderten Ependymin-Expression. Infolgedessen wurde die Hypothese aufgestellt, dass Glucocorticoide an der Regulation der Ependymin-Expression beteiligt sind. Zur Untersuchung dieser Regulationsmechanismen wurde in der vorliegenden Arbeit ein Isolierungsverfahren etabliert, um Primärkulturen mit Ependymin-exprimierenden Zellen der Endomeninx von Goldfischen zu kultivieren. Immuncytochemisch wurden in diesen Kulturen vier unterschiedliche Ependymin-exprimierende Zelltypen nachgewiesen, die zur Fibroblasten- bzw. zur Monozyt-Makrophagen-Linie gehören. Weiterhin konnte mittels RT-qPCR und Radioimmunassay aufgezeigt werden, dass die Ependymin-Expression in den Primärkulturen im Zeitverlauf stark abnimmt, während die Ependymin-Immunreaktivität an den Zellen zunimmt. Das deutet auf eine Aggregation von Ependymin-Molekülen an meningealen Zellen, wodurch eine Feedback-Hemmung induziert wird. Um den Einfluss von Glucocorticoiden auf die Ependymin-Expression zu untersuchen, wurden die Primärkulturen mit Cortisol, Corticosteron und einem Glucocorticoidrezeptor-Antagonisten (RU486) behandelt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Cortisol die Ependymin-Expression auf mRNA-Ebene Dosis-abhängig in einem invertierten U-förmigen Verlauf reguliert. Vermutlich verursachen moderate Konzentrationen an Cortisol über eine Aktivierung des Mineralcorticoid-Rezeptors eine Transaktivierung der Ependymingene, während sehr hohe Konzentrationen durch zusätzliche Aktivierung des Glucocorticoid-Rezeptors transreprimierend wirken. Da *de novo*-synthetisierte Ependymin-Moleküle essentiell für die Gedächtniskonsolidierung sind, könnte die Cortisol-vermittelte Regulation deren Expression ein Schlüsselmechanismus zur Integration von Stressreaktionen in die Gedächtnisbildung darstellen. Die Bedeutung von Lernsituationen und neu erlernten Verhaltensweisen werden durch vorherrschende Cortisol-Konzentrationen und der dadurch regulierten Ependymin-Expression vom Nervensystem evaluiert. Dieser Mechanismus führt vorzugsweise zur Konsolidierung von erfolgreichen Vermeidungsstrategien und erlaubt dadurch eine bessere Anpassung an sich ändernden Umweltbedingungen.

ABSTRACT

Ependymins are secretory cell adhesion molecules and the predominant constituents of the cerebrospinal fluid of many teleost fish. They are involved in memory formation, synaptic plasticity and neural regeneration processes. Studies have shown that ependymin-mRNA expression in the endomeninx is induced after learning events, such as active shock-avoidance conditioning, followed by the protein's secretion and redistribution in the neural parenchyma. In contrast, stressed fish treated with the same but randomized stimuli, showed a decreased ependymin-mRNA expression. Hence, the hypothesis was proposed that glucocorticoids are involved in the regulation of ependymin expression. In this study, an isolation and cultivation procedure for ependymin-expressing endomeningeal cells was established to investigate the regulation mechanisms of the protein. Immunocytochemical analyses on these primary cultures demonstrated four ependymin-expressing cell types related to the fibroblast and monocyte-macrophage cell lines, respectively. Furthermore, RT-qPCR and radioimmunoassay studies on primary cultures showed a decreasing ependymin expression in the course of time, whereas ependymin immunoreactivity was increasing, as determined by Immunocytochemistry analyses. This indicates that ependymin molecules aggregate on meningeal cells, presumably inducing a negative feedback on their expression. Moreover, to analyse the influence of glucocorticoids on ependymin expression primary cultures were treated with cortisol, corticosterone and a glucocorticoid receptor antagonist (RU486). The results indicate that cortisol regulates ependymin-mRNA expression in a reverted U-shaped dose-dependent manner. Presumably, moderate cortisol concentrations lead to transactivation of ependymin genes by activation of the mineralocorticoid receptor, whereas the glucocorticoid receptor is additionally activated by high concentrations leading to transrepression of these genes. Since de novo synthesized ependymin molecules are essential for memory consolidation, the regulation of their expression could provide a key mechanism to integrate stress reactions into memory formation. The importance of learning situations and newly acquired behaviors are evaluated from the nervous system by preexisting cortisol concentrations and the subsequent ependymin expression. This mechanism leads preferably to the consolidation of successful avoidance strategies, thereby allowing a better adaptation to changing environmental conditions.

INHALTSVERZEICHNIS

Kurzfassung I
Abstract II
Abbildungsverzeichnis VI
Tabellenverzeichnis VII
Abkürzungsverzeichnis IX

1 EINLEITUNG 1

1.1 Lernen und Gedächtnisbildung 1

1.1.1 Zelluläre Mechanismen synaptischer Plastizität 1
1.1.2 Untersuchung der Gedächtniskonsolidierung bei *Teleostei* 3
1.1.3 Sekretion, Umverteilung und potentielle Wirkung der Ependymine 4
1.1.4 Molekulare Eigenschaften und Homologie der Ependymine 5
1.1.5 Regulation der Ependymin-Expression 7

1.2 Die allgemeine Stressreaktion 9

1.2.1 Die allgemeine Stressreaktion am Beispiel der *Mammalia* 9
1.2.2 Die Stressreaktion bei *Teleostei* im Vergleich zu *Mammalia* 10

1.3 Aufbau und Funktionen der Meningen 11

1.3.1 Allgemeiner struktureller Aufbau und Funktionen der Meningen 12
1.3.2 Strukturelle Organisation der Meningen bei *Teleostei* 13

1.4 Arbeitshypothese zum Wirkmechanismus von Ependymin 14
1.5 Zielsetzung der Arbeit 15

2 MATERIAL UND METHODEN 16

2.1 Materialien, Geräte und Software 16
2.2 Chemikalien und Lösungen 19
2.3 Verwendete Antiseren 23
2.4 Laborarbeit und Lagerung von Proben 24
2.5 Haltung und Umgang von Goldfischen 24

2.5.1 Haltung der Goldfische 24
2.5.2 Betäubung der Goldfische und Entnahme der Gehirne 25

2.6 Präparation von Ependymin-haltigen Proben aus Goldfischgehirnen 25

2.6.1 Extraktion von extrazellulären Gehirnproteinen 26
2.6.2 Extraktion von cytoplasmatischen Gehirnproteinen 26
2.6.3 Präparative SDS-PAGE 27
2.6.4 Elektrische Elution von Ependymin aus den Polyacrylamid-Gelen 27
2.6.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford 27

2.7 Erstellung und Haltung der Zellkulturen 28

2.7.1 Steriles Arbeiten mit Zellkulturen 28
2.7.2 Zellkulturmedium und Supplemente 29
2.7.3 Sterile Entnahme der Gehirne von *C. auratus* 29
2.7.4 Isolierung der meningealen Zellen 30
2.7.5 Zellzählung mit Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer 30
2.7.6 Ausplattierung meningealer Zellen 30
2.7.7 Haltungsbedingungen der Zellkulturen 31
2.7.8 Mediumwechsel bei den meningealen Primärkulturen 31

2.8 Versuche zur Regulation der Ependymin-Expression in Zellkulturen 32

2.8.1 Behandlung der Zellen mit Glucocorticoiden 32
2.8.2 Behandlung der Zellen mit Antiseren und aufgereinigten Gehirnproteinen 33

2.9 Immuncytochemie 33

2.9.1 Immunfluoreszenzmarkierung der Primärkulturen 33
2.9.2 Mikroskopie, Fotografie und Bildbearbeitung 34

2.10 Quantifizierung der mRNA-Expression mittels RT-qPCR 35

2.10.1 RNase-freies Arbeiten und Umgang mit RNA 36
2.10.2 Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellkulturen 36
2.10.3 Bestimmung der Konzentration und Reinheit der Gesamt-RNA 37
2.10.4 Bestimmung der Integrität der Gesamt-RNA 37
2.10.5 Verdau von genomischer DNA durch DNase I in RNA-Proben 38
2.10.6 Reverse Transkription der RNA in cDNA 38
2.10.7 Zielsequenzen und Primer-Design für qPCR 39
2.10.8 Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion (qPCR) 41
2.10.9 Nachweise für die Spezifität der verwendeten Primer 42
2.10.10 Erstellung einer Standardreihe zur Ermittlung der qPCR-Effizienz 43
2.10.11 Methodische Kontrollen bei der qPCR 44

2.11 Radioimmunassays 44

2.11.1 Bestimmung der Ependymin-Konzentration 45

2.11.1.1 Radioaktive [^{125}I]-Markierung von EPDγ nach Bolton und Hunter 45
2.11.1.2 Lyse der meningealen Primärkulturen mit RIPA-Puffer 46
2.11.1.3 Durchführung der Ependymin-RIAs 46
2.11.2 Bestimmung der Cortisol-Konzentration mittels Cortisol-RIA 47
2.12 Auswertung und statistische Methoden 48
2.12.1 Auswertung der RT-qPCR-Studien 48
2.12.2 Auswertung der Radioimmunassays 49
2.12.3 Auswertung der Expressionsstudien nach verschiedenen Behandlungen 50
2.12.4 Hypothesentests 50
3 ERGEBNISSE 53
3.1 Klassifizierung und immuncytochemische Untersuchung meningealer Zellen 53
3.2 Zeitverlauf der Ependymin-Expression in meningealen Primärkulturen 58
3.3 Beeinflussung der Ependymin-Expression bei meningealen Zellen 62
3.3.1 Einfluss von Glucocorticoiden auf die Ependymin-Expression 62
3.3.2 Untersuchung der Stabilität von Cortisol unter Zellkulturbedingungen 68
3.3.3 Einfluss von Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonisten auf die Ependymin-mRNA-Expression 69
3.3.4 Nachweis des Glucocorticoidrezeptors (GR) in meningealen Zellen 71
3.3.5 Einfluss Ependymin-haltiger Proben auf die Ependymin-mRNA-Expression 72
4 DISKUSSION 75
4.1 Charakterisierung der kultivierten meningealen Zellen 75
4.2 Zeitverlauf der Ependymin-Expression in meningealen Primärkulturen 79
4.3 Regulation der Ependymin-Expression durch Glucocorticoide 80
4.4 Einfluss einer Feedback-Hemmung bei der Ependymin-Expression 87
4.5 Bedeutung der Ependymin-Expression für die synaptische Plastizität 89
5 FAZIT UND AUSBLICK 95
6 LITERATURVERZEICHNIS 97
7 ANHANG 105

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Abgeleitete Molekularstruktur der Ependymin-Moleküle 6

Abb. 1.2: Ependymin-mRNA-Expression steigt nach dem Lernen und sinkt nach einer Stressprozedur 8

Abb. 1.3: Struktureller Aufbau der Endomeninx bei *Teleostei* am Beispiel von *C. auratus* 13

Abb. 2.1: Elektrophoretische Auftrennung einer Gesamt-RNA-Probe zur Untersuchung der RNA-Integrität 38

Abb. 2.2: Charakteristische Schmelztemperaturen der qPCR-Produkte 42

Abb. 2.3: Untersuchung der apparenten Nukleotidgrößen der erhaltenen qPCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese 43

Abb. 2.4: Standardreihe zur Ermittlung der qPCR-Effizienz am Beispiel von *gapdh*. 44

Abb. 2.5: Beispiel eines Elutionsprofils mit einer PD-10 Einwegsäule nach radioaktiver [^{125}I]-Markierung von EPDγ nach Bolton und Hunter 46

Abb. 2.6: Typische Standardkurven zur Ermittlung der Ependymin und Cortisol-Konzentrationen mittels RIA 50

Abb. 3.1: Morphologische Klassifizierung Ependymin-positiver Zellen in meningealen Primärkulturen 54

Abb. 3.2: Immunmarkierungen verschiedener Zelltypmarker bei Ependymin-positiven Zellen in meningealen Primärkulturen 57

Abb. 3.3: IF-Doppelmarkierungen von Zelltypmarkern zur Unterscheidung verschiedener Zelltypen 58

Abb. 3.4: Ependymin-mRNA-Expression sinkt in den meningealen Primärkulturen stark ab 59

Abb. 3.5: Ependymin-Sekretion sinkt in den meningealen Primärkulturen stark ab 60

Abb. 3.6: Anzahl Ependymin-positiver meningealer Zellen steigt mit dem Alter der Kultur stark an 61

Abb. 3.7: Ependymin-mRNA-Expression in meningealen Zellen verläuft nach Cortisol-Behandlung zweigipflig 63

Abb. 3.8: Ependymin-mRNA-Expression in meningealen Zellen nach Corticosteron-Behandlung ist vergleichbar mit dem Einfluss von Cortisol 64

Abb. 3.9: Cortisol-Entzug führt in meningealen Primärkulturen zu einer transienten Erhöhung der Ependymin-mRNA-Expression 66

Abb. 3.10: Dosis-abhängige Wirkung des Cortisol-Entzugs auf die Ependymin-mRNA-Expression nach 1 h 67

Abb. 3.11: Cortisol-Entzug führt nach 2 h zu einer erhöhten Ependymin-Sekretion ins Kulturmedium 68

Abb. 3.12: Cortisol-Konzentration ist unter Zellkulturbedingungen stabil 69

Abb. 3.13: GR-Antagonist RU486 bewirkt bei Cortisol-behandelten meningealen Zellen einen Anstieg der Ependymin-mRNA-Expression 70

Abb. 3.14: GR-Antagonist (RU486) hat bei Cortisol-unbehandelten meningealen Zellen keinen Einfluss auf die Ependymin-mRNA-Expression 71

Abb. 3.15: Glucocorticoid-Rezeptoren werden in allen Zelltypen meningealer Primärkulturen exprimiert 72

Abb. 3.16: Blockierung der Ependymin-Moleküle mittels Antiseren bewirken eine erhöhte Ependymin-Expression in meningealen Zellen 73

Abb. 3.17: Behandlung mit Ependymin-haltigem ECF-Extrakt führt bei meningealen Zellen nach 24 h zu einer erhöhten Ependymin-Expression 74

Abb. 4.1: Vergleich der Zeitverläufe der *epd1*-mRNA-Expression nach einer Stressprozedur bei Goldfischen und einer Cortisol-Zugabe bei meningealen Kulturen 81

Abb. 4.2: Vergleich der Zeitverläufe der *epd1*-mRNA-Expression nach einer aversiven Verhaltenskonditionierung bei Goldfischen und Cortisol-Entzug bei meningealen Kulturen 82

Abb. 4.3: Arbeitshypothese zu den Regulationsmechanismen und der Wirkungsweise von Ependymin (EPD) 94

Anhang Abb. 7.1: Negative Kontrollen (ohne Primärantikörper/-serum) der IF-Markierungen 105

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1: Verwendete Verbrauchswaren mit Herstellerangabe 16

Tab. 2.2: Verwendete Materialien und Hilfsmitteln mit Angabe des Herstellers oder Bezugsquelle 17

Tab. 2.3: Verwendete Geräte mit Herstellerangabe 17

Tab. 2.4: Verwendete PC-Software mit Herstellerangabe 19

Tab. 2.5: Verwendete Chemikalien mit Angabe des Reinheitsgrads und des Herstellers 19

Tab. 2.6: Verwendete Lösungen, Medien und Suspensionen mit Herstellerangabe 21

Tab. 2.7: Verwendete Reagenzien-Systeme (Kits) mit Angabe des Herstellers und des Inhalts 22

Tab. 2.8: Verwendete Primärantikörper mit Angabe von Kurznamen, Antigen, Wirt, Isotyp, Hersteller und Katalognummer 23

Tab. 2.9: Verwendete Sekundärantikörper mit Angabe von Reaktivität, Konjugat, Wirt, Isotyp, Hersteller und Katalognummer 23

Tab. 2.10: Puffer und Lösungen mit den jeweiligen Inhaltsstoffen zur Gewinnung von Ependymin aus Gehirnen von *C. auratus* 25

Tab. 2.11: Verwendete Filterblöcke des Fluoreszenzmikroskops AX70 (Olympus) für die entsprechenden Fluorophore 34

Tab. 2.12: Antikörperkonzentrationen, Inkubationsdauer, Belichtungszeiten und Tonwertspreizung 35

Tab. 2.13: Puffer und Lösungen mit Inhalts- und Konzentrationsangaben die relative mRNA-Quantifizierung 36

Tab. 2.14: Ziel-mRNAs für die RT-qPCR 39

Tab. 2.15: Verwendete Primer zur Quantifizierung der mRNA mittels qPCR 40

Tab. 2.16: Nukleotidgrößen der qPCR-Produkte. 43

Tab. 2.17: Puffer und Lösungen mit den jeweiligen Inhaltsstoffen für die Vorbereitung und Durchführung der Ependymin-RIAs. 45

Anhang Tab. 7.1: Berechnete qPCR-Effizienzen aus den Standardkurven der cDNA-Verdünnungsreihen 105

Anhang Tab. 7.2: Zeitverlauf der normalisierten mRNA-Verhältnisse von *epd1*, *epd2* und *l1-e587* in meningealen Primärkulturen von Goldfischen bis zwei Wochen nach der Präparation..... 106

Anhang Tab. 7.3: Zeitverlauf der normalisierten mRNA-Verhältnisse von *gapdh* und *actb* in meningealen Primärkulturen von Goldfischen bis zwei Wochen nach der Präparation..... 107

Anhang Tab. 7.4: Verlauf der Sekretion von Ependymin im Zellkulturmedium von meningealen Primärkulturen des Goldfisches bis 16 Tage nach der Präparation..... 107

Anhang Tab. 7.5: Zeitverlauf der normalisierten mRNA-Verhältnisse der Gene *epd1*, *epd2* und *l1-e587* nach Cortisol-Zugabe in meningealen Primärkulturen von Goldfischen..... 108

Anhang Tab. 7.6: Zeitverlauf der normalisierten mRNA-Verhältnisse der Referenzgene *gapdh* und *actb* nach Cortisol-Zugabe in meningealen Primärkulturen von Goldfischen..... 109

Anhang Tab. 7.7: Zeitverlauf der normalisierten mRNA-Verhältnisse der Gene *epd1*, *epd2* und *l1-e587* nach Corticosteron-Zugabe in meningealen Primärkulturen von Goldfischen..... 110

Anhang Tab. 7.8: Zeitverlauf der normalisierten mRNA-Verhältnisse der Referenzgene *gapdh* und *actb* nach Corticosteron-Zugabe in meningealen Primärkulturen von Goldfischen..... 111

Anhang Tab. 7.9: Zeitverlauf der normalisierten mRNA-Verhältnisse der Gene *epd1*, *epd2* und *l1-e587* nach Cortisol-Entzug in meningealen Primärkulturen von Goldfischen..... 112

Anhang Tab. 7.10: Zeitverlauf der normalisierten mRNA-Verhältnisse der Referenzgene *gapdh* und *actb* nach Cortisol-Entzug in meningealen Primärkulturen von Goldfischen..... 113

Anhang Tab. 7.11: Normalisierte mRNA-Verhältnisse 1 h nach Cortisol-Entzug in meningealen Primärkulturen von Goldfischen..... 114

Anhang Tab. 7.12: Zeitverlauf der normalisierten Ependymin-Konzentration nach Cortisol-Entzug in meningealen lysierten Zellen und Medium..... 114

Anhang Tab. 7.13: Normalisierte mRNA-Verhältnisse von *epd1*, *epd2* und *l1-e587* 1 h nach Cortisol-Entzug bzw. Zugabe eines GR-Antagonisten (RU486) in meningealen Primärkulturen von Goldfischen..... 115

Anhang Tab. 7.14: Normalisierte mRNA-Verhältnisse von *epd1*, *epd2* und *l1-e587* 1 h nach Cortisol- bzw. Zugabe eines GR-Antagonisten (RU486) in meningealen Primärkulturen von Goldfischen..... 115

Anhang Tab. 7.15: Cortisol-Konzentrationen nach bis zu sieben Tagen Inkubation im Kulturmedium..... 116

Anhang Tab. 7.16: Normalisierte mRNA-Verhältnisse 1 h nach Zugabe von Antiseren gegen EPD in meningealen Primärkulturen von Goldfischen..... 117

Anhang Tab. 7.17: Normalisierte mRNA-Verhältnisse 1 h bzw. 24 h nach Zugabe von ECF-Extrakt in meningealen Primärkulturen von Goldfischen..... 117

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
A	Radioaktivität
A. Bidest	zweifach destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
ACTB	beta-Aktin (Genbezeichnung: *actb*)
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AMPAR	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-Rezeptor
ANOVA	Varianzanalyse (engl.: *analysis of variance*)
b	Steigung
B	Bestimmtheitsmaß
BHR	Bolton-Hunter-Reagenz
Bq	Bequerel
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C. auratus	*Carassius gibelio f. auratus*
CA1	engl.: *Cornu ammonis area 1*
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CAM	Zelladhäsionsmoleküle (engl.: *cell adhesion molecule*)
CaMKII	Ca^{2+}-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl.: *complementary deoxyribonucleic acid*)
cm	Zentimeter (lat.: *centi metrum*)
Con A	Concanavalin A
CREB	cAMP response element-binding protein
CRH	engl.: *corticotropin-releasing hormone*
CS	konditionierter Stimulus
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit (engl.: *cerebrospinal fluid*)
Ct	engl.: *threshold cycle*
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid
DBD	DNA-Bindedomäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEPC-Bidest	mit DEPC behandeltes und autoklaviertes A. Bidest
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: *deoxyribonucleic acid*)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E	qPCR-Effizienz
E-LTP	*early*-LTP
ECF	Extrazellulärflüssigkeit (engl.: *extracellular fluid*)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl.: *ethylenediaminetetraacetic acid*)
EndoN	Endoneuraminidase
engl.	englisch
EPD	Ependymin (Genbezeichnungen: *epd1 und epd2*)
ER	endoplasmatischem Retikulum
ERP	engl.: *ependymin-related protein*
ES	externe Schicht
f. d. MB.	Für die Molekularbiologie
FBS	Fetales Bovines Serum (engl.: *fetal bovine serum*)

FIP	engl.: *fibrous insoluble polymer*
FN	Fibronektin
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Genbezeichnung: *gapdh*)
GFAP	Saures Gliafaserprotein (engl.: *glial fibrillary acidic protein*)
GR	Glucocorticoid-Rezeptor (Typ-II-Rezeptor)
GRE	engl.: glucocorticoide responsive elements
h	Stunde(n) (lat.: *hora*)
H_0	Nullhypothese
H_3PO_4	*ortho*-Phosphorsäure
HBSS	Hanks' gepufferte Salzlösung (engl.: *Hanks' balanced salt solution*)
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HNK-1	engl.: *human natural killer-1*
Hz	Hertz (SI-Einheit für die Frequenz)
IE	Internationale Einheit
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IMS	intermediäre Schicht
IS	innere Schicht
Kap.	Kapitel
Kat. Nr.	Katalognummer
kb	Kilo-Basenpaaren
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
L-LTP	*late*-LTP
lat.	lateinisch
Lot. Nr.	Spezifikationsnummer (engl.: *lot number*)
LTD	Langzeitdepression (engl.: *long-term depression*)
LTP	Langzeitpotenzierung (engl.: *long-term potentiation*)
m	Masse
M	Molar
M-MuLV	engl.: *moloney murine leukemia virus*
mA	Milliampere
max.	maximal
MERPs	engl.: *mammalian ependymin-related proteins*
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
$MnCl_2$	Mangan(II)-chlorid
mm	Millimeter
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
ms	Millisekunden
MR	Mineralcorticoid-Rezeptor (Typ-I-Rezeptor)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl.: *messenger ribonucleic acid*)
MW	Molekulargewicht (engl.: *molecular weight*)
µg	Microgramm
µl	Mikroliter
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
NaN_3	Natriumazid

NaOH	Natriumhydroxid
NCAM	engl.: *neural cell adhesion molecule*
nGRE	engl.: *negative glucocorticoide responsive elements*
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NRS	neutrales Kaninchenserum
NTC	engl.: *no template control*
OD	Optische Dichte
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: *phosphate buffered saline*)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*)
PKC	Proteinkinase C
PMF	Perimengealflüssigkeit (engl.: *perimeningeal fluid*)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POMC	Proopiomelanocortin
PP	Polypropylen
PSA	Polysialinsäure (engl.: *polysialic acid*)
PSD	postsynaptische Dichte (engl.: *postsynaptic density*)
PVALB	Parvalbumin
qPCR	quantitative Real-Time PCR
R	Verhältnis (engl.: *ratio*)
Rf	Retentionsfaktor
RIA	Radioimmunassay
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: *messenger ribonucleic acid*)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: *rounds per minute*)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
RT-qPCR	Reverse Transkriptase quantitative Real-Time PCR
s	Sekunden
S	spezifische Aktivität
σ_x	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler (engl.: *standard error of the mean*)
t	Zeit (engl.: *time*)
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung (engl.: *phosphate buffered saline*)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T_m	Schmelztemperatur
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Internationale Einheit (engl.: *unit*)
u. a.	unter anderem
UDG	Uracil-DNA Glycosylase
US	unkonditionierter Stimulus
UV	Ultraviolett
V	Volt
VIM	Vimentin
W	Watt
$\bar{x}$	Mittelwert
xg	x-fache Erdbeschleunigung (g-Kraft; g = 9,80665 m/s²)
z. A.	zur Analyse
ZBB	Zentrale Biotechnische BetriebseinheitZentrales Nervensystem
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von Stresshormonen auf die Gedächtnisbildung bei Knochenfischen (*Teleostei*). Der Schwerpunkt der Untersuchungen wurde dabei auf das sekretorische Glycoprotein Ependymin gelegt, das an der synaptischen Plastizität und der Konsolidierung des Gedächtnisses beteiligt ist. Dafür werden in diesem Kapitel zunächst die theoretischen Hintergründe zur Gedächtnisbildung (Kap. 1.1) und zu physiologischen Stressreaktionen (Kap. 1.2) veranschaulicht. Des Weiteren wird vertieft auf den Aufbau der Hirnhaut (Meninx; griech.: *mẽnigx*) (Kap. 1.3), dem Syntheseort von Ependymin, eingegangen. Abschließend wird die Arbeitshypothese zum Wirkmechanismus von Ependymin (Kap. 1.4) und die Zielsetzung der Arbeit (Kap. 1.5) formuliert.

1.1 Lernen und Gedächtnisbildung

Vertebraten und komplexe Invertebraten besitzen ein Nervensystem mit dem sie in der Lage sind Informationen aus ihrer Umwelt durch Lernprozesse abzuspeichern. Erworbene Informationen werden bei höheren Vertebraten in mehrstufigen, zeitlich hintereinandergeschalteten Gedächtnissystemen abgespeichert und können bei Bedarf wieder abgerufen werden (THOMPSON, 2001, S. 359–371). Sensorische Informationen aus der Umwelt werden dabei über Sinnesorgane aufgenommen und zunächst in allen Einzelheiten im sensorischen Gedächtnis (Ultrakurzzeitgedächtnis; *sensory memory*) festgehalten. Einige dieser Informationen werden anschließend ins Kurzzeitgedächtnis (*short-term memory*) übertragen, während die meisten andereren Inhalte schon nach weniger als 1 s zerfallen. Diese Gedächtnisform hat ebenfalls eine begrenzte Kapazität und hält nicht länger als 1 min. Wenn das Nervensystem die Information als wichtig einstuft, wird diese durch einen Umwandlungsprozess in ein stabileres Langzeitgedächtnis (*long-term memory*) übertragen. Diesen Vorgang bezeichnet man als Gedächtniskonsolidierung (TAKASHIMA, 2012). Dabei kommt es durch verschiedene zelluläre Mechanismen zu anatomischen und funktionellen Veränderungen an Synapsen bzw. an der neuronalen Verschaltung (Kap. 1.1.1). Die Eigenschaft von Neuronen und Synapsen, sich in Abhängigkeit von ihrer Verwendung verändern zu können, nennt man neuronale bzw. synaptische Plastizität (TAKEUCHI *ET AL.,* 2014).

1.1.1 Zelluläre Mechanismen synaptischer Plastizität

Die einfachsten und ursprünglichsten zellulären Mechanismen synaptischer Plastizität sind mit nichtassoziativen, einfachen Lernformen verbunden. Derartige Lernformen wurden intensiv vom

Nobelpreisträger Eric Kandel am Kiemenrückziehreflex bei der Meeresschnecke *Aplysia californica* untersucht, bei der es abhängig von der Reizform zu einer Habituation (Gewöhnung) oder Sensitivierung (Verstärkung) des Reflexes kommt. Das bedeutet, dass die Reflexantwort bei künftigen Reizen schwächer bzw. stärker ausfällt (KANDEL, 2011).

Ein komplexerer Mechanismus, der auch mit assoziativem Lernen in Verbindung gebracht wird, ist die von BLISS & LOMO (1973) im Hippocampus von Kaninchen entdeckte Langzeitpotenzierung (LTP; *long-term potentiation*). Unter LTP versteht man eine langanhaltende Verstärkung der synaptischen Übertragungsfähigkeit nach Reizung afferenter Fasern. Durch viele Untersuchungen an Mäusen und Ratten wurde die LTP mittlerweile auch in vielen anderen neuralen Strukturen wie beispielsweise dem Hippocampus, der Großhirnrinde und dem Cerebellum nachgewiesen (MALENKA & BEAR, 2004). Abhängig von der Hirnregion und dem Entwicklungsstadium des Organismus wurden verschiedene Formen der LTP beschrieben (YASUDA *ET AL.,* 2003).

Die am besten untersuchte Form der LTP ist NMDAR (*N*-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor)-abhängig und findet unter anderem im Hippocampus an den Synapsen der Pyramidenzellen der CA1-Region (*Cornu ammonis area 1*) mit den Schaffer-Kollateralen statt (MALENKA & BEAR, 2004). Dabei erhöht sich bei tetanischer Reizung der Schaffer-Kollaterale das exzitatorische postsynaptische Potential der Pyramidenzellen der CA1-Region langanhaltend. Die Reizung dieser Fasern führt präsynaptisch zu einer Freisetzung von Glutamat, wodurch es zu einer AMPAR (α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-Rezeptor)-vermittelten, starken Depolarisierung der postsynaptischen Membran kommt. Dies führt zur Aktivierung von NMDAR assoziierten Ca^{2+}-Kanälen und damit zu einem Ca^{2+}-Einstrom (MALENKA & BEAR, 2004). In der frühen Phase der LTP (*early*-LTP; E-LTP) kommt es dadurch zu einer transienten Aktivierung der Ca^{2+}-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) und der Proteinkinase C (PKC). Durch die Kinase-vermittelte Phosphorylierung von AMPAR wird die Aktivität dieses Kanals gesteigert und der Proteinbiosynthese-unabhängige Einbau von AMPAR in die postsynaptische Membran erhöht. Die vermehrte Anzahl und erhöhte Effizienz der AMPAR bewirken somit bei zukünftigen exzitatorischen Stimuli eine stärkere postsynaptische Antwort (MALENKA & BEAR, 2004). In der späten Phase der LTP (*late*-LTP; L-LTP) werden die Veränderungen dauerhaft, jedoch ist diese Phase im Gegensatz zur E-LTP abhängig von der Proteinbiosynthese. Das konnte beispielsweise durch Behandlung mit dem Proteinbiosynthese-Hemmer Anisomycin gezeigt werden, wodurch die Ausbildung der L-LTP verhindert wurde (SAJIKUMAR & FREY, 2003). Ohne Einsetzen der späten Phase der L-LTP halten die transienten Veränderungen an der Synapse weniger als 3 h. Bei der L-LTP werden durch intrazelluläre Signalkaskaden sowohl der Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element-binding protein*) als auch *immediate early genes* aktiviert (MALENKA & BEAR, 2004). Als weiteres Charakteristikum der L-LTP gilt, dass es zur strukturellen Vergrößerung

der Synapse, zur Neubildung und Wachstum von dendritischen Dornen und zur Zunahme der postsynaptischen Dichte (*postsynaptic density*; PSD) kommt. Diese Veränderungen sind mit einer Reorganisation und Zunahme der Mikrofilamente assoziiert. Lange Zeit war der direkte Zusammenhang zwischen LTP und Lernen noch hypothetisch, doch 2006 (WHITLOCK *ET AL.)* wurde der experimentelle Nachweis erbracht, dass räumliches Lernen bei Ratten eine LTP erzeugt. Damit kann die E-LTP als zelluläres Korrelat zum Kurzzeitgedächtnis angesehen werden, während die L-LTP dem Langzeitgedächtnis entspricht.

Ein weiterer Mechanismus synaptischer Plastizität ist die Langzeitdepression (*long term depression*; LTD) unter der man eine langanhaltende Abschwächung der synaptischen Übertragung versteht. Damit verursacht die LTD einen gegensätzlichen Effekt zur LTP. Dieser Mechanismus wurde ähnlich wie die LTP in verschiedenen Gehirnregionen (z. B. Kleinhirn, Großhirnrinde und Hippocampus) und an verschiedenen Neuronen nachgewiesen (MALENKA & BEAR, 2004). Auch zwischen den Schaffer-Kollateralen und Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus kann neben LTP auch LTD erfolgen. Die LTD tritt bei einer Stimulation der Schaffer-Kollateralen mit niedriger Frequenz (0.5-3 Hz) auf (MALENKA & BEAR, 2004). Das verursacht einen NMDAR-abhängigen Ca^{2+}-Einstrom in die postsynaptische Zelle, die zu einer Aktivierung von Ca^{2+}-abhängigen Phosphatasen und zur Dephosphorylierung und Internalisierung von AMPA-Rezeptoren führt. Ein Ca^{2+}-Einstrom kann also an der gleichen Synapse sowohl eine LTP als auch eine LTD auslösen. Entscheidend dafür, ob es zu einer Verstärkung oder Abschwächung der Synapse kommt, ist der relative Zeitpunkt zwischen prä- und postsynaptischem Potential und die Stärke des Ca^{2+}-Einstroms (BEAR, 1995). Beispielsweise resultieren repetitive, postsynaptische Potentiale 20 ms nach präsynaptischer Aktivierung in eine LTP, wohingegen bei postsynaptischen Potentialen 20 ms vor einer präsynaptischen Aktivierung eine LTD ausgelöst wird (BI & POO, 1998). Dadurch werden Impulse die im postsynaptischen Neuron ein Aktionspotential auslösen weiter verstärkt, während Impulse die kein Aktionspotential auslösen in Zukunft noch schwächer werden (BEAR, 1995).

1.1.2 Untersuchung der Gedächtniskonsolidierung bei *Teleostei*

Die *Teleostei* sind eine Teilklasse der *Actinopterygii* (Strahlenflosser) und werden wegen dem vollständig verknöcherten Skelett als Knochenfische im engeren Sinne (echte Knochenfische) bezeichnet (WILEY & JOHNSON, 2010). Als Vertreter der *Teleostei* hat sich der Goldfisch (*Carassius gibelio f. auratus*; kurz *C. auratus*; HERRE, 1990) aus der Familie der Karpfenfische (*Cyprinidae*) wegen der einfachen Haltung und den guten Lernleistungen seit den 60er Jahren als Versuchstier bei Verhaltensexperimenten etabliert. Bereits im Jahre 1965 haben AGRANOFF *ET AL.* an *C. auratus* nachgewiesen, dass die Konsolidierung des Gedächtnisses von der Proteinbiosynthese abhängt. Sie konnten zeigen, dass Pharmaka, welche die Proteinbiosynthese

hemmen, auch die Gedächtniskonsolidierung verhindern, wenn sie Versuchstieren kurz nach einem Lerntraining verabreicht werden. Um die spezifischen Proteine zu identifizieren, die an der Gedächtniskonsolidierung beteiligt sind, wurden Goldfische in einer vestibulomotorischen Aufgabe trainiert. Anschließend wurden den Lernern und Kontrolltieren unterschiedlich radioaktiv markierte Aminosäuren (^{3}H und ^{14}C) intracerebroventrikulär injiziert. Nach dieser Doppelmarkierung wurden Proteine aus dem Gehirn isoliert und das Verhältnis des Isotopeneinbaus ermittelt. Dadurch konnten zwei Gehirnproteine mit einem Molekulargewicht von 31 und 37 kDa identifiziert werden, die nach diesem Lernprozess verstärkt synthetisiert werden (SHASHOUA, 1976). Wie sich später zeigte, weisen diese Proteine auch nach anderen Lernparadigmen, wie beispielsweise nach einer aversiven Verhaltenskonditionierung in einer shuttle-box, eine erhöhte Expression auf (PIRONT & SCHMIDT, 1988). Damit übertragen diese Proteine keine semantische Bedeutung des Gelernten, sondern sind nach verschiedenen Lernparadigmen an den biochemischen Mechanismen der Gedächtnisbildung beteiligt. Da diese Proteine immuncytochemisch zuerst in der ependymalen Zone des Goldfischgehirns nachgewiesen wurden (BENOWITZ & SHASHOUA, 1977), hat man sie Ependymine genannt. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen mittels Immunogold-Markierung, konnte jedoch die Synthese auf retikulär-geformte Zellen der inneren Schicht der Endomeninx (*Leptomeninx*; weiche Hirnhaut; homolog zur *Arachnoidea mater* der Säugetiere) eingegrenzt werden (ROTHER, 1992; ROTHER *ET AL.,* 1995; SCHMIDT *ET AL.,* 1995). Diese Ergebnisse konnten durch *in situ*-Hybridisierung bestätigt werden, wobei eine besonders starke Ependymin-mRNA-Expression an meningealen Invaginationen und um endomeningeale Blutgefäße nachgewiesen wurde (ROTHER *ET AL.,* 1995).

1.1.3 Sekretion, Umverteilung und potentielle Wirkung der Ependymine

Obwohl eine Ependymin-Synthese bisher einzig in der Endomeninx nachgewiesen werden konnte (KÖNIGSTORFER *ET AL.,* 1990; ROTHER, 1992; ROTHER *ET AL.,* 1995), sind Ependymine im Gehirn von *C. auratus* sehr weit verbreitet. Vor allem im *Liquor cerebrospinalis* und der Extrazellulärflüssigkeit (*extracellular fluid*; ECF) machen Ependymine mit 15,6 % einen großen Anteil des Gesamtproteins aus (SCHMIDT & LAPP, 1987). Durch ultrastrukturelle Untersuchungen wurde Ependymin in der Extrazellulärmatrix vor allem in den perivaskulären Räumen um Blutgefäße vorgefunden, wo sie teilweise mit Kollagenfasern assoziiert vorliegen (SCHWARZ *ET AL.,* 1993). Die Ependymin-Konzentration ist im *Tectum opticum*, im *Lobus vagus* und in der *Medulla oblongata* am höchsten, während sie in Hirnregionen mit hohem Faseranteil (*Substancia alba*, *Medulla spinalis*, und *Nervus opticus*) vergleichsweise gering ist (SCHMIDT & LAPP, 1987). Immuncytochemisch konnten Ependymine in Ependymalzellen, Radialgliazellen und Neuronen nachgewiesen werden. Als Beispiel können die Typ-XIV-Neurone *Stratum periventriculare* und Typ-I-Neurone im *Stratum fibrosum et griseum superficiale* des *Tectum opticum* genannt werden

(ROTHER *ET AL.,* 1995). Das *Tectum opticum* ist bei *Teleostei* das wichtigste neuronale Integrationszentrum für visuelle Signale und man vermutet, dass die Typ-I-Neurone die relevanten Erregungen einer aversiven Vermeidungskonditionierung mit visuellen konditionierten Stimulus integrieren (SCHMIDT, 1995). Sie erhalten synaptische Erregungen über ihre langen Apikaldendriten von retinalen Ganglienzellen (visueller Input) und an ihren distalen Dornen über die Marginalfasern des *Torus longitudinalis* (vestibulärer Input). Ependymine konnten nach einer Vermeidungskonditionierung verstärkt im synaptischen Spalt und in den dendritischen Dornen dieser Neurone nachgewiesen werden (SCHMIDT, 1995). Weiterhin wurde gezeigt, dass es in der ECF 4 h nach dem Lernen zunächst zu einem leichten Absinken der Ependymin-Konzentration und nach 8 bis 14 h zu einem signifikanten Anstieg durch Sekretion *de novo*-synthetisierter Ependymine kommt (SCHMIDT, 1987).

Ausgehend von diesen Ergebnissen muss es also nach der Synthese und Sekretion der Ependymine in der Meninx zu einer Umverteilung ins neurale Gewebe kommen (SCHMIDT, 1995). Dass eine Sekretion und Umverteilung von Ependymin für die Gedächtniskonsolidierung essentiell ist, wurde durch Experimente gezeigt, in denen Ependymin-Moleküle durch intracerebroventrikuläre Injektion spezifischer Antikörper blockiert wurden. Erfolgte die Injektion vor der Vermeidungskonditionierung, konnte kein Einfluss auf das Lern- und Erinnerungsvermögen nachgewiesen werden. Wurden die Antikörper allerdings bis zu 24 h nach der Konditionierung verabreicht, konnten sich Goldfische nicht an das Erlernte erinnern (PIRONT & SCHMIDT, 1988). Zudem zeigten ROTHER *ET AL.* (1995), dass auch eine perimeningeale Injektion von *antisense*-Sonden gegen Ependymin-mRNA die Gedächtniskonsolidierung inhibiert. Da *antisense*-Sonden bereits vorhandene Ependymin-Moleküle nicht beeinflussen, konnte damit gezeigt werden, dass nur *de novo*-synthetisierte Ependymine für die Gedächtniskonsolidierung essentiell sind. Diese Versuche beeinflussten weder das Erlernen der Aufgabe, noch das Kurzzeitgedächtnis der Goldfische, sondern nur die Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses (SCHMIDT, 1995).

1.1.4 Molekulare Eigenschaften und Homologie der Ependymine

Ependymine sind sekretorische, gehirnspezifische Glycoproteine, die physiologisch mono-N- (31 kDa; γ-Ependymin) und bi-N-glycosyliert (37 kDa; β-Ependymin) vorkommen (KÖNIGSTORFER *ET AL.,* 1989b; KÖNIGSTORFER *ET AL.,* 1990). Die N-Glycosylgruppen enthalten ein HNK-1 (*human natural killer-1*)-Epitop (SHASHOUA *ET AL.,* 1986), mittels dem sie an die G2-Domäne von Laminin der extrazellulären Matrix binden können. Das HNK-1-Epitop kommt bei vielen Zelladhäsionsmolekülen (*cell adhesion molecules*; CAMs) und Komponenten der extrazellulären Matrix vor (z. B. N-CAM, L1, MAG, Axonin-1, Integrine u. a.) und spielt bei der synaptischen Plastizität eine entscheidende Rolle (SCHMIDT & SCHACHNER, 1998; PRADEL *ET AL.,* 1999). Weiterhin liegen einige Ependymin-Moleküle stark sialyliert vor (SCHMIDT, 1995), was für CAMs eine wichtige,

posttranslationale Modifikation darstellt. In mehreren Versuchen konnten weitere typische Eigenschaften von CAMs nachgewiesen werden. So konnte unter anderem mittels Streifenassays gezeigt werden, dass Ependymine eine Zell-Substrat-Adhäsion vermitteln, da auswachsende Axone explantierter retinaler Ganglienzellen einem Ependymin-Konzentrationsgradienten folgen (SCHMIDT *ET AL.,* 1991). Des Weiteren sind Ependymin-Moleküle bei der aktivitätsgesteuerten Verschärfung der rezeptiven Felder bei regenerierenden, retinotectalen Projektionen beteiligt (SCHMIDT & SHASHOUA, 1988).

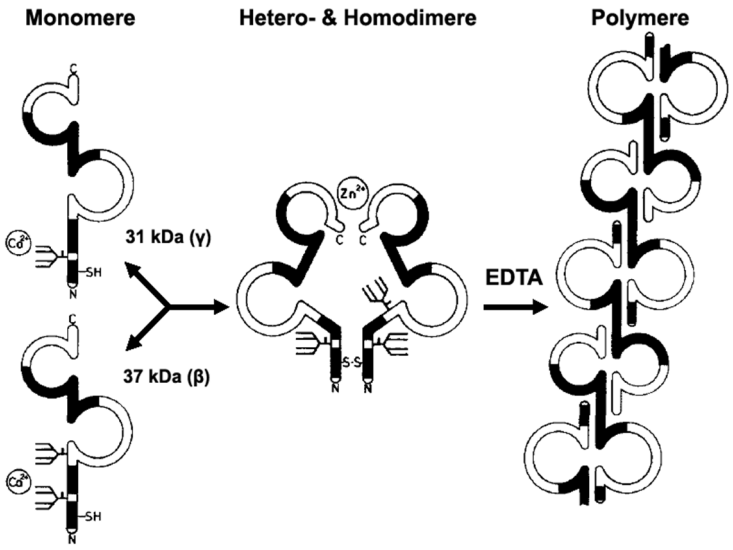


Abb. 1.1: Abgeleitete Molekularstruktur der Ependymin-Moleküle. Variable (schwarz) und konservierte (weiß) Regionen der Primärsstruktur von Ependyminen. Monomere von 31 bzw. 37 kDa (links) besitzen eine bzw. zwei N-Glycosylgruppen mit HNK1-Epitop. Ependymine binden Ca^{2+} über die Sialinsäuren der N-Glycosylgruppen. Ependymin-Untereinheiten bilden über Disulfid-Brücken Homo- und Heterodimere (mitte), die durch Zn^{2+} stabilisiert werden. Nach Entfernung der Metallkationen durch EDTA kommt es zur Polymerisierung der Ependymine (rechts) (verändert nach SCHMIDT, 1995).

Physiologisch kommen die meisten Ependymin-Moleküle (etwa 94 %) als Homo- oder Heterodimere vor (SCHMIDT & SHASHOUA, 1981). Aufgrund von Bindungsstudien mit zweiwertigen Kationen (SCHMIDT & MAKIOLA, 1991) geht man davon aus, dass Dimere durch Zn^{2+} und Monomere durch Ca^{2+} stabilisiert werden (Abb. 1.1; SCHMIDT, 1995). Ihre starke Affinität zu Ca^{2+}-Kationen erhalten Ependymin-Moleküle über gebundene Sialinsäuren (GANSS & HOFFMANN, 1993). In Abwesenheit von zweiwertigen Kationen polymerisieren Ependymine *in vitro* zu langen und unlöslichen Fasern (*fibrous insoluble polymers*; FIPs), wie beispielsweise nach Behandlung von Ependymin-haltigen Proben mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA) gezeigt wurde (Abb. 1.1; SHASHOUA, 1988). FIPs konnten auch *in vivo* mittels Dichtegradientenzentrifugation in synaptosomalen Fraktionen von Goldfisch- und Mäusegehirnen nachgewiesen werden (SHASHOUA *ET AL.,* 1990). Daraufhin stellte SHASHOUA (1991) die Hypothese auf, dass Ependymine durch Absinken der extrazellulären Ca^{2+}-Konzentration in der Mikroumgebung von aktvierten Synapsen zu FIPs polymerisieren und auf diese Weise Einfluss auf die synaptische Plastizität haben. Tatsächlich konnte nach einer tetanischen Reizung der Marginalfasern vom *Torus longitudinalis* im Bereich der Typ-I-Neurone im *Tectum opticum* ein transienter Abfall der extrazellulären Ca^{2+}-Konzentration um 10 % gemessen werden (MORRIS *ET AL.,* 1986). Da bei zusätzlicher Reizung des optischen Nervs eine stärkere Abnahme der Ca^{2+}-Konzentration

nachgewiesen wurde, könnte eine synchrone oder konvergierende neuronale Aktivität *in vivo* zu einem ausreichendem Absinken (50 %) der extrazellulären Ca^{2+}-Konzentration führen, wodurch Ependymine polymerisieren und Synapsen stabilisiert werden (SHASHOUA, 1991).

Ependymine sind bei Fischen sehr weit verbreitet (*Danio rerio, Oncorhynchus mykiss, Cyprinus carpio* und viele andere), sind aber aufgrund einer relativ schwachen Konservierung der Aminosäuresequenz eine hoch divergente Gruppe von Glycoproteinen. Man geht allerdings davon aus, dass die Proteine eine ähnliche Funktionalität besitzen, da N-Glycosylierungsstellen und Cysteine konserviert sind und sie sich in ihren Hydropathie-Profilen kaum unterscheiden (APOSTOLOPOULOS *ET AL.,* 2001). Ependymin-ähnliche Proteine (*Ependymin-related Proteins*; ERPs) sind auch bei zahlreichen anderen Vertebraten (z. B. Amphibien und Säugetiere) vertreten, allerdings sind diese im Gegensatz zu den Fisch-Ependyminen nicht Gehirn-spezifisch. Die ERPs der Säugetiere (*Mammalia)*, die entsprechend als „*mammalian ependymin-related proteins*“ (MERPs) bezeichnet werden, wurden in verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien, Gehirn, Herz, und Skelettmuskulatur nachgewiesen (APOSTOLOPOULOS *ET AL.,* 2001). ERPs wurden auch bei viel ursprünglicheren Lebewesen wie Echinodermen und Protostomiern gefunden (SUAREZ-CASTILLO & GARCIA-ARRARAS, 2007). Wie die Ependymine der Fische enthalten auch die ERPs und MERPs eine für sezernierte Proteine typische Signalsequenz (KÖNIGSTORFER *ET AL.,* 1989a; SUAREZ-CASTILLO & GARCIA-ARRARAS, 2007).

1.1.5 Regulation der Ependymin-Expression

In Kap. 1.1.3 wurde geschildert, dass Ependymine nach Lernereignissen verstärkt synthetisiert werden und eine Blockierung der Ependymin-Synthese die Gedächtniskonsolidierung unterbindet. ROTHER *ET AL.* (1995) untersuchten weiterhin nach aversiver Verhaltens-konditionierung von Goldfischen die Ependymin-mRNA-Expression im Gehirn mittels semiquantitativer in-situ-Hybridisierung. Goldfische lernen bei dieser aversiven Aufgabe ein rotes Lichtsignal (konditionierter Stimulus; CS), das kurz vor einem Stromschlag (unkonditionierter Stimulus; US) aufleuchtet, zu meiden. Beim Vergleich von konditionierten (Lernern) und nicht konditionierten Tieren (untrainierte Kontrollen) wurde festgestellt, dass die mRNA-Expression 2 h nach dem Lernen auf 250 % steigt und erst nach 8 h wieder auf Kontrollniveau fällt (Abb. 1.2-B). Tiere die vorher schon dreimal nach diesem Lernparadigma konditioniert wurden (übertrainierte Tiere) zeigten nach dem letzten Training nur eine leicht erhöhte Ependymin-mRNA-Expression im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 1.2-A). Tiere die der gleichen Anzahl von US und CS, jedoch in einer zufälligen Abfolge, ausgesetzt wurden (gestresste Tiere), wiesen nach 2 h eine deutlich verringerte Ependymin-Expression auf, die erst nach 8 h wieder Kontrollniveau erreichte (Abb. 1.2-B). Interessanterweise stieg die Ependymin-Expression kurz nach Anfang der Stressprozedur ähnlich wie bei den konditionierten Tieren zunächst leicht an, bevor sie nach 1 h

abgesunken ist. Es ist denkbar, dass der anfängliche Anstieg der Ependymin-Expression nicht lernspezifisch ist, sondern durch eine trainingsbedingte Ausschüttung von Stresshormonen vermittelt wird, da sich zu Beginn des Trainings die Stressreaktion beider Gruppen nicht unterscheiden sollte (SCHMIDT, 1995). Nach dem Erlernen des aversiven Verhaltens ist der konditionierte Lerner in der Lage den US zu meiden, wodurch die Stressreaktion anschließend milder verläuft und schneller nachlässt. Eine nachlassende Stressreaktion könnte somit zusätzlich den weiteren Anstieg der Ependymin-Expression mit absolutem Maximum nach 2 h verursachen. Im Gegensatz dazu könnte das kontinuierlich hohe Stressniveau der gestressten Kontrollen ein repressives Signal darstellen (SCHMIDT, 1995).

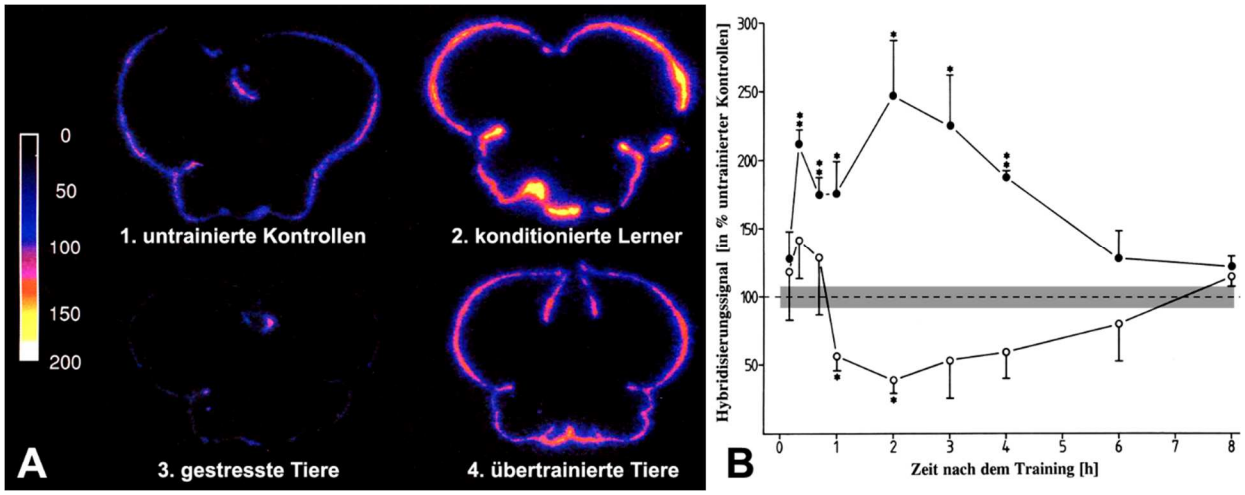


Abb. 1.2: Ependymin-mRNA-Expression steigt nach dem Lernen und sinkt nach einer Stressprozedur. Semiquantitative *in situ*-Hybridisierungen mit spezifischen Sonden gegen Ependymin-mRNA von frontalen Gehirnschnitten im Bereich des Mittelhirns nach aversiver Verhaltenskonditionierung von *C. auratus* (nach ROTHER *ET AL.,* 1995). **A.** Falschfarbendarstellung des Hybridisierungssignals 1 h nach dem jeweiligen Training bei untrainierten Kontrollen (1), konditionierten Lernern (2), gestressten Tieren mit randomisierten unkonditionierten (US) und konditionierten Stimuli (CS) (3) und übertrainierten Tieren die vorher schon dreimal in dieser Lernaufgabe konditioniert wurden (4). **B.** Zeitverlauf der Ependymin-mRNA-Expression nach einer aversiven Verhaltenskonditionierung (Hybridisierungssignal in % der untrainierten Kontrollen) bei konditionierten Lernern (●) und gestressten Tieren (**O**).

Es gibt weiterhin Hinweise, dass die Ependymin-Expression mittels Feedback-Hemmung durch bereits existierende Ependymin-Moleküle reguliert wird. So führten intracerebroventrikuläre Injektionen von anti-Ependymin Antiseren bei Goldfischen nach 3 h zu einer signifikanten Erhöhung der Ependymin-mRNA-Expression um 28 % im Vergleich zu scheinbehandelten Kontrollen (ROTHER *ET AL.,* 1995). Weiterhin kommt es nach dem Lernen zunächst zu einem leichten Absinken der Ependymin-Konzentration in der ECF, bevor sie durch die Sekretion *de novo*-synthetisierter Ependymine wieder steigt (SCHMIDT, 1987). Vermutlich führen Interaktionen von Ependymin-Molekülen an den synaptischen Membranen nach dem Lernen zu einem Absinken der extrazellulären Ependymin-Konzentration. Die dadurch verursachte reduzierte Feedback-Hemmung könnte anschließend die Ependymin-Synthese aktivieren.

1.2 Die allgemeine Stressreaktion

Aufgrund der Hypothese, dass die Ependymin-Expression durch Stresshormone reguliert wird, ist eine genaue Betrachtung der Vorgänge bei Stressreaktionen essentiell. Unter einer Stressreaktion wird eine physische Alarmreaktion bei akuten Gefahrensituationen verstanden, mit dem Ziel, den Körper auf einen Stressor einzustellen. Dabei wird Energie bereitgestellt, um eine adäquate Reaktion (z. B. Angriff, Flucht oder Erstarrung) zu ermöglichen, die sich im Laufe der Evolution als überlebenssichernd bewährt hat (KANDEL & KUPFERMANN, 2011).

1.2.1 Die allgemeine Stressreaktion am Beispiel der *Mammalia*

Bei Säugetieren (*Mammalia*) gelangen die von den Sinnesorganen aufgenommenen Informationen über Stressoren ins Telencephalon und ins limbische System, wo eine Bewertung der Situation erfolgt. Vor allem in der Amygdala wird eine Situation emotional bewertet und auf mögliche Gefahren analysiert (KANDEL & KUPFERMANN, 2011). Bei einer Beurteilung der Situation als Stresssituation, werden Informationen über die jeweiligen Efferenzen dieser Hirnregionen zum Hypothalamus geleitet und zu einer kohärenten Antwort integriert (KANDEL & KUPFERMANN, 2011). Der Hypothalamus spielt somit die Hauptrolle bei der *output*-Kontrolle des autonomen Nervensystems und aktiviert bei einer Stress-Situation den Sympathikus (Hypothalamus-Sympathikus-Nebennierenmark-Achse). Durch Innervation der Zielorgane des Sympathikus kommt es unter anderem zu einer erhöhten Herzschlagfrequenz, Erweiterung der Bronchien, und Freisetzung von Blutzucker aus der Leber. Weiterhin werden für die Situation unnötige energieverbrauchende Prozesse (z. B. Magenbewegung, Immunsystem und Geschlechtsorgane) gehemmt (KANDEL & KUPFERMANN, 2011) Durch sympathische Innervation von chromaffinen Zellen im Nebennierenmark, werden zusätzlich die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin freigesetzt. Diese aktivieren G-Protein-gekoppelte Adrenozeptoren in den jeweiligen Zielgeweben und führen damit zu einer verstärkten und erweiterten Stressreaktion (SPINDLER, 1997, S. 150–153). Infolgedessen kommt es zu einer Erhöhung der Kontraktionsfähigkeit des Herzens, Glycogenabbau in Muskeln und Leber, Mobilisierung von Fettsäuren, Erweiterung der Blutgefäße in den Skelettmuskeln, Verengung der Blutgefäße der Eingeweide und Unterdrückung der Insulinausschüttung. Dieser Zustand wird oft mit dem im Jahre 1915 von Walter Cannon geprägten Ausdruck „*fight or flight*“ beschrieben (KANDEL & KUPFERMANN, 2011). Wenn die Stresssituation bewältigt ist, kommt es dagegen zur Aktivierung des Parasympatikus, der vorwiegend gegenteilige Funktionen des Sympatikus steuert und den Körper somit in einen Ruhezustand („*rest and digest*“) bringt (KANDEL & KUPFERMANN, 2011).

Zusätzlich zur Aktivierung des Sympathikus löst der Hypothalamus eine etwas langsamere aber auch langfristiger wirkende Kaskade von Hormonen aus, die als Hypothalamus-Hypophysen-

Nebennierenrinden-Achse bezeichnet wird und die Stress-Reaktion nochmals erweitert (KANDEL & KUPFERMANN, 2011) Infolgedessen kommt es zu einer Freisetzung von CRH (*corticotropin-releasing hormone*) durch neurosekretorische Zellen des *Nucleus paraventricularis* des Hypothalamus. CRH gelangt durch das hypophysäre Portalkreislaufsystem zur Adenohypophyse, das wiederum die Freisetzung von ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) anregt (KANDEL & KUPFERMANN, 2011). ACTH wird in den basophilen Zellen der Adenohypophyse aus der Vorstufe des Proopiomelanocortins (POMC) gebildet und gelangt nach Freisetzung über den Blutkreislauf zu den Zielorganen (SPINDLER, 1997, S. 115–199). Dabei wirkt ACTH vor allem auf die *zona fasciculata* der Nebennierenrinde, in der es bei steroidogenen Zellen die Bildung von Glucocorticoiden anregt. Dort entfaltet ACTH seine Wirkung hauptsächlich als Agonist des G-Protein-gekoppelten ACTH-Rezeptors, dessen Aktivierung zur Synthese von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und zur Aktivierung der Proteinkinase A führt. Die Proteinkinase A aktiviert durch Phosphorylierung verschiedene Enzyme (*steroidogenic acute regulatory protein*, Cholesterinhydrolase und CREB) die zu einer erhöhten Freisetzung von Glucocorticoiden führen (RONE *ET AL.,* 2009). Glucocorticoide wie Cortisol besitzen in erster Linie eine katabole Wirkung auf den Stoffwechsel, indem sie vor allem die Gluconeogenese in der Leber, den Glycogen- und Proteinabbau in den Muskeln und den Fettabbau im Fettgewebe fördern. Die Freisetzung dieses Hormons wird zusätzlich durch negatives Feedback reguliert, indem Cortisol sowohl seine eigene Synthese in der Nebennierenrinde, als auch die Freisetzung von CRH und ACTH im Hypothalamus hemmt (KANDEL & KUPFERMANN, 2011).

Ihre Wirkung entfalten Glucocorticoide vor allem über den Glucocorticoid-Rezeptor (GR; Typ-II-Rezeptor), der in Abwesenheit von Glucocorticoiden im Cytosol mit einer Reihe von Hitzeschockproteinen (einschließlich Hsp90 und Hsp70) komplexiert vorliegt (UMLAND *ET AL.,* 2002). Glucocorticoide diffundieren durch die Zellmembran ins Cytosol und binden den GR, wodurch es zur Konformationsänderung und zu einer Freisetzung der Hitzeschockproteine kommt. Daraufhin dimerisieren zwei GR-Moleküle und bilden einen aktivierten Rezeptorkomplex, der in den Nucleus transloziert und dort als Transkriptionsfaktor wirkt (UMLAND *ET AL.,* 2002). Beide Untereinheiten besitzen eine zentrale DNA-Bindedomäne (DBD) mit zwei Zink-Finger-Motiven, wodurch der Rezeptorkomplex an die *glucocorticoide responsive elements* (GREs) in der 5'-Promotorregion von Glucocorticoid-responsiven Genen (z.B. CREB, NF-κB und AP-1) bindet und diese transaktiviert. Weiterhin kann der aktivierte GR-Komplex an negative GREs (nGREs) binden und zur Transrepression der jeweiligen Gene führen (UMLAND *ET AL.,* 2002).

1.2.2 Die Stressreaktion bei *Teleostei* im Vergleich zu *Mammalia*

Die Stressreaktion der *Teleostei* (echte Knochenfische) verläuft ähnlich wie bei den Säugetieren (*Mammalia*) ab. Für die emotionale Bewertung einer Stresssituation spielen verschiedene Kerne

im Pallium und Subpallium, die homolog zu denen der Amygdala der *Mammalia* sind, eine entscheidende Rolle (MAXIMINO *ET AL.,* 2013). Wie bei terrestrischen Vertebraten werden Stressreaktionen durch zwei Stressachsen vermittelt, die eine Ausschüttung von Glucocorticoiden und Katecholaminen verursachen. Interessanterweise besitzen Knochenfische kein Hypothalamus-Hypophysen-Portalsystem, jedoch peptiderge Neurone im Hypothalamus, die direkt die POMC-Zielzellen in der Hypophyse innervieren (POPESKU *ET AL.,* 2008). Weiterhin liegen die steroidogenen Zellen und die chromaffinen Zellen in interrenalen Körpern um die Kopfniere verteilt (MOMMSEN *ET AL.,* 1999). Daher werden die Stressachsen als Hypothalamus-Sympathikus-chormaffine Zellen-Achse (äquivalent zur Hypothalamus-Sympathikus-Nebennierenmark-Achse) und Hypothalamus-Hypophysen-Interrenale-Achse (äquivalent zur Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse) bezeichnet (WENDELAAR BONGA, 1997). Sowohl G-Protein-gekoppelte Adrenozeptoren als auch Corticosteroid-Rezeptoren sind in den jeweiligen Zielgeweben vorhanden, wodurch die Stresshormone der Knochenfische ähnliche intrazelluläre Signalkaskaden wie bei Säugetieren induzieren (WENDELAAR BONGA, 1997). Auch physiologisch haben die Stressachsen ähnliche Auswirkungen auf den Organismus. Sie führen zu einer Stimulation der Sauerstoffaufnahme, Mobilisierung der Energiereserven, Hemmung des Wachstums und der Reproduktion und Unterdrückung des Immunsystems (WENDELAAR BONGA, 1997). Trotzdem sind auffällige Unterschiede vorhanden, die vor allem mit ihrer aquatischen Umwelt zusammenhängen. Beispielsweise erhöhen Stressoren die Permeabilität der Oberflächenepithelien einschließlich der Kiemen für Wasser und Ionen, wodurch systemische hydrominerale Störungen verursacht werden. Weiterhin wird durch Cortisol eine glucocorticoide und mineralcorticoide Wirkung kombiniert, wobei Letztere gemeinsam mit Hormonen wie Prolactin (in Süßwasser) und Somatotropin (*growth hormone*; in Salzwasser) essentiell für die Wiederherstellung der hydromineralen Homöostase ist (WENDELAAR BONGA, 1997). Zudem spielen bei Fischen toxische Stressoren eine viel größere Rolle als bei terrestrischen Wirbeltieren. Das hängt damit zusammen, dass Fische durch ihre Kiemen und durch Trinken (nur bei Salzwasserfischen) den Schadstoffen im Wasser ausgesetzt sind. Einige Chemikalien können direkt die Stressreaktion beeinflussen, indem sie in spezifische neuroendokrine Kontrollmechanismen eingreifen. Auch der pH-Wert und die Mineralienzusammensetzung im Wasser verursachen eine signifikante Auswirkung auf die Intensität des Stressors (WENDELAAR BONGA, 1997).

1.3 Aufbau und Funktionen der Meningen

Wie in Kap. 1.1.3 beschrieben, ist Ependymin bei der Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses bei *Teleostei* involviert. Dabei wird Ependymin nicht im neuralen Gewebe, sondern in der inneren Schicht der Meninx exprimiert. Nach der Synthese kommt es jedoch zur Umverteilung im zentralen Nervensystem, in dem es entscheidend an der synaptischen Plastizität beteiligt ist. Um

den funktionalen Zusammenhang dafür herauszufinden, wird zunächst ein Überblick zum Aufbau und Funktionen der Meningen gegeben.

1.3.1 Allgemeiner struktureller Aufbau und Funktionen der Meningen

Gehirn und Rückenmark werden bei höheren Vertebraten von zwei Bindegewebshüllen umhüllt, der äußeren Ektomeninx (auch *Dura mater* oder *Pachymeninx* genannt) und der innen liegenden Endomeninx (auch *Leptomeninx* genannt) (DECIMO *ET AL.,* 2012). Die Ektomeninx ist fest mit dem Periost des Schädels verbunden und besteht aus derbem kollagenem Bindegewebe, dem nach innen eine Schicht von flachem Epithel aufgelagert ist. Die Endomeninx kann wiederum in zwei Schichten eingeteilt werden, der äußeren *Arachnoidea mater* (auch „Spinnwebenhaut“ genannt) und der unmittelbar dem Gehirn aufliegenden *Pia mater* (auch zarte „Hirnhaut“ genannt). Die *Arachnoidea mater* ist mit der *Pia mater* über arachnoidale Traberkel verbunden, die den mit Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) gefüllten Subarachnoidalraum durchspannen (DECIMO *ET AL.,* 2012). Der Subarachnoidalraum steht daher mit den Hirnventrikeln in Verbindung. Die primäre Funktion der Meningen wird üblicherweise dem Schutz des zentralen Nervensystems zugeschrieben. Der Grund dafür ist, dass die Hirnhäute durch eine feste Verankerung des zentralen Nervensystems (ZNS) an umgebende Knochen Stabilität verleihen (DECIMO *ET AL.,* 2012). Tiefergehende Untersuchungen der letzten Jahre haben jedoch gezeigt, dass diese Strukturen nicht nur protektive Membranen sind. So wurde nachgewiesen, dass Meningen ins Interstitium des *Plexus choroideus* projizieren und den perivaskulären Spaltraum (Virchow-Robin-Raum) um parenchymale Blutgefäße bilden (DECIMO *ET AL.,* 2012). Dadurch modulieren sie viele physiologische und pathologische Vorgänge des ZNS. Meningen sind außerdem essentiell für die Corticogenese und der Bildung von Gehirnstrukturen. Des Weiteren tragen sie bei adulten Tieren durch die Sekretion verschiedener trophischer Faktoren (*fibroblast growth factor 2* und *stromal cell-derived factor 1*) dazu bei, die Homöostase im zentralen Nervensystem aufrecht zu erhalten (DECIMO *ET AL.,* 2012). Fibroblasten aus den Meningen spielen zudem eine wichtige Rolle bei der akuten und subakuten Reaktion bei Verletzungen des zentralen Nervensystems. Diese infiltrieren schnell das verletzte Gewebe, proliferieren und führen gemeinsam mit Astrozyten zur Vernarbung des neuronalen Gewebes und damit zur Wiederherstellung der Homöostase im ZNS (DECIMO *ET AL.,* 2012). Weiterhin spielen Meningen bei der Immunüberwachung des ZNS eine wichtige Rolle. So haben LOUVEAU *ET AL.* (2015) sehr feine funktionale lymphatische Gefäße in der *Dura mater* nachgewiesen, die offenbar dazu fungieren die CSF aus den Hirnventrikeln abzuleiten und den Transport von T-Zellen in Richtung Gehirn ermöglichen.

1.3.2 Strukturelle Organisation der Meningen bei *Teleostei*

Die strukturelle Organisation der Meningen bei *Teleostei* (Abb. 1.3; am Beispiel von *C. auratus*) unterscheidet sich nach den ultrastrukurellen Untersuchungen von MOMOSE *ET AL.* (1988) deutlich von den Meningen der *Mammalia*. Bei *C. auratus* befindet sich unmittelbar unterhalb des Schädels eine Ectomeninx (SCHWARZ *ET AL.,* 1993) und darunter ein mit Perimengealflüssigkeit (PMF) gefüllter Raum (Perimeningealraum), sodass das Gehirn nicht durch die Meninx am Periost verankert ist. Die Gehirnoberfläche ist mit lose gestapelten Zellschichten bedeckt, die strukturell der Endomeninx der *Mammalia* entspricht. Bei *Teleostei* wird die Endomeninx in eine externe Schicht (ES), eine intermediäre Schicht (IMS) und eine innere Schicht (IS) eingeteilt. Die externe Schicht besteht aus drei bis sieben Lagen dicht gepackter abgeflachter Zellen, deren Oberflächen keine Microvilli oder Cilien besitzen. Die Zellen sind über *gap junctions* verbunden, sind reich an glattem endoplasmatischem Retikulum (ER) und beinhalten nur wenig raues ER und Golgi-Apparat. Die intermediäre Schicht ist kontinuierlich und besteht aus einer einzigen schmalen Schicht stark abgeflachter Zellen mit zahlreichen *gap junctions*, *tight junctions* und Desmosomen. Außerdem enthalten die oberen und unteren Oberflächen zahlreiche Einbuchtungen pinocytotischer Vesikel (MOMOSE *ET AL.,* 1988; SCHWARZ *ET AL.,* 1993). Die innere Schicht besteht aus einem losen, breiten Netzwerk retikulär-geformter Zellen mit ungleichmäßigen Fortsätzen die über Desmosomen und gelegentlich über *tight junctions* and *gap junctions* verbunden sind. Sie bilden ein netzartiges Geflecht aus großen, mit Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) gefüllten interzellulären Räumen. Das Cytoplasma der retikulären Zellen ist vollgepackt mit rauem ER, Golgi-Apparat, Vakuolen und multivesikulären Körpern, was charakteristisch für sekretorische Zellen ist (MOMOSE *ET AL.,* 1988; ROTHER *ET AL.,* 1995). Unterhalb der inneren meningealen Schicht befindet sich die Basallamina die aus extrazellulären Matrixproteinen (Laminin, Fibronektin, Kollagene IV, XV und XVIII und Heparansulfat-Proteoglykane) besteht. Unterhalb dieser Basallamina grenzen die Endfüße radiärer Astrozyten an, womit das neurale Gewebe beginnt (MOMOSE *ET AL.,* 1988).

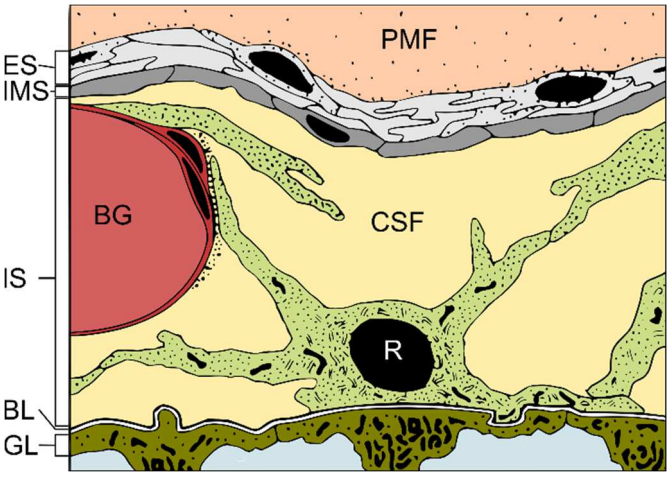


Abb. 1.3: Struktureller Aufbau der Endomeninx bei *Teleostei* am Beispiel von *C. auratus*. Die Zellen der externen (ES) und intermediären Schicht (IMS) sind epithelartig angeordnet. Die innere Schicht (IS) besteht aus retikulären Zellen (R), die mit endomeningealen Blutgefäßen (BG) und der Basallamina (BL) in engem Kontakt stehen. Unter der BL befindet sich die *Glia limitans* (GL). Schwarze Punkte repräsentieren Ependymin-Immunreaktivität. Die Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) und Perimeningealflüssigkeit (PMF) werden durch die Zellen der IMS und ES voneinander getrennt. (verändert nach ROTHER, 1992)

1.4 Arbeitshypothese zum Wirkmechanismus von Ependymin

Ein Tier reagiert bei einer akuten Gefahr mit einer physiologischen Stressreaktion. Dadurch wird das Tier zur Vermeidung des Stressors auf ein aversives Verhalten vorbereitet. Ist das Tier mit seinem Verhalten erfolgreich, klingt die Stressreaktion wieder ab, während eine nicht erfolgreiche Verhaltensweise zu einer länger andauernden und eventuell stärkeren Stressreaktion führt. Erfolgreiche Verhaltensweisen steigern demnach die biologische Fitness des Tiers und sollten, im Gegensatz zu nicht erfolgreichen Verhaltensweisen, konsolidiert werden. Da gezeigt wurde, dass Glucocorticoide einen starken Einfluss auf die Gedächtnisbildung haben (MCEWEN & SAPOLSKY, 1995; MAGGIO & SEGAL, 2010), könnten diese Verhaltensweisen vom Nervensystem über die vorherrschenden Glucocorticoid-Konzentrationen nach ihrer Relevanz evaluiert werden.

In anderen Studien wurde nachgewiesen, dass Ependymin nach einer aversiven Verhaltens-konditionierung eine erhöhte Expression aufweist, während die Expression nach einer Stressprozedur absinkt (Kap. 1.1.5). Da *de novo*-synthetisierte Ependymin-Moleküle essentiell für die Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses bei *Teleostei* sind (Kap. 1.1.2), könnte die Stress-vermittelte Regulation ihrer Expression ein Schlüsselmechanismus zur Integration von Stressreaktionen in die Gedächtnisbildung darstellen. Dabei wird angenommen, dass Glucocorticoide die Ependymin-Expression in den Zellen der inneren Schicht der Endomeninx regulieren. Aufgrund ihrer engen Assoziation mit Blutgefäßen des Gehirns haben diese Zellen eine optimale Lage, um Signalmoleküle aus dem Blut zu erhalten. Demnach könnte eine sinkende Glucocorticoid-Konzentration diesen Zellen signalisieren die Ependymin-Expression zu steigern. Anschließend kommt es zur Sekretion und Umverteilung der Ependymin-Moleküle im neuralen Parenchym, wo sie die synaptische Plastizität beeinflussen und zur Konsolidierung von vorher erlernten Verhaltensmustern beitragen. Vermutlich sind diese Moleküle an der plastischen Reorganisation von Synapsen beteiligt, die bei dem Erlernen des Verhaltensmusters aktiviert wurden (Kap. 1.1.3).

Eine Hypothese zur genauen Wirkungsweise wurde von SHASHOUA (1991) aufgestellt. Da es in der Mikroumgebung aktivierter Synapsen zu einer transienten Verminderung der extrazellulären Ca^{2+}-Konzentration kommt, vermutet Shashoua, dass Ependymin-Moleküle an diesen Synapsen polymerisieren und diese dauerhaft verstärken (Kap. 1.1.4). Zu diesem Vorgang kommt es jedoch nur, wenn das gezeigte Aversionsverhalten zum Abfall der Stresshormon-Konzentration führte, sodass aufgrund der Stresshormon-regulierten Expression genügend Ependymin-Moleküle vorhanden sind. Dadurch könnten neu erlernte Verhaltensmuster nach der biologischen Relevanz evaluiert werden, wodurch verstärkt Verhaltensweisen konsolidiert werden, die Stressreaktionen beenden und die biologische Fitness erhöhen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Durch neue Erkenntnisse der Regulationsmechanismen von Ependymin könnte die Gedächtniskonsolidierung bei *Teleostei* besser verstanden werden. Es ist bekannt, dass Stresshormone beim Lernen und der Gedächtnisbildung eingreifen, jedoch sind die dahinterstehenden Mechanismen noch wenig verstanden. Stresshormone könnten somit über die Regulation der Ependymin-Expression einen noch nicht gezeigten und wichtigen Einfluss auf die Gedächtnisbildung haben, wodurch neu erlernte Verhaltensmuster nach der biologischen Relevanz evaluiert werden.

Nach der Arbeitshypothese in Kap. 1.4 könnte Ependymin ein Schlüsselprotein zur Integration von Stressreaktionen in die Gedächtniskonsolidierung der Knochenfische darstellen. Zur Überprüfung dieser Hypothese ist die primäre Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, die Ependymin-Expression unter Einfluss von Glucocorticoiden zu untersuchen. Die regulierende Wirkung dieser Hormone, lässt sich *in vivo* nur schwer untersuchen, da jegliche Veränderung der Glucocorticoid-Konzentration zur Erhaltung der Homöostase über Feedback-Mechanismen zurückgeregelt wird (Kap. 1.2.1). Daher werden die möglichen regulativen Wirkungen dieser Hormone im Rahmen der vorliegenden Arbeit *in vitro* untersucht. Zunächst wird ein geeignetes Präparations- und Kultivierungsverfahren etabliert, um Primärkulturen mit Ependymin-exprimierenden Zellen der Endomeninx von Goldfischen (Kap. 1.1.2) herzustellen. Die kultivierten meningealen Zellen können immuncytochemisch charakterisiert und auf ihre Ependymin-Immunreaktivität untersucht werden. Die Bestimmung der Ependymin-Expression auf mRNA-Ebene erfolgt mittels reverser Transkriptase quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR), die Bestimmung auf Proteinebene mittels Radioimmunassay (RIA). Zunächst wird ein Zeitverlauf der Ependymin-Expression nach Herstellung der Kulturen erstellt, um einen geeigneten Zeitpunkt zu ermitteln, an dem die Ependymin-Expression stabil ist. Anschließend wird an diesem Zeitpunkt der Einfluss einer Glucocorticoid-Behandlung (und eventuell von Rezeptor-Antagonisten) auf die Ependymin-Expression untersucht.

Es soll außerdem untersucht werden, ob die Ependymin-Expression einer Feedback-Regulation durch vorhandene Ependymin-Moleküle unterliegt (Kap. 1.1.5). Dafür soll der Einfluss einer Zugabe von Ependymin-haltigen Proteinproben und von Antiseren gegen Ependymin zu den meningealen Kulturen auf die Ependymin-Expression analysiert werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien, Geräte und Software

Zur Durchführung der beschriebenen Experimente wurden verschiedene Verbrauchswaren (Tab. 2.1), Materialien/Hilfsmittel (Tab. 2.2), Geräte (Tab. 2.3) und PC-Software (Tab. 2.4) benötigt, die in den entsprechenden Tabellen aufgelistet sind. Die nicht aufgeführten Materialien für die Goldfischhaltung (z. B. Flockenfutter, Quarzkies usw.) wurden von Fressnapf Gießen XXL (Gießen, D) oder der zooplus AG (München, D) bezogen. Haushaltswaren und -geräte (Adhäsionsfolie, Aluminiumfolie, Mikrowellengerät, Nagellack und Zellstoff) wurden bei METRO Linden (Linden, D) erworben. Einfacher Laborbedarf (Deckgläser, Eimalkanülen Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Wägepapier) sowie nicht aufgeführte Kleingeräte (z. B. Hygro-Thermometer-Uhr, Magnetrührstäbchen, Peleusball, Wasserstrahlpumpe und Zeitschaltuhr) wurden von MAGV Laborbedarf (Rabenau, D) geliefert.

Tab. 2.1: Verwendete Verbrauchswaren mit Herstellerangabe.

Verbrauchsware	Hersteller
4-Tube/Cap Strips für Rotor-Gene 2000 (Qiagen)	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, D)
Bakterienstarter-Konzentrat	JBL GmbH & Co. KG (Neuhofen, D)
Breitbandmedikament (Goldfish GoldMed)	Tetra GmbH (Melle, D)
Culture-Slides; Falcon®, 4-Kammern/Objektträger; 1,7 cm^2/*well*	Corning, Inc. (Corning, US-NY)
Dispenser-Spitzen (Combitips® advanced); 2,5 ml, 5 ml und 12,5 ml, für Multipette	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Faltenfilter (MN 615 ¼ Ø 185 mm)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, D)
Nitril-Handschuhe (Micro-Touch Nitra-Tex)	Ansell (Yarra City, AUS)
Nitrit Test NO_2	JBL GmbH & Co. KG (Neuhofen, D)
PCR-Reaktionsgefäße (PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0,2 ml); RNase frei	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, D)
Pasteurpipetten, lange Form	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt, D)
PD-10 Einwegsäulen; zur Entsalzung (mit 8.3 ml Sephadex™ G-25 Medium)	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Pipettenspitzen (epT.I.P.S. Reloads); 0,1–10, 2–200 und 50–1000 µl; RNase frei	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Reaktionsgefäße (RNA/DNA LoBind;1,5 ml und 2 ml); RNase frei	Eppendorf AG (Hamburg, D)

Verbrauchsware	Hersteller
Reagenzröhrchen für RIA (3 ml, 75 x 10 mm, PP) mit Eindrucksstopfen	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
Spitzenfilter (steril, FP 30/0,2 CA-S)	Whatman GmbH (Dassel, D)
Ultrafiltrationsmembranen (Ultracel aus regenerierter Zellulose, 10 kDa Ausschlussgrenze, 25 mm)	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Zellkultur-Multischalen (Nunc™); 6 *well*s/Schale, Nunclon™ Delta Oberfläche, 9,6 cm^2/*well*	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml; Nunc™ konisch, steril, aus PP)	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)

Tab. 2.2: Verwendete Materialien und Hilfsmitteln mit Angabe des Herstellers oder Bezugsquelle.

Material/Hilfsmittel	Hersteller/Bezugsquelle
Aquarien (klein: 60 l; groß: 120 l)	Fressnapf Tiernahrungs GmbH (Krefeld, D)
Broeck-Homogenisator	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
Chromatographie-Säulen (Econo); 1,5 x 30 cm und 0,9 x 20 cm	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
Dispenser-Pipette (Multipette®)	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Feuchtekammer; lichtschützend	Eigene Herstellung (Gießen, D)
Leuchtstoffröhren (BIOLUX L 58W/965)	OSRAM GmbH (München, D)
Glaswaren (Flaschen, Bechergläser, Messzylinder, Erlenmeyerkolben, Trichter, Glasfilter, Glaspipetten)	Duran Group GmbH (Wertheim, D)
Mikroliterpipetten Research® plus (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Mikrolitherspritzen (Hamilton); 100 µl und 500 µl	Hamilton Bonaduz AG (Bonaduz, CH)
Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG (Sondheim vor der Rhön, D)
Pipettierhilfe (Pipetus®)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt, D)
Präparier-Besteck; Standard-Schere (14,5 cm), Wagner-Schere (gerade, 12 cm), Dumont-Pinzette (#7b), Skalpell (#3)	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, D)
Spiritusbrenner	Duran Group GmbH (Wertheim, D)
Zentrifugenröhrchen (Polycarbonat, 4 ml, 13 x 64 mm)	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, D)

Tab. 2.3: Verwendete Geräte mit Herstellerangabe.

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe (NK 50 F)	W. VOGEL GmbH & Co. KG (Gießen, D)
Außenfilter (Tetratec EX 700)	Tetra GmbH (Melle, D)
Autoklav (V-65)	Systec GmbH (Linden, D)
Bi-Destillierapparat (Bi 4 T)	Heraeus Holding GmbH (Hanau, D)
Bunsenbrenner (Fireboy eco)	INTEGRA Biosciences GmbH (Biebertal, D)

Gerät	Hersteller
Chemi-Imager (ChemiDoc™ MP System)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
Elektrophorese-Apparatur (horizontal); klein (Mini-Sub® Cell GT), groß (Sub® Cell GT)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
Elutionsapparatur (elektrophoretisch), mit Glasröhrchen	Shandon Scientific Co. (London, GB)
Feinwaage (Typ 2662)	Sartorius AG (Göttingen, D)
Flachbettschreiber (BD 12E)	Kipp & Zonen (Delft, NL)
Fluoreszenzmikroskop (AX70); Kamera (CC12); Objektiv (UPlanFL 10x/0.30 Ph1) Objektiv (UPlanApo 20x/0.70 Ph2)	Olympus Deutschland GmbH (Hamburg, D)
Fraktionssammler (2211 Superrac)	LKB Bromma (Stockholm, SWE)
Kompaktschüttler (KS 15 A); kreisend	Edmund Bühler GmbH (Tübingen, D)
Gammaprobenwechsler (Wallac Wizard 1480 3")	PerkinElmer, Inc. (Waltham, US-MA)
Gelelektrophorese-Apparatur (PROTEAN II xi Cell)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
Heiz-Thermomixer (MHR 11)	HLC BioTech (Bovenden, D)
Inkubationsbad (Typ: 1003 und Typ: 1083)	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH (Burgwedel, D)
Inversmikroskop (IMT-2); Phasenkontrast-Kondensor (ULWCD 0.30), Digitale Mono-Kamera (XM10), Kamera Adapter (U-CMAD3)	Olympus Deutschland GmbH (Hamburg, D)
Kühl-Inkubator KB 115 (E3.1) mit Programmregler, 230 V 1N ~ 50 Hz; CO_2-Regelung	Binder GmbH (Tuttlingen, D)
Leitfähigkeitsmessgerät (HI98304 DIST4)	Hanna Instruments Deutschland GmbH (Vöhringen, D)
Magnetrührer (MR Hei-Tec)	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG (Schwabach, D)
Multifuge 3 S-R	Heraeus Holding GmbH (Hanau, D)
Netzteil (PowerPac™ Universal Power Supply)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
pH-Messgerät (inoLab pH 720)	WTW GmbH (Weilheim, D)
pH-Messgerät (pH 90)	WTW GmbH (Weilheim, D)
qPCR-Cycler (Rotor-Gene 2000)	Qiagen N.V. (Venlo, NL)
Reinraumwerkbank (Laminar Air Flow Class 100)	Gelaire Pty Ltd. (Sydney, AUS)
Reinraumwerkbank (Laminar Air TL 2448)	Heraeus Holding GmbH (Hanau, D)
Peristaltikpumpe (Kat. Nr.: 10201)	LKB Bromma (Stockholm, SWE)
PCR-Cycler (PTC-100 Thermal Cycler)	MJ Research Inc. (Quebec, CAN)
Sterilisator (ED 240)	Binder GmbH (Tuttlingen, D)
Tiefkühlschrank (Herafreeze HFC 486 Basic, -86 °C)	Heraeus Holding GmbH (Hanau, D)
Tischzentrifuge (EBA 12 Typ 1000)	Hettich Holding GmbH & Co. oHG (Kirchlengern, D)
Ultrafiltrationszelle (Amicon); 5 ml	Merck KGaA (Darmstadt, D)

Gerät	Hersteller
Ultrazentrifuge (L8-55, 55,000 rpm); Festwinkelrotor (Typ: 50.3 Ti; 18 x 6,5 ml, 13 x 64 mm, 50.000 rpm)	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, D)
UV/VIS-Spektralphotometer (NanoPhotometer®)	Implen GmbH (München, D)
Zentrifuge (Minifuge RF; Rotor: BS 4402/A)	Heraeus Holding GmbH (Hanau, D)

Tab. 2.4: Verwendete PC-Software mit Herstellerangabe.

Software	Hersteller
cell^P 2.6	Olympus Deutschland GmbH (Hamburg, D)
Image Lab 5.1 (Chemi-Imager)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
Office 2010 (Word, Excel)	Microsoft Corporation (Redmond, US-WA)
Origin 9.1	OriginLab Corporation (Northampton, US-MA)
Photoshop CS3	Adobe Systems GmbH (San Jose, US-CA)
Rotor-Gene 6.1	Qiagen N.V. (Venlo, NL)
Primer-BLAST (Online-Tool)	NCBI (Bethesda, US-MD)
Prism 6	Graphpad Software, Inc. (La Jolla, US-CA)

2.2 Chemikalien und Lösungen

Die benötigten Chemikalien werden mit Angabe des Herstellers und des Reinheitsgrads in Tab. 2.5 aufgelistet. Die verwendeten Lösungen und Puffer wurden entweder aus diesen Chemikalien hergestellt (siehe Tabellen am Anfang der jeweiligen Kapitel), oder von verschiedenen Herstellern erworben (Tab. 2.6). Für die Herstellung dieser Lösungen und Puffer wurde zweifach destilliertes Wasser (A. Bidest) verwendet, das in der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit (ZBB) mittels Bi-Destillierapparat (Bi 4 T; Heraeus) hergestellt wurde. Chemikalien wurden auf Wägepapier (neoLab) mit einer Feinwaage (Typ 2662; Sartorius) abgewogen und in den beschriebenen Lösungsmitteln oder Puffern mittels Magnetrührer (MR Hei-Tec; Heidolph Instruments) und Magnetrührstäbchen gelöst. Der pH-Wert der Puffer wurde mit einem pH-Messgerät (inoLab pH 720, WTW) kontrolliert und wie angegeben eingestellt. Lösungen für Zellkulturarbeiten wurden steril eingekauft oder wie in Kap. 2.7.1 beschrieben angesetzt. Chemikalien und Lösungen für den Umgang mit RNA wurden RNase-frei (für die Molekularbiologie) gekauft oder nach der Beschreibung in Kap. 2.10.1 angesetzt. Außerdem wurden in dieser Arbeit Synthese- und Analyse-Kits verwendet, die in Tab. 2.7 aufgelistet sind.

Tab. 2.5: Verwendete Chemikalien mit Angabe des Reinheitsgrads und des Herstellers. f. d. MB. (für die Molekularbiologie), z. A. (zur Analyse).

Chemikalie	Hersteller
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO); ≥ 97 %	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
1-Brom-3-Chlorpropan; 99 %, f. d. MB.	Sigma Aldrich (St. Louis, US-MO)

Chemikalie	Hersteller
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS); ≥ 99,5 %	Sigma Aldrich (St. Louis, US-MO)
2-Propanol; ≥ 99,5 %, f. d. MB.	Sigma Aldrich (St. Louis, US-MO)
4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI); f. d. MB	AppliChem GmbH (Darmstadt, D)
Agarose (peqGOLD Universal-Agarose); 100 %	VWR International GmbH (Darmstadt, D)
Ammoniumperoxodisulfat; ≥ 99 %	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D)
Ammoniumsulfat; ≥ 99 %	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Bolton-Hunter-Reagenz (N-Succinimidyl-3-(4-hydroxy-3[$_{125}$I]-jodophenyl)-propionat); 1 mCi, mit [^{125}I]-Falle	PerkinElmer, Inc. (Waltham, US-MA)
Bovines Serumalbumin (BSA); Fraktion V	Biomol GmbH, (Hamburg, D)
Bromphenolblau; z. A.	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Chlorwasserstoff (HCl); rauchend, 37 %	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Coomassie® Brillantblau G 250; ultrarein	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Corticosteron; ≥ 98.5 %	Sigma Aldrich (St. Louis, US-MO)
Cortisol (Hydrocortison); ≥ 98 %, für Zellkultur	Sigma Aldrich (St. Louis, US-MO)
D-Glucose; für die Biochemie	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Diethylpyrocarbonat (DEPC); ≥ 97 %	AppliChem GmbH (Darmstadt, D)
Dinatriumethylendiamintetraessigsäure (Na_2H_2EDTA); f. d. MB	Sigma Aldrich (St. Louis, US-MO)
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na_2HPO_4 * 2 H_2O); ≥ 99 %	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)
Dithiothreitol (DTT); ≥ 99,5 %	AppliChem GmbH (Darmstadt, D)
Essigsäure (Eisessig);100 %	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Ethanol (denaturiert); mit 1 % Methylethylketon	VWR International GmbH (Darmstadt, D)
Ethanol; ≥ 99,7 %, f. d. MB	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D)
L-Glutathion (reduziert); ≥ 98 %	Sigma Aldrich (St. Louis, US-MO)
Glycin; ≥ 99,5 %	VWR International GmbH (Darmstadt, D)
Glycerin (wasserfrei); ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Kaliumchlorid (KCl); ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4); ≥ 99,5 %	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Methanol; ≥ 99.8 %	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Methyl-α-D-Mannopyranosid; ≥ 99,5 %	Sigma Aldrich (St. Louis, US-MO)
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat ($MnCl_2$ * 4 H_2O); ≥ 99 %	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($MgCl_2$ * 6 H_2O); f. d. MB	AppliChem GmbH (Darmstadt, D)
mono-Natriumcitrat ($C_6H_7NaO_7$); ≥ 99 %	AppliChem GmbH (Darmstadt, D)
Natriumchlorid (NaCl); ≥ 99,7 %	VWR International GmbH (Darmstadt, D)

Chemikalie	Hersteller
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH_2PO_4 * H_2O); ≥ 99 %	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Natriumdodecylsulfat (SDS); ≥ 90 %	Sigma Aldrich (St. Louis, US-MO)
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$); ≥ 99 %	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Natriumhydroxid (NaOH); ≥ 99 %	Sigma Aldrich (St. Louis, US-MO)
ortho-Phosphorsäure (H_3PO_4); 85 %	Merck KGaA (Darmstadt, D)
RU-486 (Mifepriston); ≥ 98 %	Sigma Aldrich (St. Louis, US-MO)
Tetramethylethylendiamin (TEMED); ≥ 99 %	AppliChem GmbH (Darmstadt, D)
Tosyl-Phenylalanyl-Chloromethylketon (TPCK) ≥ 97 %	Sigma Aldrich (St. Louis, US-MO)
Tricain-Methansulfonat (MS222)	Molekula GmbH (München, D)
TRIS-Base; ≥ 99,8 %, f. d. MB	Fischer Chemical (Hongkong, CHN)
Triton X-100; f. d. MB	AppliChem GmbH (Darmstadt, D)

Tab. 2.6: Verwendete Lösungen, Medien und Suspensionen mit Herstellerangabe. f. d. MB. (für die Molekularbiologie), Kat. Nr. (Katalognummer), Lot. Nr. (Spezifikationsnummer).

Lösung/Medium	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 %; 37,5:1); f. d. MB	AppliChem GmbH (Darmstadt, D)
Antibiotika-Antimykotika (100x; Gibco®); 10,000 IE/ml Penicillin, 10,000 µg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Fungizone® Antimykoticum; Kat. Nr.: 15240	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)
Kollagen I-Lösung; aus Rattenschwänzen, 3 mg/ml	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)
Concanavalin A-Sepharose® 4B	Sigma Aldrich (St. Louis, US-MO)
DNA-Ladepuffer (6x DNA Loading Dye)	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)
DNA-Leiter (GeneRuler Low Range DNA Ladder)	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)
Ethidiumbromid; 1 % (w/v) Lösung in H_2O	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
GlutaMAX™ Supplement (Gibco®); Kat. Nr.: 35050	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)
Glycogen (20 mg/ml); f. d. MB	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)
Fetales Bovines Serum (Gibco®); aus Südamerika, Virus und Mycoplasma getestet; Kat. Nr.: 10270; Lot. Nr.: 41F2092K	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)
Formaldehyd-Lösung (37 % (w/v), in H_2O); enthält 10-15 % Methanol	Sigma Aldrich (St. Louis, US-MO)
HBSS(-); ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}, mit Phenolrot	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)
HBSS(+); mit Ca^{2+}, Mg^{2+} und Phenolrot	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)
HEPES-Lösung (1 M, pH 7,0-7,6); Kat. Nr.: H0887	Sigma Aldrich (St. Louis, US-MO)
Natriumacetat-Lösung (3 M, pH 5,2); f. d. MB	AppliChem GmbH (Darmstadt, D)

Lösung/Medium	Hersteller
Medium-199; mit Hanks Salzen und Natriumhydrogen-carbonat, ohne L-Glutamin, flüssig, sterilfiltriert. Kat. Nr.: M7653	Sigma Aldrich (St. Louis, US-MO)
Molekulargewichtsmarker (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder); 10 bis 250 kDa	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)
PBS (10x); pH 7,4, Gibco	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)
RNase-Inhibitor (Ribolock; 40 U/µl)	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)
RNA-Ladepuffer (2x RNA Loading Dye)	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)
RNA-Leiter (RiboRuler High Range RNA Ladder)	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)
SYBR® Select Master Mix	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)
TRIzol® Reagenz	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)
Trypanblau-Lösung (0,4 %; FLUKA); in 0,81 % (w/v) NaCl, 0,06 % (w/v) K_2HPO_4	Sigma Aldrich (St. Louis, US-MO)
Trypsin-EDTA Lösung; 0,25 %, mit Phenolrot	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)

Tab. 2.7: Verwendete Reagenzien-Systeme (Kits) mit Angabe des Herstellers und des Inhalts. %-Angaben in w/v, pAK (polyklonaler Antikörper), Kat. Nr. (Katalognummer).

Kit	Hersteller
Cortisol-RIA-Kit; Cortisol [^{125}I] Assay-System; Kat. Nr.: DE28100 - Antiserum; anti-Cortisol IgG (pAK aus Kaninchen) in Puffer mit 0,1 % NaN_3 - Reagenzröhrchen (12 x 75 mm); beschichtet (Bindung von anti-Cortisol IgG) - Cortisol-Standards (0, 40, 100, 250, 650, 1600 nM) in Serum mit 0,1 % NaN_3 - Kontroll-Serum (externer Standard); lyophilisiertes Serum mit 0,1 % NaN_3 - Tracer; [^{125}I]-Cortisol (< 260 kBq/55 ml) in Puffer mit 0,1 % NaN_3	Demeditec Diagnostics GmbH (Kiel-Wellsee, D)
DNase I-Kit, RNase-frei; Kat. Nr.: EN0521 - DNase I (1 U/µl) - 10x DNase I-Puffer mit 25 mM $MgCl_2$ - 50 mM EDTA	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit; Kat. Nr.: K1622 - Oligo(dT)$_{18}$-Primer (100 µM) - Random Hexamere (100 µM) - RNase-Inhibitor (20 U/µl) - 5x Reaktionspuffer - dNTP Mix (je 10 mM) - Reverse Transkriptase (200 U/µl)	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)
RIPA Lysepuffer-System; Kat. Nr.: sc-24948 - 1x Lysepuffer (pH 7.4) - 200 mM PMSF in Dimethylsulfoxid - Proteaseinhibitor-Cocktail in Dimethylsulfoxid - 100 mM Natriumvanadat-Lösung in Wasser	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, US-TX)

2.3 Verwendete Antiseren

Für die Immuncytochemie und die Ependymin-Radioimmunassays wurden verschiedene Primärantikörper verwendet, die in Tab. 2.8 aufgelistet sind. Für eine einfache und einheitliche Nomenklatur wurden den Primärantikörpern Kurznamen gegeben (α-EPD, α-EPDβ, α-FN1, α-GFAP, α-GR, α-FN15, α-PVALB und α-VIM). Außerdem sind das verwendete Antigen für die Immunisierung, Wirt, Isotyp, Hersteller und Katalognummer (bzw. interne Bezeichnung in der Arbeitsgruppe) angegeben. Die verwendeten Sekundärantikörper für Immuncytochemie und Radioimmunassay werden in Tab. 2.9 aufgelistet. Es wird Reaktivität, Wirt, Isotyp, Hersteller und Katalognummer angegeben.

Tab. 2.8: Verwendete Primärantikörper mit Angabe von Kurznamen, Antigen, Wirt, Isotyp, Hersteller und Katalognummer. Kat. Nr. (Katalognummer), Int. Bez. (Interne Bezeichnung).

Kurz-name	Antigen	Wirt/Isotyp	Hersteller	Kat. Nr./ Int. Bez.
α-EPD	deglycosyliertes Ependymin, vom 15.11.1988	Kaninchen/ polyklonal	Rupert Schmidt/ZBB (Gießen, D)	Perseus
α-EPDβ	bi-N-glycosyliertes Ependymin (EPDβ); vom 21.09.1981		Rupert Schmidt/ZBB (Gießen, D)	Beteigeuze
α-FN1	Fibronektin; aus humanem Plasma		Sigma Aldrich (St. Louis, US-MO)	F3648
α-GFAP	Saures Gliafaserprotein (eng.: *glial fibrillary acid protein*; aus bovinem Rückemark		Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)	18-0063
α-GR	Glucocorticoidrezeptor, N-Terminus von GRα aus Maus		Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, US-TX)	sc-1004
α-FN15	Fibronektin; aus humanem Aszites, Klon: FN-15	Maus/IgG1 (monoclonal)	Sigma Aldrich (St. Louis, US-MO)	F7387
α-PVALB	Parvalbumin, aus Karpfenmuskel, Klon: PA-235		Sigma Aldrich (St. Louis, US-MO)	P-3171
α-VIM	Vimentin; Extrakt aus Kalbslinsen, Klon: RV202		Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)	OMA1-06001

Tab. 2.9: Verwendete Sekundärantikörper mit Angabe von Reaktivität, Konjugat, Wirt, Isotyp, Hersteller und Katalognummer. Kat. Nr. (Katalognummer).

Reaktivität	Konjugat/Verwendung	Wirt/Isotyp	Hersteller	Kat. Nr.
Kaninchen IgG	Alexa Fluor® 488 (grün)/ Immunfluoreszenz	Ziege/ F(ab')2-Fragment	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)	A-11070
Maus IgG1	Alexa Fluor® 568 (rot)/ Immunfluoreszenz	Ziege/ IgG	Thermo Fisher Sci. Inc. (Waltham, US-MA)	A-21124
Kaninchen IgG	ohne/ Radioimmunassay	Ziege/polyklonal	Sigma Aldrich (St. Louis, US-MO)	R0881

2.4 Laborarbeit und Lagerung von Proben

Um Protein- und RNA-Proben vor Degradation zu schützen, wurde stets auf *crushed ice* gearbeitet. Besonders empfindliche Proben (z. B. Antikörper und Enzyme) wurden bei +4 °C langsam aufgetaut. Die Lagerung der Proben erfolgte stets bei -80 °C (Herafreeze HFC 486 Basic; Heraeus). Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden 30 min bei 121 °C autoklaviert (V-65; Systec). Puffer und Lösungen mit Volumen von 0,5–1000 µl wurden mit Mikroliterpipetten (10 µl, 100 µl und 1000 µl; Research® plus; Eppendorf), Volumen von 1–20 ml wurden mit Glaspipetten und einer Pipettierhilfe (Pipetus®; Hirschmann Laborgeräte oder Peleusball; MAGV) überführt. Volumen ab 20 ml wurden mit entsprechenden Messzylindern (Duran Group) abgemessen. In Experimenten, bei denen die exakte Übertragung von festgelegten Volumina einer Lösung in mehrere Gefäße erforderlich war (RIAs, Bradford-Test), wurde eine Dispenser-Pipette (Multipette; Eppendorf) mit passenden Dispenser-Spitzen (2,5 ml, 5 ml und 12,5 ml; Combitips advanced) verwendet. Ultrazentrifugationen wurden in Zentrifugenröhrchen (Polycarbonat, 4 ml, 13 x 64 mm; Beckman Coulter) in einer Ultrazentrifuge (L8-55; Festwinkelrotor: 50.3 Ti; Beckman Coulter) durchgeführt.

2.5 Haltung und Umgang von Goldfischen

2.5.1 Haltung der Goldfische

Für die Gewebeentnahme (Erlaubnis der Haltung von Wirbeltieren zu Zwecken des § 11 Abs. 1 Nr. 1 und 2 Tierschutzgesetz) wurden 6–9 cm große, adulte kurzschwänzige Goldfische (*C. auratus*) aus der Familie der Karpfenfische (*Cyprinidae*) verwendet, die vom Großhandel AQUARIUM DIETZENBACH GmbH in Dietzenbach bezogen wurden. Diese wurden in Gruppen von max. 15 bzw. 30 Tieren in 60 bzw. 120 l Aquarien (Besatzungsdichte ≤ vier Goldfische/l) bei 19 °C (klimatisiert) gehalten. Um die Aquarien für die Besetzung mit den Goldfischen vorzubereiten, wurden die Böden mit Quarzkies ausgelegt und mit Wasseraufbereiter (Biotopol; JBL) behandeltes Leitungswasser (0,25 ml/l) befüllt. Danach wurde je nach Größe des Aquariums 8 bzw. 16 ml Bakterienstarter-Konzentrat (Denitrol; JBL) und ein wenig Flockenfutter hinzugegeben. Das Aquarienwasser wurde ab diesem Zeitpunkt permanent durch einen Außenfilter (EX 700; Tetratec) umgewälzt (700 l/h) und gereinigt. Die Aquarien wurden daraufhin täglich bis zum 10. Tag mit 2 bzw. 4 ml Bakterienstarter-Konzentrat weiterbehandelt und vier Wochen nach der Einrichtung mit den Goldfischen besetzt. Zur Prophylaxe gegen die häufigsten Fischkrankheiten wurden die Goldfische einmalig mit 0,25 ml/l Breitbandmedikament (Goldfish GoldMed) behandelt. Alle 30 Tage (kleine Aquarien) bzw. drei Monate (große Aquarien) wurde die Hälfte des Aquarienwassers durch frisches Leitungswasser ersetzt und alle drei Monate die Außenfilter gereinigt. Zur Überwachung der artgerechten Haltung wurden täglich Luftfeuchtigkeit

und Temperatur (Hygro-Thermometer-Uhr; MAGV) im Aquarienraum dokumentiert. Zusätzlich wurden einmal wöchentlich pH-Wert (pH-Messgerät: pH 90; WTW), Nitrit-Konzentration (Nitrit Test NO_2; JBL) und Leitfähigkeit (Leitfähigkeitsmessgerät: HI98304 DIST4; Hanna Instruments) des Aquariumswassers gemessen. Wenn diese Werte nach Herstelleranleitung nicht im Toleranzbereich lagen, wurde ein Wasserwechsel vorgezogen und nach Bedarf eine erneute Behandlung mit Bakterienstarter-Konzentrat vorgenommen. Es wurde ein 12 h Tag-/12 h Nacht-Rhythmus mittels Steuerung mit einer Zeitschaltuhr (7.30 bis 19.30 Uhr; BIOLUX L 58W/965; OSRAM) eingehalten und täglich zwischen 8 und 10 Uhr mit Flockenfutter gefüttert.

2.5.2 Betäubung der Goldfische und Entnahme der Gehirne

Die Tötung der Goldfische erfolgte nach § 4 Abs. 3 Tierschutzgesetz (JLU-Nummer: 535_M). Zur Entnahme der Gehirne wurden die Goldfische mindestens 10 min in 250 ml eiskalter MS222-Lösung (0,015 % (w/v) Tricain-Methansulfonat, pH 7,4 mit NaOH eingestellt, in Aquarienwasser) betäubt. Nach erfolgreicher Betäubung (Einnahme einer Seitenlage und Augen starr nach oben gerichtet) wurde der Goldfisch aus der Betäubungslösung entnommen und mit einem Nackenschnitt hinter den Kiemen mit einer Standard-Schere (14,5 cm; Fine Science Tools) dekapitiert. Der Kopf wurde daraufhin mit Zellstoff gefasst und die Schädeldecke durch zwei dorsolaterale Schnitte (Wagner-Schere, gerade, 12 cm; Fine Science Tools) geöffnet und nach vorne aufgeklappt. Mit einer Dumont-Pinzette (#7b; Fine Science Tools) wurden die Hirnnerven an ihren Austrittstellen aus der Schädelbasis durchtrennt. Das Gehirn konnte daraufhin am Hirnstamm gepackt und vorsichtig aus der Schädelhöhle entnommen werden.

2.6 Präparation von Ependymin-haltigen Proben aus Goldfischgehirnen

Für die Bestimmung der Ependymin-Konzentration mittels Radioimmunassay (Kap. 2.11.1) war es notwendig möglichst reine Ependymin-Proben zu gewinnen, die einerseits als Standard (Kap. 2.11.1.3) und andererseits als Tracer (Kap. 2.11.1.1) verwendet wurden. Die verwendeten Puffer und Lösungen für die Extraktion sind in Tab. 2.10 angegeben.

Tab. 2.10: Puffer und Lösungen mit den jeweiligen Inhaltsstoffen zur Gewinnung von Ependymin aus Gehirnen von *C. auratus.*

Lösung	Inhaltsstoffe
Bradford-Lösung	0,01 % (w/v) Coomassie Brillant Blau G 250, 4,75 % (v/v) Ethanol, 8,5 % (v/v) *ortho*-Phosphorsäure, in A. Bidest (Aufbewahrung in abgedunkelter Flasche bei 4 °C; vor der Benutzung mit MN 615 ¼ Ø 185 mm Faltenfilter filtriert)
BSA-Standardlösung	0,1 % (w/v) BSA, in A. Bidest
Coomassie-Färbelösung	0,08 % (w/v) Coomassie Brillant Blau G 250, 1,6 % (v/v) *ortho*-Phosphorsäure, 8 % (w/v) Ammoniumsulfat, 20 % (v/v) Methanol, in A. Bidest

Lösung	Inhaltsstoffe
Laemmli-Puffer (5x)	156,25 mM TRIS-HCl (pH 6,8), 5 % (w/v) SDS, 0,5 M DTT, 50 % (v/v) Glycerin, 0,001 % (w/v) Bromphenolblau, in A. Bidest
Laufpuffer	25 mM TRIS-Base, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, in A. Bidest, pH 8,3
Natrium-Phosphatpuffer	0,1 M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 (pH 8,5), in A. Bidest
Sammelgel-Lösung	6 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 0,375 M TRIS-HCl (pH 6,8), 0,1 % (w/v) SDS, 0,05 % (v/v) TEMED, 0,06 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat, in A. Bidest
TBS (*tris buffered saline*)	50 mM TRIS-HCl (pH 7,4), 86 mM NaCl, 2,5 mM $CaCl_2$, 2,5 mM $MgCl_2$, 2 mM $MnCl_2$, 1 mM L-Glutathion, 0,3 mM TPCK, in A. Bidest (vor Benutzung filtriert)
Trenngel-Lösung	12 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 0,375 M TRIS-HCl (pH 8,8), 0,1 % (w/v) SDS, 0,05 % (v/v) TEMED, 0,06 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat, in A. Bidest

2.6.1 Extraktion von extrazellulären Gehirnproteinen

Zur Extraktion von extrazellulären (ECF; *extracellular fluid*), aber auch von cytoplasmatischen (Cyt) Gehirnproteinen (Kap. 2.6.2) wurden 20 Goldfischgehirne nach Kap. 2.5.2 frisch präpariert und in 10 ml eisgekühlten TBS (*tris buffered saline*) überführt. Die Gehirne inkubierten 30 min auf *crushed ice*, wobei sie in Abständen von 5 min für 5 s vorsichtig geschüttelt wurden. Anschließend wurde der Überstand entnommen und 2 h bei 100.000 xg (40.000 rpm) und 4 °C ultrazentrifugiert. Der Überstand, der den ECF-Extrakt enthält, wurde für die Expressionsstudien in Kap. 2.8.2 weiterverwendet.

2.6.2 Extraktion von cytoplasmatischen Gehirnproteinen

Die von der ECF befreiten Gehirne wurden für die Extraktion der Proteine aus dem Cytoplasma weiterverwendet. Sie wurden in 10 ml TBS mit einem Broeck-Homogenisator (B. Braun) homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend 2 h bei 100.000 xg und 4 °C ultrazentrifugiert. Um Glycoproteine mit α-glycosidischer Bindung (u. a. auch Ependymin) anzureichern, wurde der Überstand, der die gelösten Cyt-Proteine enthält, einer Affinitätschromatografie mit Concanavalin A-Sepharose® 4B (Con A-Sepharose; Sigma Aldrich) als Säulenmaterial unterzogen. Dafür wurde das Cyt-Isolat zu 3 g Con A-Sepharose (vorher dreimal mit TBS gewaschen) zugesetzt und 1 h bei Raumtemperatur auf einem Kompaktschüttler (KS 15 A; Edmund Bühler GmbH) inkubiert. Die Suspension wurde anschließend viermal mit 50 ml TBS über einen Glasfilter gewaschen und in eine 1,5 x 30 cm Chromatographie-Säule (Econo; Bio-Rad) überführt. Nach dem Absetzen der Con A-Sepharose, wurde die Chromatographie-Säule zur Entfernung der ungebundenen Proteine so lange mit TBS gespült, bis die OD_{280} (OD; optische Dichte) des Eluats den Referenzwert von TBS erreichte (Fraktionssammler: 2211 Superrac; LKB Bromma, Peristaltikpumpe: 10201; LKB Bromma und

Flachbettschreiber: BD 12E; Kipp & Zonen). Durch Austausch des Puffers gegen Eluierungslösung (0,3 M Methyl-α-D-Mannopyranosid, in TBS) wurden die an Con A gebundenen Proteine eluiert und in Reagenzgläsern (Fraktionen von 85 Tropfen) aufgefangen. Die Protein-haltigen Fraktionen (erhöhte OD_{280}) wurden anschließend mit 0,2 Bar Druck in einer 5 ml Ultrafiltrationszelle (Amicon; Merck) mit Ultrafiltrationsmembran (10 kDa Molekular-gewichtsgrenze, Merck) auf etwa 1 ml konzentriert ($Cyt_{Con\ A}$).

2.6.3 Präparative SDS-PAGE

Zur weiteren Aufreinigung von Ependymin wurde das $Cyt_{Con\ A}$-Isolat (Kap. 2.6.2) in einer präparativen SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) aufgetrennt. Dazu wurde ein präparatives Polyacrylamid-Gel (180 x 180 x 2 mm) aus 12 %iger Trenngel- und 6 %iger Sammelgel-Lösung (Tab. 2.10) hergestellt. Das $Cyt_{Con\ A}$-Isolat (1 ml) wurde vor der Elektrophorese mit 250 µl 5x Laemmli-Puffer (LAEMMLI, 1970; Tab. 2.10) versetzt und im Heiz-Thermomixer (MHR 11; HLC BioTech) 7 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend konnte das $Cyt_{Con\ A}$-Isolat und der Molekulargewichtsmarker (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder; Biorad) mit aktiver Wasserkühlung für 20 min bei 85 V und 18 h bei 120 V (PowerPac™ Universal Power Supply, Bio-Rad) elektrophoretisch (PROTEAN II xi Cell; Bio-Rad) aufgetrennt werden. Die Proteine wurden durch eine kolloidale Coomassie-Färbung nach NEUHOFF *ET AL.* (1985) sichtbar gemacht.

2.6.4 Elektrische Elution von Ependymin aus den Polyacrylamid-Gelen

EPDβ (37 kDa) und EPDγ (31 kDa) bilden auf einem präparativen Polyacrylamid-Gel jeweils ein Band entsprechend ihres Molekulargewichts. Diese Bänder wurden mit einem Skalpell (#3; Fine Science Tools) ausgeschnitten und die Proteine mittels elektrophoretischer Elutionsapparatur (Shandon Scientific) mit einer Spannung von 100 V und max. 3 mA (Netzteil; Bio-Rad) für 24 h in die Dialysesäcke (SERVA; Ausschlussgröße: 3,5 kDa; Ø 16 mm) mit Laufpuffer (Tab. 2.10) eluiert. Die EPDβ- bzw. die EPDγ-Proben wurden anschließend bei 4 °C mit 0,2 Bar Druck in einer 5 ml Ultrafiltrationszelle (Amicon; Merck) mit Ultrafiltrationsmembran (10 kDa Molekular-gewichtsgrenze; Merck) fünfmal mit Natrium-Phosphatpuffer (Tab. 2.10) gewaschen und auf 1 mg/ml konzentriert (Bestimmung mittels Bradford, Kap. 2.6.5). Das aufgereinigte EPDγ (31 kDa) wurde anschließend bei den Ependymin-RIAs (Kap. 2.11.1.1) als Standard verwendet bzw. zur Herstellung des Tracers radioaktiv markiert.

2.6.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Bei der Normalisierung der Ergebnisse der Ependymin-RIAs (Kap. 2.11.1), aber auch bei anderen Experimenten, war es entscheidend die Proteine in den Proben zu quantifizieren. Das

wurde photometrisch mit der Methode nach BRADFORD (1976) durchgeführt. Dabei wird der Probe ein Triphenylmethanfarbstoff (Coomassie Brillant Blau G 250) zugesetzt, der in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe bildet. Dadurch wird der Farbstoff vom kationischen in den anionischen Zustand überführt, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm verschiebt. Da die Intensität des Farbkomplexes direkt vom Proteingehalt abhängig ist, kann mittels einer Standardreihe die Proteinkonzentration der Proben ermittelt werden. Dafür wurde eine Standardreihe aus BSA-Lösung (Bovines Serumalbumin; Kap. 2.6, Tab. 2.10) in Duplikaten (2–100 µg in 100 µl A. Bidest) angesetzt und die Proben in Triplikaten gemessen (5 µl Probe in 100 µl A. Bidest). In jedem Ansatz wurde zusätzlich 60 µl 1 M NaOH (1 M NaOH, in A. Bidest) und schließlich 3 ml Bradford-Lösung (Kap. 2.6, Tab. 2.10) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur, wurde die Absorption der Standards und der Proben bei 595 nm mittels Photometer (NanoPhotometer®; Implen) bestimmt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde eine polynomische Funktion 2. Grades an die Werte der Standardreihe approximiert (Origin 9.1; OriginLab Corporation), mit der die Proteinkonzentration bestimmt werden konnte.

2.7 Erstellung und Haltung der Zellkulturen

2.7.1 Steriles Arbeiten mit Zellkulturen

Kulturmedium (Medium-199), Fetales Bovines Serum (FBS), Trypsin/EDTA-Lösung, HEPES-Lösung, HBSS(-), GlutaMAX™ Supplement und Antibiotika-Antimykotika (100x) wurden steril eingekauft. Alle anderen für die Zellkultur benötigten Lösungen und Medienzusätze sowie Pipettenspitzen wurden bei 121 °C für 30 min autoklaviert (V-65; Systec) oder mit sterilen Spitzenfiltern (FP 30/0,2 CA-S; Whatman) sterilfiltriert. Alle Glaswaren (Glaspipetten, Pasteurpipetten, Bechergläser usw.), Präparier-Besteck (Scheren und Pinzetten) und Einsätze für den Kühl-Inkubator wurden 8 h bei 200 °C sterilisiert (Sterilisator: ED 240; Binder). Die Arbeiten fanden ausschließlich unter Reinraumwerkbänken (Laminar Air Flow Class 100; Gelaire, Laminar Air TL 2448; Heraeus Holding) mit horizontalem Luftstrom statt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde die Arbeitsfläche der Reinraumwerkbänke mindestens 1 h mit UV-Licht bestrahlt und mit 70 %igem Ethanol (70 % (v/v) denaturiertes Ethanol, in A. Bidest) gereinigt. Es wurde stets mit Nitril-Handschuhen gearbeitet, die mit 70 %igem Ethanol desinfiziert wurden. Glaspipetten wurden vor der Benutzung mit einem Bunsenbrenner (Fireboy eco) abgeflammt. Der Kühl-Inkubator (KB 115, mit eingebauter CO_2-Regelung; Binder) wurde innen mit 70 %igem Ethanol abgesprüht, sorgfältig ausgewischt und 12 h auf eine Temperatur von 100 °C geheizt. Das Zellkulturmedium wurde mit Glaspipetten (mit Watte gestopft, sterilisiert) und einer

Pipettierhilfe (Pipetus®; Hirschmann Laborgeräte) überführt. Bei Medienwechseln wurde altes Kulturmedium mit einer Pasteurpipette und Absaugpumpe (NK 50 F; W. VOGEL) verworfen.

2.7.2 Zellkulturmedium und Supplemente

Als Zellkulturmedium wurde Medium-199 mit Hanks Salzen und Natriumhydrogencarbonat verwendet (Sigma Aldrich). Durch das Natriumhydrogencarbonat ist der pH-Wert des Zellkulturmediums von der CO_2-Konzentration abhängig. Die Haltung der Zellen erfolgte in einem Kühl-Inkubator (KB 115; Binder) mit CO_2-Regelung bei 0,5 % CO_2 (Kap. 2.7.7). Außerdem wurde dem Zellkulturmedium Supplemente, verändert nach MAJOCHA *ET AL.* (1982), zugegeben. Somit wurde jeder 500 ml Medium-199 Flasche 5 ml GlutaMAX™, 5 ml 1 M HEPES-Lösung und 5 ml 40 % Glucose-Lösung (40 % (w/v) D-Glucose, in A. Bidest, autoklaviert) hinzugegeben. GlutaMAX™ ist ein Dipeptid (L-Alanin-L-Glutamin) und ersetzt L-Glutamin als Stickstoffquelle, das nach Angaben des Herstellers stabiler gegen spontane Zersetzung in wässrigen Lösungen ist. Außerdem wurde 51,5 ml Fetales Bovines Serum (FBS; 10 % (v/v)), das zuvor für 30 min bei 56 °C komplementinaktiviert wurde, hinzugegeben. Um eine Vermehrung von potenziell vorhandenen Keimen entgegenzuwirken, wurde dem Medium bei der Ausplattierung der meningealen Zellen 2 % (v/v) Antibiotika-Antimykotika (100x) zugesetzt (Kap. 2.7.4). 24 h vor der Durchführung der Versuche wurde die Antibiotika-Antimykotika Konzentration auf 1 % (v/v) reduziert (Kap. 2.7.8).

2.7.3 Sterile Entnahme der Gehirne von *C. auratus*

Um die meningealen Primärkulturen der Goldfische zu kultivieren, mussten die Gehirne steril entnommen werden. Die Tötung erfolgte nach § 4 Abs. 3 Tierschutzgesetz (JLU-Nummer: 536_M). Dazu wurden die Goldfische nach der Betäubung (Kap. 2.5.2) kurz trockengetupft und auf eine desinfizierte Unterlage aus Zellstoff unter eine sterile Reinraumwerkbank gelegt. Anschließend wurden sie mit 70 %igem Ethanol abgesprüht und mit einer sterilen Standard-Schere (14,5 cm) zügig hinter den Kiemen dekapitiert. Nach jedem Arbeitsschritt wurde das benutzte Präparier-Besteck kurz in 100 % Ethanol (denaturiert) getaucht, mit einem Spiritusbrenner entzündet und ausbrennen gelassen. Der Kopf wurde daraufhin mit in 70 %igem Ethanol getränkten Zellstoff gefasst, das Gehirn mit sterilen Präparier-Besteck entnommen (Kap. 2.5.2) und in 15 ml Zentrifugenröhrchen (Thermo Fisher) mit 10 ml eiskaltem HBSS(-) (ohne Calcium und Magnesium, mit Phenolrot) überführt. Das verwendete HBSS(-) ist eine veränderte nach HANKS & WALLACE (1949) gepufferte Salzlösung (*Hanks' Balanced Salt Solution*), bei der auf zweiwertige Ionen verzichtet wurde, um die Cadherin-vermittelte Zelladhäsion zu unterbinden und die Vereinzelung der meningealen Zellen zu erleichtern. Die Kadaver wurden in denaturiertem Ethanol bis zur Entsorgung zwischengelagert.

2.7.4 Isolierung der meningealen Zellen

Um die meningealen Zellen zu isolieren, wurde eine Methode entwickelt, bei der die intakten Gehirne in Trypsin-EDTA Lösung (0,25 %) teilverdaut werden. Hierbei werden zuerst die peripheren Bereiche des Gehirns verdaut, wodurch verstärkt meningeale Zellen vereinzelt werden. Für die Isolierung der meningealen Zellen wurden fünf frisch präparierte Gehirne (Kap. 2.7.3), fünfmal 1 min mit 10 ml eiskaltem HBSS(-) gewaschen, um zweiwertige Ionen und potentiell vorhandene Keime zu reduzieren. Danach wurde der Überstand abgenommen, 0,5 ml/Gehirn Trypsin-EDTA Lösung (0,25 %) hinzugegeben und für 25 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken und Invertieren inkubiert. Diese Inkubationszeit wurde nach einer Versuchsreihe festgelegt, bei der nach anschließender Zellzählung (Kap. 2.7.5) die höchste Ausbeute an lebenden Zellen zu finden war. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 3 ml Medium-199 mit 10 % FBS (Kap. 2.7.2) pro Gehirn abgestoppt (Substratüberschusshemmung). Die trübe Zellsuspension wurde in neue 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, für 20 min bei 4 °C und 1000 xg zentrifugiert (Zentrifuge: Minifuge RF; Heraeus) und anschließend der Überstand vorsichtig verworfen. Die pelletierten Zellen wurden in 1 ml Medium-199 mit 2 % (v/v) Antibiotika-Antimykotika aufgenommen und die Zellen ausgezählt (Kap. 2.7.5). Durch diese Methode konnten Ausbeuten von etwa 3×10^6 Zellen/Gehirn erreicht werden, die in Kultur nach immuncytochemischen Analysen (Kap. 2.9) eine hohe Ependymin-Expression aufwiesen.

2.7.5 Zellzählung mit Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer

Für die Ausplattierung einer definierten Zellzahl wurden die trypsinierten Zellen (Kap. 2.7.4) in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Dafür wurden 20 µl der Zellsuspension mit 80 µl Trypanblau-Lösung (0,4 %) vorsichtig vermischt, für 2 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und in die Zählkammer gefüllt. Daraufhin wurden die Zellen in einem Inversmikroskop (IMT-2; Olympus) mit Phasenkontrast und 20er Objektiv gezählt. Es wurden nur lebende Zellen (nicht blau gefärbte Zellen) gezählt. Von vier ausgezählten Großquadraten wurde anschließend ein Mittelwert ($Z_{ungefärbt}$) gebildet, und dieser mit dem Verdünnungsfaktor (V = 5) und mit dem Kammerfaktor ($K = 10^4$) multipliziert. Daraus ergibt sich die Lebendzellzahl pro ml Zellsuspension (Formel 1).

Formel 1

$$\text{Lebendzellzahl} \times \text{ml}^{-1} = Z_{\text{ungefärbt}} \times V \times K$$

2.7.6 Ausplattierung meningealer Zellen

Für die Expressionsstudien (Kap. 2.8) wurden die Zellen in 6-*well* Zellkultur-Multischalen (Nunc, Thermo Fisher Sci.) mit Nunclon™ Delta Oberfläche kultiviert (Kulturoberfläche: 9,6 cm^2/*well*). Es wurden 1×10^6 lebend gezählte Zellen (Kap. 2.7.5) in 3 ml Medium-199 mit 2 % (v/v) Antibiotika-Antimykotika (Kap. 2.7.2) pro *well* ausplattiert. Für die Immuncytochemie (Kap. 2.9) wurden die

meningealen Zellen auf Culture-Slides (Corning) kultiviert. Die Culture-Slides bestehen jeweils aus einem Objektträger auf dem vier Kammern (je 1,7 cm^2 Arbeitsfläche) aus Polystyrol geklebt sind. Der Vorteil der Culture-Slides ist, dass die Kammern nach der Immunmarkierung vom Objektträger entfernt werden können, wodurch eine Betrachtung mit einem Fluoreszenzmikroskop (AX70; Olympus) ermöglicht wird. Vor der Kultivierung wurde die Glasoberfläche des Objektträgers mit Kollagen I (aus Rattenschwänzen) beschichtet. Dabei wurde in jede Kammer 1 ml einer Kollagen-Lösung (50 µg/ml, in 0,02 M Essigsäure) zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit 1 ml HBSS(-) gewaschen und 0,2 x 10^6 lebend gezählte Zellen in 1,5 ml Medium-199 mit 2 % (v/v) Antibiotika-Antimykotika ausplattiert.

2.7.7 Haltungsbedingungen der Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden in einem Kühl-Inkubator (KB 115; mit eingebauter CO_2-Regelung; Binder) konstant bei 25 °C, 0,5 % CO_2 und einer relativen Luftfeuchtigkeit von mindestens 92 % (Hygro-Thermometer-Uhr; MAGV) gehalten. Die Haltungstemperatur (25 °C) wurde möglichst nah an die der Goldfische angepasst (19 °C), um einen temperaturbedingten Einfluss auf die Genexpression zu vermeiden. Diese Temperatur wurde bereits bei den Versuchen von PORRMANN (1998) an den Zellen der Goldfisch-Meninx gewählt. Der pH-Wert des Zellkulturmediums ist durch das enthaltene Natriumhydrogencarbonat (4,2 mM) von der CO_2-Konzentration abhängig und liegt bei den genannten Kulturbedingungen bei pH 7,3.

2.7.8 Mediumwechsel bei den meningealen Primärkulturen

Vor einem Mediumwechsel wurde das fertig angesetzte Medium zunächst für 30 min im Inkubationsbad (Typ 1003, GFL) auf 25 °C aufgewärmt. Für die Entwicklung der Kulturen erwies sich ein erster Mediumwechsel am fünften Tag als besonders sinnvoll. Dadurch wurde eine feste Adhärenz der Zellen auf der Oberfläche sichergestellt, wodurch diese nicht durch einen Mediumwechsel weggewaschen wurden. Um Zelltrümmer und nicht adhärente Zellen zu entfernen, wurde beim ersten Mediumwechsel ein zusätzlicher Waschschritt eingefügt. Dabei wurde das alte Medium vollständig abgesaugt und die Zellen mit 1 ml Medium-199 mit 2 % (v/v) Antibiotika-Antimykotika (Kap. 2.7.2) gewaschen. Anschließend wurde das Medium erneut abgesaugt und mit 3 ml (Zellkultur-Multischalen) bzw. 1 ml (Culture-Slides) Medium-199 mit 2 % (v/v) Antibiotika-Antimykotika ersetzt. Am siebten Tag fand ein erneuter Mediumwechsel statt, wobei das alte Medium mit 3 ml bzw. 1 ml Medium-199 mit 1 % (v/v) Antibiotika-Antimykotika ersetzt wurde. Am achten Tag wurden die Expressionsstudien (Kap. 2.8) bzw. die immuncytochemischen Untersuchungen (Kap. 2.9) an den Zellkulturen durchgeführt.

2.8 Versuche zur Regulation der Ependymin-Expression in Zellkulturen

Um auf die Regulationsmechanismen der Ependymin-Expression schließen zu können, wurden den Zellkulturen verschiedene Substanzen zugegeben, die nach der Arbeitshypothese (Kap. 1.4) im Verdacht stehen die Expression von Ependymin zu regulieren. Diese Substanzen wurden dem Medium-199 mit 1 % (v/v) Antibiotika-Antimykotika (Kap. 2.7.2) zugesetzt, nachdem das Medium über Nacht unter Kulturbedingungen (Kap. 2.7.7) gelagert wurde. Dadurch konnten Temperatur- und pH-Unterschiede vermieden werden, die potentiell Einfluss auf die Ependymin-Expression haben könnten. Aufgrund eines starken Absinkens der Ependymin-Expression in den ersten Tagen nach der Kultivierung (Abb. 3.4 und Abb. 3.5), wurden die Versuche an acht Tage alten Kulturen durchgeführt, weil die Expression zu diesem Zeitpunkt am stabilsten war (Kap. 3.2). Nach definierten Inkubationszeiten der Substanzen wurde anschließend die mRNA- (Kap. 2.10) bzw. Protein-Expression (Kap. 2.11.1) von Ependymin bestimmt.

2.8.1 Behandlung der Zellen mit Glucocorticoiden

Durch Behandlung der meningealen Primärkulturen mit Glucocorticoiden (Cortisol und Corticosteron) sollte eine Stresssituation simuliert werden, um einen potentiellen Einfluss auf die Expression von Ependymin zu untersuchen. Da Cortisol das wichtigste Glucocorticoid bei Säugetieren ist (MOMMSEN *ET AL.,* 1999), wurde der Fokus auf dieses Glucocorticoid gelegt. Allerdings hängt die Serum-Cortisol-Konzentration bei Goldfischen nicht nur von Stress, sondern auch stark von Tageszeit (SINGLEY & CHAVIN, 1975a; PILZ, 2014; DOMBROWSKI, 2015), Wassertemperatur (Paxton *et al.*, 1984), Ovulation (COOK *ET AL.,* 1980), Salzgehalt (SINGLEY & CHAVIN, 1975b) und Größe der Goldfische (SINGLEY & CHAVIN, 1975a) ab. Deswegen wurden Serum-Cortisol-Konzentrationen in Goldfischen aus anderen Arbeiten (CHAVIN & SINGLEY, 1972; PAXTON *ET AL.,* 1984; PILZ, 2014) miteinander verglichen, um eine Konzentration festzulegen, die den Zellen angeboten werden sollte. Es wurden nur die höchsten Werte der jeweiligen Tagesverläufe einbezogen, bei denen keine Verhaltensversuche oder definierte Stress-prozeduren vorausgingen. Diese Werte bewegen sich im Bereich von 111 µg/l bis 444 µg/l ($\bar{x}$ = 234 ± 182 µg/l), sodass eine Konzentration ab 250 µg/l zur Simulierung einer Stresssituation als angemessen angesehen wurde. Daher wurden Konzentrationen von 250 µg/l (1x), 1250 µg/l (5x), 6250 µg/l (25x) an Cortisol bzw. Corticosteron dem Medium zugesetzt. Letzteres Steroid kommt im Plasma von Goldfischen in einer etwa sechsmal niedrigeren Konzentration vor (CHAVIN & SINGLEY, 1972). Weiterhin wurde die Wirkung des synthetischen Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonisten RU-486 (Mifepriston) auf die Ependymin-Expression der meningealen Zellen untersucht. Das Molekül hat eine Phenyl-Amino-Dimethyl-Gruppe an der 11β-Position des Steroidgerüsts, die entscheidend für die antiglucocorticoide Wirkung ist (MOMMSEN *ET AL.,* 1999). Für die Zugabe dieser Substanzen (Cortisol, Corticosteron und RU486) ins Zellkulturmedium

wurden zunächst 1 %ige (w/v) Stammlösungen in 99,7 %igem Ethanol hergestellt und anschließend in entsprechender Menge dem Medium zugesetzt. Den Kontroll-Kulturen wurde als Scheinbehandlung die gleiche Menge Ethanol (maximal 0,0625 % (v/v)) zugesetzt, um auszuschließen, dass eine potenzielle Auswirkung auf die Ependymin-Expression durch Ethanol verursacht wird. Die gemessenen Konzentrationen werden dementsprechend im Ergebnisteil relativ zu den jeweiligen Kontroll-Kulturen angegeben (Kap. 2.12.3). Es konnten weder morphologische Auswirkungen noch Expressionsunterschiede nach der Ethanol-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellkulturen beobachtet werden (nicht gezeigt).

2.8.2 Behandlung der Zellen mit Antiseren und aufgereinigten Gehirnproteinen

Es gibt Hinweise, dass neu synthetisiertes Ependymin die eigene Expression durch Feedback-Hemmung inhibiert (Kap. 1.1.5). Um das zu untersuchen, wurden meningeale Primärkulturen mit spezifischen Antiseren gegen Ependymin behandelt. Ziel dieses Experiments war durch Antikörperbindung die biologische Wirkung der Ependymin-Moleküle, und damit eine eventuell vorhandene Feedback-Hemmung zu unterbinden, wodurch die Ependymin-Expression ansteigen sollte. Dazu wurden den Zellen über das Kulturmedium zwei verschiedene Antiseren (Perseus: α-EPD; Beteigeuze: α-EPDβ, Tab. 2.8) in einer Konzentration von 1:50 zugesetzt. Die Kontroll-Kulturen wurden mit der gleichen Menge an neutralem Kaninchenserum behandelt. Weiterhin wurde versucht eine eventuell vorhandene Feedback-Hemmung durch Erhöhung der Ependymin-Konzentration im Medium zu induzieren. Dazu wurden die Kulturen mit ECF-Extrakt aus Goldfischgehirnen (Kap. 2.6.1) behandelt, dessen Ependymin-Anteil 15,6 % (SCHMIDT & LAPP, 1987) des Gesamtproteinanteils ausmacht. Das Kulturmedium wurde dabei mit 10 % (v/v) ECF-Extrakt versetzt, wobei die zugegebene Proteinmenge 54 µg/ml (nach Bradford-Test; Kap. 2.6.5) Kulturmedium betrug. Aufgrund der Extraktion der ECF in TBS, wurden die Kontrollgruppen mit der gleichen Menge TBS (10 % (v/v)) scheinbehandelt. Zur Bestimmung des Einflusses auf die Ependymin-mRNA-Expression wurde die Methode der RT-qPCR angewandt (Kap. 2.10).

2.9 Immuncytochemie

Um spezifische Antigene in den Primärkulturen subzellulär zu lokalisieren, wurden die Kulturen mit unterschiedlichen Primärantikörpern (Kap. 2.3; Tab. 2.8) und Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern (Kap. 2.3; Tab. 2.9) einfach oder doppelt-markiert (Kap. 2.9.1).

2.9.1 Immunfluoreszenzmarkierung der Primärkulturen

Die Immunfluoreszenzmarkierung der meningealen Zellen (Kap. 2.7.6) erfolgte durch mehrere Inkubationsschritte in einer vor Licht schützenden Feuchtekammer (eigene Herstellung) bei 60 rpm (Kompaktschüttler: KS 15 A; Edmund Bühler) und Raumtemperatur. Zuerst wurden die

Zellen zweimal mit PBS-Mg^{2+} (2 mM $MgCl_2$; in *phosphate buffered saline*; PBS) für 2 min und anschließend mit vorgekühlter Fixierlösung (5 % (v/v) Essigsäure, in Ethanol) für 8 min bei -20 °C fixiert. Die Fixierlösung wurde daraufhin mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Zellen 5 min bei Raumtemperatur an der Luft zum Trocknen stehen gelassen. Um die Fixierlösung vollständig zu entfernen, wurden die Zellen dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Zum Absättigen von unspezifischen Bindungsstellen wurden die fixierten Zellen 30 min in einer 5 %igen BSA-Lösung (Bovines Serumalbumin; 5 % (w/v) BSA, in PBS; pH 7,4) inkubiert. Nach Absaugen der Lösung folgte eine 60-minütige Inkubation eines Primärantikörpers (Kap. 2.3, Tab. 2.8) in 1 %iger BSA-Lösung (1 % (w/v) BSA, in PBS; pH 7,4) mit entsprechender Verdünnung (Tab. 2.12). Die Antikörperlösung wurde anschließend abgesaugt und die Zellen dreimal 5 min mit 1 %iger BSA-Lösung gewaschen. Zur Fluoreszenzmarkierung der spezifisch gebundenen Primärantikörper, folgte anschließend eine 60 min Inkubation mit einem adäquaten Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper (Kap. 2.3, Tab. 2.9) in 1 %iger BSA-Lösung (1:300). Bei einer Doppelmarkierung erfolgte nach einer Waschprozedur (dreimal 5 min mit 1 %iger BSA-Lösung) eine Immunfluoreszenzmarkierung nach dem obigen Prinzip, allerdings mit einem Primärantikörper aus unterschiedlichem Wirtstier (Kap. 2.3, Tab. 2.8) und entsprechenden Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper. Anschließend wurden die Zellen dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Zur Markierung der Nuclei inkubierten die Zellen daraufhin 3 min in einer DAPI-Lösung (4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid; 300 nM, in PBS). DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, das in die kleinen Furchen AT-reicher Regionen von doppelsträngiger DNA interkaliert und bei Anregung mit UV-Licht (Exitationsmaximum: 358 nm) blaues Licht (Emissionsmaximum: 461 nm) emittiert (KAPUSCINSKI, 1995). Schließlich wurden die Zellen dreimal 5 min mit PBS gewaschen, bevor sie in 100 µl DABCO-Lösung (0,25 % (w/v) DABCO, 90 % (w/v) Glycerin, in PBS) pro Kultur eingedeckelt (Deckgläser, MAGV) und mit Nagellack fixiert wurden.

2.9.2 Mikroskopie, Fotografie und Bildbearbeitung

Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskop (AX70; Olympus) betrachtet. Die verwendeten Filterblöcke sind in Tab. 2.11 aufgelistet.

Tab. 2.11: Verwendete Filterblöcke des Fluoreszenzmikroskops AX70 (Olympus) für die entsprechenden Fluorophore.

Färbung	DAPI	Alexa 488	Alexa 568
Filterblock	U-MWU	U-MWIBA	U-MWG
Exzitationsfilter	330–385 nm	460–495 nm	510–550 nm
Emmissionsfilter	420 nm	510–550 nm	590 nm
dichroischer Spiegel	400 nm	505 nm	570 nm

Die Aufnahmen der Immunfluoreszenzbilder wurden mit einer CCD-Kamera (CC12; Olympus) über die PC-Software cell^P 2.6 (Olympus) durchgeführt. Immunmarkierungen mit gleichem Primärantikörper wurden stets mit der gleichen Belichtungszeit fotografiert (Tab. 2.12).

Tab. 2.12: Antikörperkonzentrationen, Inkubationsdauer, Belichtungszeiten und Tonwertspreizung.

Kurzname	AK-Konzentration	Inkubationsdauer	Belichtungszeit	Tonwertspreizung
α-EPD	1:200	1h	2 s	20–200
α-FN1	1:80		5 s	30–150
α-FN15	1:100		5 s	30–150
α-GFAP	1:80		5 s	30–150
α-GR	1:50		5 s	20–150
α-PVALB	1:100		5 s	50–150
α-VIM	1:150		2 s	20–230
α-DAPI	300 nM	3 min	200 ms	30–255

Die digitalisierten Bilder wurden mit der PC-Software Photoshop CS3 (Adobe Systems) übereinandergelegt und bearbeitet. Um einen höheren Kontrast bei den Aufnahmen zu erreichen, wurde eine Tonwertspreizung vorgenommen (Bild → Anpassung → Tonwertkorrektur → Tonwertspreizung). Dabei wurde für jede Markierung mit demselben Antikörper die gleiche Tonwertspreizung durchgeführt (Tab. 2.12). Alle Übersichtsbilder wurden in einer 100-fachen optischen Vergrößerung (Objektiv: UPlanFL 10x/0.30 Ph1) aufgenommen. Die vergrößerten Abschnitte stellen entweder digital vergrößerte Abschnitte der Übersichtsaufnahme, oder eine Fotografie einer 200-fachen optischen Vergrößerung (Objektiv: UPlanApo 20x/0.70 Ph2) dar. Diese Bearbeitung wurde auch mit den negativen Kontrollen vorgenommen, um eine unspezifische Markierung auszuschließen (Anhang Abb. 7.1).

2.10 Quantifizierung der mRNA-Expression mittels RT-qPCR

Der Einfluss von Glucocorticoiden und anderen Substanzen (Kap. 2.8) auf die mRNA-Expression von meningealen Kulturen wurde mittels der reversen Transkriptase quantitativen Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR) untersucht. Dabei wurde die RNA durch phenolische Extraktion aufgereinigt (Kap. 2.10.2), mittels einer reversen Transkriptase (RT) in komplementäre DNA (cDNA; *complementary DNA)* umgeschrieben (Kap. 2.10.6) und die cDNA-Menge ausgewählter Gene in einer quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) relativ quantifiziert (Kap. 2.10.7). Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden nach den Richtlinien in Kap. 2.10.1 hergestellt und sind in Tab. 2.13 angegeben.

Tab. 2.13: Puffer und Lösungen mit Inhalts- und Konzentrationsangaben die relative mRNA-Quantifizierung.

Lösung	Inhaltsstoffe
2 %ige Agarose-Gele	2 % (w/v) Agarose, in TAE-Puffer (durch Aufkochen im Mikrowellenherd gelöst), 257 nM Ethidiumbromid.
Denaturierende Gele	1 % (w/v) Agarose (in DEPC durch Aufkochen im Mikrowellenherd gelöst), 2,2 M Formaldehyd, in MOPS-Puffer.
MOPS-Puffer	0,02 M MOPS, 5 mM mono-Natriumcitrat, 0,5 mM EDTA, pH 7,0 (mit NaOH eingestellt), in DEPC-Bidest, autoklaviert.
TAE-Laufpuffer	40 mM TRIS-Base, 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, in A. Bidest, pH 8,5 ± 0,2 (wird nicht eingestellt).

2.10.1 RNase-freies Arbeiten und Umgang mit RNA

Zur Vermeidung von Kontaminationen vor allem durch exogene RNasen oder DNA, wurden beim Umgang mit RNA stets Nitril-Handschuhe getragen und ein separater autoklavierter Pipettensatz verwendet. Außerdem wurde mit RNA-haltigen Proben auf *crushed ice* gearbeitet, um die Degradation der RNA zu verlangsamen. Alle Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat behandeltem Wasser (DEPC-Bidest; 0,1 % (v/v) DEPC, in A. Bidest, über Nacht gerührt, autoklaviert) angesetzt. Die Arbeitsflächen und Arbeitsgeräte wurden mit RNase-ExitusPlus™ (AppliChem) und DNA-ExitusPlus™ (AppliChem) abgewischt, während Pipettenspitzen (epT.I.P.S. Reloads) und Reaktionsgefäße (RNA/DNA LoBind) RNase- und DNA-frei erworben wurden. Plastikwaren (Elektrophorese-Apparatur, Kämme etc.) wurden für 30 min in NaOH-Lösung (50 mM NaOH, in DEPC-Bidest) getaucht und anschließend mit ausreichend DEPC-Bidest gespült, getrocknet und bis zur Verwendung in Adhäsionsfolie eingewickelt.

2.10.2 Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellkulturen

Die Gesamt-RNA der Zellkulturen wurde durch eine Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion, verändert nach CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987) isoliert. Zur Lysierung der Zellen wurde das Medium aus den Zellkultur-Multischalen abgesaugt und 1 ml TRIzol® Reagenz (enthält Phenol und Guanidiniumthiocyanat) pro Kultur zugegeben. Das Reagenz wurde 1 min resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Lösung wurde anschließend 30 s gevortext und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 100 µl 1-Brom-3-Chlorpropan (Ersatz für Chloroform; CHOMCZYNSKI & MACKEY, 1995) dazugegeben und 15 s kräftig geschüttelt. Die Suspension inkubierte anschließend 10 min bei Raumtemperatur und wurde danach für 20 min bei 4 °C und 12.000 xg (Tischzentrifuge: Hettich; EBA 12 Typ 1000) zentrifugiert. Die entstandene obere wässrige Phase (enthält die RNA), wurde überführt und die RNA durch Zugabe von 550 µl 2-Propanol gefällt. Dazu wurde zusätzlich 1 µl Glycogen-Lösung (≙ 2 µg) als Trägersubstanz zugegeben, durch Invertieren gemischt und 10 min bei Raumtemperatur stehen

gelassen. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für 10 min bei 4 °C und 12.000 xg zentrifugiert. Zum Pellet wurde 1 ml 75 %iger Ethanol (75 % (w/v) Ethanol, in DEPC-Bidest) zugegeben (Überstand wurde verworfen), durch Vortexen (10 s) vom Boden gelöst und 5 min bei 4 °C und 12.000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vollständig entfernt, das Pellet 20 min bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet und in 20 µl DEPC-Bidest gelöst.

2.10.3 Bestimmung der Konzentration und Reinheit der Gesamt-RNA

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration der aufgereinigten Proben, wurde die Absorption bei 260, 280 und 230 nm mittels UV/VIS-Spektralphotometer (NanoPhotometer®; Implen) und Mikroliter-Aufsatz (optische Weglänge (L) = 1 mm) gemessen. Durch den A260-Wert kann mit Formel 2 (GALLAGHER & DESJARDINS, 2006) die RNA-Konzentration (C) direkt berechnet werden.

Formel 2

$$\mathrm{C}\ [\mu g \times ml^{-1}] = \frac{A_{260} \times 10\ mm}{0{,}025 \times L}$$

Zur Ermittlung der Reinheit der Proben wurden die A260/A280- und A260/A230-Quotienten bestimmt. Da Kontaminationen mit Proteinen und organischen Lösungsmitteln die Ergebnisse der Expressionsstudien beeinflussen könnten (VERMEULEN *ET AL.,* 2011), wurden nur RNA-Proben verwendet deren Quotienten im Toleranzbereich (A260/A280 > 1,8; A260/A230 > 2,0) lagen. Proben, die diese Voraussetzung nicht erfüllten, wurden durch Zugabe von 480 µl DEPC-Bidest, 50 µl Natriumacetat-Lösung (3 M, pH 5,2) und 550 µl 2-Propanol erneut gefällt. Dafür wurde die Probe 30 min bei 20 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei 12000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet, wie in Kap. 2.10.2 angegeben, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 20 µl DEPC-Bidest gelöst. Schließlich wurde erneut die RNA-Konzentration gemessen und die Reinheit mittels Bestimmung der A260/A280- und A260/A230-Quotienten überprüft.

2.10.4 Bestimmung der Integrität der Gesamt-RNA

Degenerierte RNA-Proben können die Ergebnisse bei der Quantifizierung mittels RT-qPCR stark beeinflussen (FLEIGE *ET AL.,* 2006). Deshalb wurden die RNA-Proben stichprobenartig durch eine horizontale denaturierende Gelelektrophorese auf ihre Integrität, verändert nach LEHRACH *ET AL.* (1977) und GOLDBERG (1980), untersucht. Es wurden 1 µg RNA einer Probe 1:1 mit RNA-Ladepuffer (2x RNA Loading Dye) gemischt, 10 min bei 65 °C erhitzt und in denaturierenden Gelen (Kap. 2.10; Tab. 2.13) im MOPS-Puffer System (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure; Kap. 2.10; Tab. 2.13) aufgetrennt. Durch den enthaltenen Formaldehyd im MOPS-Puffer denaturiert die RNA und wandert entsprechend dem dekadischen Logarithmus der Basenlänge

(LEHRACH *ET AL.*, 1977). Zur Abschätzung der Basenlänge der Bänder wurde zusätzlich pro Gel 3 µl RNA-Leiter (RiboRuler High Range RNA Ladder) aufgetragen. Die Gelelektrophorese fand in einer horizontalen Elektrophorese-Apparatur (Mini-Sub® Cell GT; Bio-Rad) für 10 min bei 30 V und anschließend für 60 min bei 60 V (PowerPac™ Universal Power Supply, Bio-Rad) statt. Zur Detektion der RNA enthält der RNA-Ladepuffer Ethidiumbromid, das mit der RNA interkaliert und die Fluoreszenz-Emission nach UV-Bestrahlung bei 254 nm intensiviert. Dadurch konnte die RNA mittels Chemi-Imager (ChemiDoc™ MP System; Bio-Rad) und Image Lab 5.1 Software (Bio-Rad) visualisiert und die Basenlänge und Intensität der Bänder analysiert werden. Die Integrität der RNA wurde anhand des Verhältnisses der ribosomalen RNA (rRNA) abgeschätzt. Dabei sollten die 4,8 kb (28S)- und 1,9 kb (18S)-Bänder deutlich zu erkennen sein und im Verhältnis von etwa 2:1 liegen (Abb. 2.1). In diesem Fall kann man davon ausgehen, dass die RNA intakt ist und die Proben zur Quantifizierung geeignet sind.

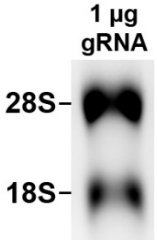


Abb. 2.1: Elektrophoretische Auftrennung einer Gesamt-RNA-Probe zur Untersuchung der RNA-Integrität. 1 µg einer Gesamt-RNA-Probe (gRNA) wurde in einer denaturierenden Gelelektrophorese aufgetrennt und das Verhältnis der Intensität der 28S und 18S rRNA mittels Image Lab 5.1 Software (Bio-Rad) bestimmt. Das Verhältnis der dargestellten RNA-Probe beträgt in diesem Fall 1,93:1.

2.10.5 Verdau von genomischer DNA durch DNase I in RNA-Proben

Um eine Amplifikation genomischer DNA in der qPCR zu unterbinden, wurde eventuell vorhandene DNA aus der Gesamt-RNA-Probe (Kap. 2.10.2) enzymatisch mit DNase I verdaut. Es wurde je Probe 1 µg Gesamt-RNA mit 7,5 µl DEPC-Bidest in PCR-Reaktionsgefäßen (PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0,2 ml) gelöst. Dazu wurden 0,5 µl RNase-Inhibitor (Ribolock; 40 U/µl), 1 µl 10x DNase I-Puffer (enthält 25 mM $MgCl_2$) und 1 µl DNase I (1 U/µl) pipettiert. Nach vorsichtigem Durchmischen wurde der Ansatz für 45 min bei 37 °C im PCR-Cycler (PTC-100 Thermal Cycler, MJ Research) inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 1 µl 50 mM EDTA und durch Erhitzen auf 65 °C für 10 min gestoppt.

2.10.6 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Für die reverse Transkription wurde der „RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Dieser beinhaltet eine rekombinante Reverse Transkriptase aus dem retroviralen Maus-Leukämie-Virus (M-MuLV; *Moloney murine leukemia virus*). Sie ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die anhand einer einzelsträngigen RNA als Vorlage und in Anwesenheit von spezifischen Primern eine komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert (VERMA, 1975). Zu den RNA-Proben die durch DNase I von genomischer DNA befreit wurden (Kap. 2.10.5), wurde jeweils 0,5 µl Oligo$(dT)_{18}$-Primer (100 µM) und Random Hexamere (100 µM)

zugegeben und für die Denaturierung der Sekundärstrukturen 5 min bei 65 °C inkubiert. Random Hexamere sind zufällig zusammengesetzte Hexamer-Oligonukleotide und hybridisieren an zufälligen Stellen der gesamten RNA, während Oligo(dT)$_{18}$-Primer spezifisch an das Poly(A)-Ende der mRNA hybridisieren. Nach der Denaturierung wurden die Proben sofort auf 0 °C heruntergekühlt und 1 µl RNase-Inhibitor (20 U/µl), 4 µl 5x Reaktionspuffer (250 mM TRIS-HCl (pH 8,3), 250 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$ und 50 mM DTT), 2 µl dNTP-Mix (je 10 mM) und 1 µl Reverse Transkriptase (200 U/µl) hinzugegeben. Der Ansatz wurde danach durch Invertieren gemischt, kurz herunterzentrifugiert und die Reverse Transkription im PCR-Cycler (PTC-100 Thermal Cycler, MJ Research) gestartet. Das Programm startet mit dem Anlagern (*annealing)* der Random Hexamere (5 min bei Raumtemperatur), folgt dann mit der reversen Transkription (42 °C für 60 min) und endet mit dem Abstoppen der Reaktion (5 min bei 70 °C). Daraufhin wurden die Proben bis zur Entnahme auf 4 °C gekühlt.

2.10.7 Zielsequenzen und Primer-Design für qPCR

Mit Hilfe der qPCR wurde die mRNA-Expression von spezifischen Genen anhand bekannter mRNA-Sequenzen des Goldfisches (*Carassius auratus*) bzw. der Karausche (*Carassius carassius*) bestimmt (Tab. 2.14). Es handelt sich um die mRNA der beiden Ependymin-Gene (*epd1* und *epd2*), einem L1-ähnlichen Protein E587 (*l1-e587*) und der beiden Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*gapdh*) und beta-Aktin (*actb*). Die Primer für die qPCR wurden mit Hilfe des Online-Tools Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) entworfen. Primer-BLAST wurde am NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) entwickelt, um spezifische Primer für ein PCR-Template zu generieren. Es benutzt den Algorithmus von Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi), um PCR-Primer zu entwerfen und sendet sie an BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) weiter, um sie nach ihrer Spezifität zur Zielsequenz zu untersuchen (Ye *et al.*, 2012).

Tab. 2.14: Ziel-mRNAs für die RT-qPCR. Dargestellt sind die Namen der untersuchten Gene, Namen der Ziel-mRNAs und Zugriffsnummern (*accession numbers*) der Genbank des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Gen	Name der Ziel-mRNA in der Genbank	*accession number*
epd1	"Carassius auratus *EPD-I* gene for ependymin-I"	X14134.1
epd2	"Goldfish (*C. auratus*) ependymin II (*EPD-II*) protein"	J04986.1
l1-e587	"*Carassius auratus* L1-like cell adhesion molecule antigen E587 mRNA"	U55211.1
gapdh	„*Carassius carassius* partial mRNA for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH* gene)"	AM701793.1
actb	"*Carassius auratus* mRNA for beta actin"	AB039726.2

Tab. 2.15: Verwendete Primer zur Quantifizierung der mRNA mittels qPCR. Angegeben sind jeweils Gen, Primer-Sequenz, Lage der Primersequenz auf der mRNA (Start- und Endbase), Länge des qPCR-Produkts, Schmelztemperatur (Tm) und GC-Gehalt in % (GC %). VP (Vorwärts-Primer); RP (Rückwärts-Primer).

Gen	Primer-Sequenzen	Lage auf der mRNA [Basen]	Größe des Produkts [bp]	T_m [°C]	GC %
epd1	VP: GGCAATGATGCATACAGTCAAG RP: GGCATGGTTGGCGATGAG	25–46 113–96	89	58,0 58,9	45,5 61,1
epd2	VP: ACAATGAAAGTGGTTTCAACGG RP: CTGAACTCTCCAGATGCAAGG	140–161 192–172	53	58,0 58,4	40,9 52,4
l1-e587	VP: CAAGTACGAGGCCACAGAAG RP: AGTTGGTAATCTGCCAGTCG	1209–1228 1300–1281	92	58.3 57,6	55,0 50,0
gapdh	VP: GTGCCCTGTATGTTGTCGAG RP: CACCCTGGATGTGAGATGAG	3–22 74–55	72	58,6 57,4	55,0 55,0
actb	VP: GGCTTCTGCTCTGTTTGGCGCA RP: CTGTGAGGGCAGAGTGGTAGACG	1238–1259 1389–1367	152	60,5 58,5	59,1 60,9

Um eine möglichst hohe Spezifität und hohe qPCR-Effizienz zu erreichen, mussten die Primer verschiedene Kriterien erfüllen, die bei Primer-BLAST eingestellt wurden. Die Größe der qPCR-Produkte wurde zwischen 50 und 152 bp und die Größe der Primer-Sequenzen zwischen 18 und 23 bp (Optimum: 20 bp) festgelegt. Die Schmelztemperatur (T_m) der Primer-Sequenzen wurde zwischen 56 und 61 °C (T_m-Optimum bei 58 °C) ausgewählt. Die T_m-Differenz (ΔT_m) zwischen den Primer-Paaren sollte ≤ 2 °C sein. Unter T_m versteht man diejenige Temperatur, bei der 50 % einer doppelsträngigen DNA als Einzelstrang vorliegt. Sie stellt somit ein Maß für die Stabilität der Hybridisierung an das Template dar. Der GC-Gehalt (GC %) sollte zwischen 35 und 65 % liegen. Da das Genom des Goldfisches nicht vollständig sequenziert ist, wurde die Spezifität der Primer zu *Carassius* (*Taxonomy ID*: 7956) und zusätzlich zu *Danio rerio* (*Taxonomy ID*: 7955), dem nächsten Verwandten des Goldfisches, der vollständig sequenziert ist, untersucht. Dabei wurden nur Primer-Paare berücksichtigt, die mindestens drei Fehlpaarungen zu anderen Genen mit mindestens zwei Fehlpaarungen am 3'-Ende (die letzten fünf Basen) aufwiesen. Um unspezifische Hybridisierungen zu vermeiden, wurden nur Primer-Sequenzen mit maximal vier gleichen Basen hintereinander (z. B. AAAA) akzeptiert. Zur Vermeidung von Primer-Dimeren wurden außerdem komplementäre Sequenzen zwischen den Primern von mehr als vier aufeinander folgenden Basen ausgeschlossen. Alle anderen Parameter wurden in den Standard-einstellungen von Primer-BLAST belassen. Da zu den untersuchten Gensequenzen keine Informationen über Introns vorliegen, konnten die Primer nicht unter Berücksichtigung von Exon-Exon-Junctions entworfen werden. Um trotzdem eine Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden, wurde deshalb vor der Reversen Transkription ein Dnase I-Verdau durchgeführt (Kap. 2.10.5). Für jedes zu untersuchende Gen wurden die fünf erfolgversprechendsten Primer-Paare bei Thermo Fisher Scientific bezogen und hinsichtlich ihrer qPCR-Effizienz (Kap. 2.10.10)

und Spezifität untersucht. Die Spezifität wurde durch Analyse der qPCR-Produkte anhand der Schmelzkurven und gelelektrischer Auftrennung in Agarosegelen (Kap. 2.10.8) bestimmt. Die anhand dieser Kriterien ausgewählten Primer-Paare sind in Tab. 2.15 aufgeführt.

2.10.8 Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Die fertigen cDNA-Proben (Kap. 2.10.6) wurden 1:3 mit DEPC-Bidest (20 µl cDNA Probe; 40 µl DEPC-Bidest) verdünnt und konnten daraufhin direkt für die Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion (qPCR) verwendet werden. Zur genspezifischen Amplifikation der cDNA wurden die in Tab. 2.15 aufgelisteten Primer und der SYBR® Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Dieser Master Mix enthält einen SYBR® GreenER™ Farbstoff, eine AmpliTaq® DNA Polymerase, eine hitzelabile Uracil-DNA Glycosylase (UDG), Nukleosidtriphosphate (dNTPs) und Pufferkomponenten. Die Primer wurden lyophilisiert (50 nmol) erworben (Thermo Fisher Scientific) und in DEPC-Bidest gelöst (4 µM). Für die Herstellung von 10 µl qPCR-Ansätzen wurde 5 µl SYBR® Select Master Mix, 1 µl Vorwärts und 1 µl Rückwärts-Primer (400 nM Endkonzentration) sowie 3 µl cDNA-Probe (50 ng cDNA) in 0,1 ml 4-Tube/Cap Strips pipettiert. Von jeder cDNA-Probe wurden pro Primer-Paar drei qPCR-Reaktionen (Triplikate) angesetzt. Die qPCR erfolgte anschließend im qPCR-Cycler (Rotor-Gene 2000; QIAGEN) mit dem Programm „Rotor-Gene 6.1“ (QIAGEN). Den PCR-Zyklen war ein UNG (Uracil-N-Glycosylase)-Verdau (2 min bei 50 °C) vorgeschaltet. Der UNG-Verdau diente der Beseitigung einer eventuellen Kontamination mit qPCR-Produkten vorangegangener Versuche. Aufgrund der im SYBR® Select Master Mix vorliegenden dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dUTP) enthalten qPCR-Produkte die Base Uracil anstatt Thymin. Dadurch ist es der UNG möglich, selektiv Uracil-haltige qPCR-Produkte vorangegangener Versuche zu verdauen, während die cDNA davon unbeeinflusst bleibt. Im anschließenden Schritt (2 min bei 95 °C) wurde die UNG inaktiviert und gleichzeitig die enthaltene AmpliTaq® DNA Polymerase aktiviert. Die eigentliche qPCR umfasst 45 Zyklen mit jeweils einem Denaturierungsschritt (15 s bei 95 °C), einem *annealing*-Schritt zur Primer-Hybridisierung (25 s bei 57 °C) und einem Elongationssschritt (30 s bei 72 °C). Während der qPCR interkaliert der enthaltene Fluoreszenzfarbsoff SYBR® GreenER™ an die kleine Furche doppelsträngiger DNA, wodurch die Fluoreszenz proportional zur DNA-Menge ansteigt. Damit nimmt auch das Fluoreszenzsignal proportional mit der ansteigenden Menge der qPCR-Produkte zu. Da am Ende von jedem Zyklus das Fluoreszenzsignal gemessen wird, kann anschließend mit dem Programm „Rotor-Gene 6.1“ (QIAGEN) der „*threshold cycle“* (Ct-Wert) bestimmt werden, der denjenigen Punkt definiert, an dem die Fluoreszenz über den Hintergrund (Schwellenwert = 0,1) ansteigt (PFAFFL *ET AL.,* 2002). Anhand des Ct-Werts kann die anfangs enthaltene spezifische cDNA-Menge (bzw. mRNA-Menge) des jeweiligen Gens relativ quantifiziert werden (Kap. 2.12.1).

2.10.9 Nachweise für die Spezifität der verwendeten Primer

Um die Spezifität der verwendeten Primerpaare (Kap. 2.10.7; Tab. 2.15) zu untersuchen, wurden die qPCR-Ansätze nach der Amplifikation langsam von 60 °C auf 95 °C erhitzt (Temperaturerhöhung: 1 °C alle 5 s) und dabei die Fluoreszenzintensität (F) kontinuierlich gemessen. Dieses Signal nimmt bei steigender Temperatur (T) ab, da qPCR-Produkte abhängig von der spezifischen Schmelztemperatur (T_m) denaturieren und der SYBR® GreenER™ Farbstoff nur in doppelsträngiger DNA interkaliert. Mit der ersten negativen Ableitung der Schmelzkurve (-dF/dT gegen T; Abb. 2.2) liegt die T_m am absoluten Maximum der Kurve. Dabei unterscheidet sich die T_m verschiedener qPCR-Produkte aufgrund der Länge und Zusammensetzung (GC-Gehalt). Damit ergeben sich für die qPCR-Produkte charakteristische T_m bei 85,1 °C (*epd1*), 77,7 °C (*epd2*), 86,5 °C (*l1-e587*), 80,8 °C (*gapdh*) und 83,1 °C (*actb*). Die Kurvenverläufe weisen keine weiteren Höchstwerte auf, die auf das Vorhandensein von weiteren qPCR-Produkten, und damit auf eine unspezifische Amplifizierung, hinweisen würden.

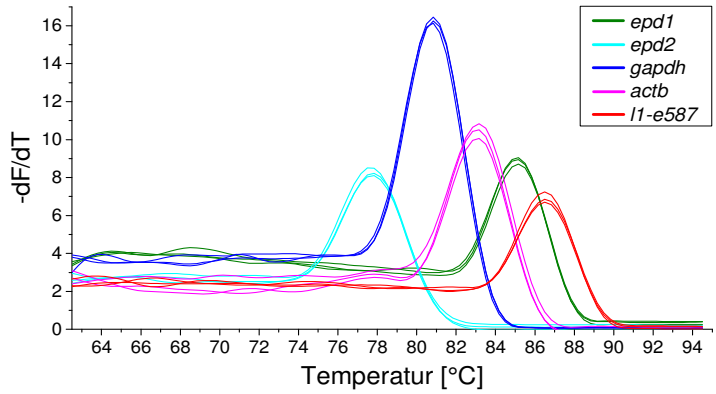


Abb. 2.2: Charakteristische Schmelztemperaturen der qPCR-Produkte. Die Schmelztemperaturen (Tm) sind aus der ersten negativen Ableitung (-dF/dT gegen T) der Schmelzkurve an den absoluten Maxima abzulesen. Die qPCR-Produkte der Gene *epd1* (85,1 °C), *epd2* (77,7 °C), *l1-e587* (86,5 °C), *gapdh* (80,8 °C) und *actb* (83,1 °C) weisen charakteristische Schmelztemperaturen auf.

Zur weiteren Abschätzung der Spezifität der Primerpaare für die zu untersuchenden Gene wurden die apparenten Nukleotidgrößen der qPCR-Produkte (nach 40 Zyklen) durch gelelektrophoretische Auftrennung bestimmt. Dafür wurden die Retentionsfaktoren (Rf-Wert; Quotient aus Laufstrecke des Bandes zur Laufstrecke der Lauffront) mit einer Standardkurve einer DNA-Leiter (GeneRuler Low Range DNA Ladder) verglichen. Die 10 µl qPCR-Ansätze wurden zur Auftrennung mit 2 µl DNA-Ladepuffer (6x DNA Loading Dye) gemischt und in 2 %igen Agarose-Gelen in einer horizontalen Elektrophorese-Apparatur (Sub Cell GT; Bio-Rad) mit TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffersystem (Kap. 2.10; Tab. 2.13) bei einer Spannung von 100 V (PowerPac™ Universal Power Supply, Bio-Rad) aufgetrennt. Das im Agarose-Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA, wodurch die Bänder mittels Chemi-Imager (ChemiDoc™ MP System; Bio-Rad) visualisiert werden konnten. Die qPCR-Produkte wurden als spezifisch angesehen, wenn nur ein einziges Band (Abb. 2.3) zu erkennen war, welches nach der Gensequenz die erwartete Nukleotidgröße des qPCR-Produkts aufwies. Die experimentell bestimmten (apparenten) Nukleotidgrößen der qPCR-Produkte sind den erwarteten

Nukleotidgrößen sehr ähnlich, jedoch aufgrund einer leichten Ungenauigkeit der Bestimmungsmethode jeweils geringfügig erhöht (Tab. 2.16). Das weist darauf hin, dass die qPCR-Produkte durch Amplifikation der erwarteten Targets entstanden sind.

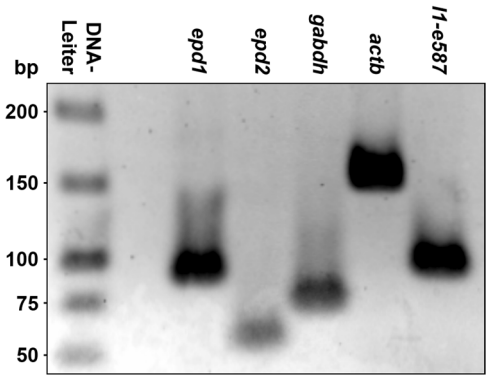


Abb. 2.3:Untersuchung der apparenten Nukleotidgrößen der erhaltenen qPCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die qPCR-Produkte der Gene *epd1*, *epd2*, *l1-e587*, *gapdh* und *actb* wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit den Nukleotidgrößen einer DNA-Leiter (GeneRuler Low Range DNA Ladder) verglichen. Die bestimmten (apparenten) Nukleotidgrößen sind in Tab. 2.16 aufgelistet.

Tab. 2.16: Nukleotidgrößen der qPCR-Produkte. Zur Abschätzung der Spezifität der Primer werden die erwarteten (aus den Gensequenzen der Datenbanken) und bestimmten (apparenten) Nukleotidgrößen (aus Agarose-Gelelektrophorese; Abb. 2.3) der qPCR-Produkte aufgelistet.

Zielgen	*epd1*	*epd2*	*l1-e587*	*gapdh*	*actb*
erwartete Größe des qPCR-Produkts [bp]	89	53	92	72	152
apparente Größe des qPCR-Produkts [bp]	95,7	56,1	100,9	80,1	156,1

2.10.10 Erstellung einer Standardreihe zur Ermittlung der qPCR-Effizienz

In einer qPCR-Reaktion wird die Menge des qPCR-Produkts mit jedem Zyklus theoretisch verdoppelt, somit liegt eine optimale qPCR-Effizienz bei 2,00. In der Praxis kann jedoch die qPCR-Effizienz von diesem Wert abweichen, wodurch eine Quantifizierung ohne Berücksichtigung der tatsächlichen qPCR-Effizienz ungenau sein kann (PFAFFL, 2001). Deswegen wurde E unter den angegebenen qPCR-Bedingungen anhand einer Standardreihe ermittelt und zur Bestimmung der relativen mRNA-Expression herangezogen (Kap. 2.12.1). Die Standardreihe umfasst eine siebenstufige Verdünnungsreihe (jeweils 1:4 mit DEPC-Bidest) einer Gesamt-RNA-Probe (aus acht Tage alten unbehandelten Zellkulturen). Die Standards wurden, wie auch die experimentellen Proben, einem DNase I-Verdau (Kap. 2.10.5), einer reversen Transkription (Kap. 2.10.6) und anschließend einer qPCR (Kap. 2.10.8) unterzogen. Jede Verdünnung wurde für jedes Primerpaar (Tab. 2.15) in Triplikaten angesetzt und der Ct-Wert bestimmt (Abb. 2.4-A). Die durch das Programm Rotor-Gene 6.1 (QIAGEN) ermittelten Ct-Werte wurden gegen den dekadischen Logarithmus der zugegebenen cDNA-Menge aufgetragen und eine lineare Regressionsgerade im linearen Bereich an die Werte angepasst (Abb. 2.4-B). Durch die Steigung (b) dieser Standardkurve konnte die qPCR-Effizienz (E) nach Formel 3 berechnet werden (Pfaffl, 2001; Anhang Tab. 7.1).

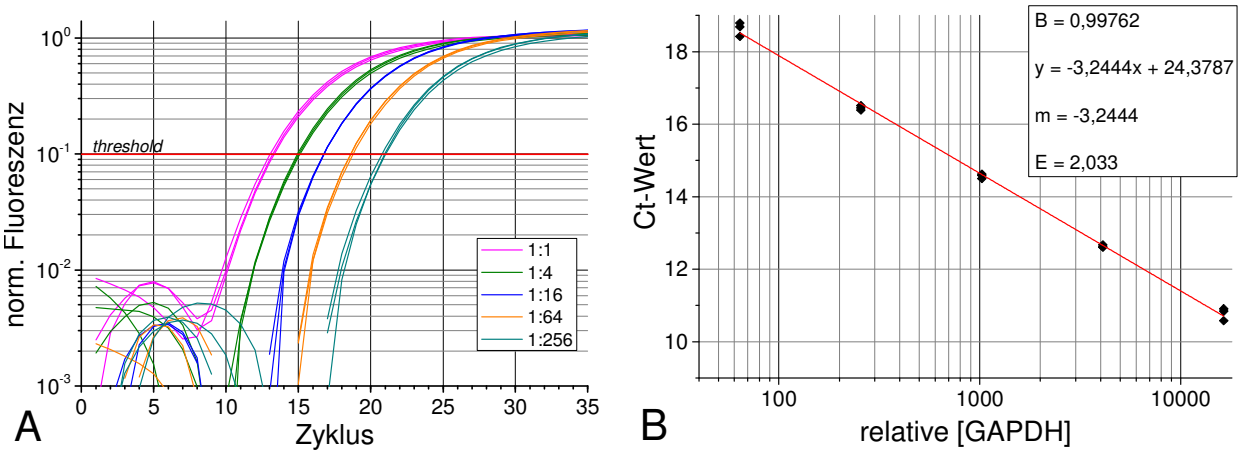


Abb. 2.4: Standardreihe zur Ermittlung der qPCR-Effizienz am Beispiel von *gapdh*. Es wurde eine Verdünnungsreihe einer cDNA-Probe erstellt (Verdünnungsschritte jeweils 1:4) und mittels qPCR und Einsatz der *gapdh*-Primer (Tab. 2.15) amplifiziert. A: Dekadischer Logarithmus der normalisierten Fluoreszenzintensität gegen den qPCR-Zyklus. Zur Bestimmung des „*threshold cycle*“ (Ct) wurde der Schwellenwert (*threshold*) auf 0,1 gesetzt (rote Linie). B: Ct-Werte in Abhängigkeit des dekadischen Logarithmus der Konzentration mit linearer Regressionsgerade (Bestimmtheitsmaß (B) > 0,99).

Formel 3 $$E = 10^{-1/b}$$

2.10.11 Methodische Kontrollen bei der qPCR

Bei der Reversen Transkription wurden stichprobenartig NTC-Kontrollen (*no template control*) durchgeführt, bei denen keine Probe zugegeben wurde. Dadurch konnte festgestellt werden, ob sich in der qPCR Primer-Dimere bilden und ob die benutzen Lösungen und Chemikalien mit DNA kontaminiert sind. Außerdem wurden stichprobenartig RT-Kontrollen durchgeführt, bei denen keine Reverse Transkriptase zugegeben wurde. Durch diese Negativkontrolle kann feststellt werden, ob nach der Verdauungsreaktion mit DNAse I (Kap. 2.10.5) noch genomische DNA in den Proben vorhanden ist, da die verwendeten Primer auch an den entsprechenden Stellen der Zielgene an der DNA hybridisieren können. Außerdem wurde je qPCR-Lauf eine DEPC-Kontrolle mitgemessen, die anstatt cDNA-Probe DEPC-Bidest enthielt. Durch die DEPC-Kontrollen konnte ausgeschlossen werden, dass im Mastermix DNA-Kontaminationen vorhanden waren. Bei postitiv getesteten Negativ-Kontrollen wurden entsprechende Lösungen ausgetauscht, bzw. die Messungen aus der Auswertung ausgeschlossen.

2.11 Radioimmunassays

Ein Radioimmunassay (RIA) ist eine Methode zur zuverlässigen und spezifischen Quantifizierung kleinster Substanzmengen (Proteine, Hormone usw.) in einer Probe. Voraussetzung dafür ist die Verfügbarkeit eines Antigens in aufgereinigter Form und des entsprechenden spezifischen Antikörpers. Dabei wird das zu messende Antigen zusammen mit einer bekannten Menge des radioaktiv markierten Antigens (Tracer) mit einer begrenzten Menge spezifischer Antikörper

inkubiert. Antigen und Tracer sind im Bindungsverhalten gleich und werden somit kompetitiv von den Antikörpern gebunden. Da die Anzahl an Bindungsplätzen begrenzt ist, werden weniger Tracer-Antigene gebunden, desto mehr Antigene in der zu messenden Probe vorhanden sind. Nach einer Trennung von gebundenen und ungebundenen Antigenen wird die gebundene Radioaktivität im Gammaprobenwechsler bestimmt und mittels einer Eichkurve auf die gesuchte Antigenkonzentration in der Probe geschlossen.

2.11.1 Bestimmung der Ependymin-Konzentration

Um die Ependymin-Konzentration mittels Ependymin-RIA zu bestimmen, musste Ependymin zunächst aufgereinigt werden (Kap. 2.6). Das aufgereinigte Ependymin wurde sowohl als Standard zur Erstellung einer Eichkurve als auch zur radioaktiven Markierung nach Bolton und Hunter zur Herstellung des Tracers verwendet. Für die radioaktive Markierung und der Durchführung der RIAs wurden die in Tab. 2.17 aufgelisteten Puffer und Lösungen benötigt.

Tab. 2.17: Puffer und Lösungen mit den jeweiligen Inhaltsstoffen für die Vorbereitung und Durchführung der Ependymin-RIAs.

Lösung	Inhaltsstoffe
Natrium-Phosphatpuffer	0,1 M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 (pH 8,5), in A. Bidest
Glycin-Lösung	0,2 M Glycin, 0,1 M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 (pH 8,5), in A. Bidest
Elutionspuffer	0,15 % (w/v) Gelatine, 0,1 M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 (pH 8,5), in A. Bidest
PGB-Puffer	0,15 % (w/v) Gelatine, 0,05 M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 (pH 8,5), in A. Bidest

2.11.1.1 Radioaktive [^{125}I]-Markierung von EPDγ nach Bolton und Hunter

Zur radioaktiven Markierung von EPDγ wurde die Methode nach BOLTON & HUNTER (1973) angewandt. Hierbei wird das Protein mit dem [^{125}I]-markierten Bolton-Hunter-Reagenz (BHR; N-Succinimidyl-3-(4-hydroxy-3[^{125}I]-iodophenyl)-propionat) markiert, das kovalent an N-terminalen Aminogruppen und an der ε-Aminogruppe von Lysinen in Peptiden bindet. Vor der Markierung wurde das Phenol, in dem das BHR (1 mCi, 4400 Ci/mmol) gelöst war, unter leichtem Stickstoff-Druck und angeschlossener [^{125}I]-Falle, evaporiert. Anschließend wurde für die Markierungsreaktion 75 µg (1 µg/µl) in Natrium-Phosphatpuffer (0,1 M, pH 8,5; Tab. 2.17) gelöstes EPDγ (Kap. 2.6.4) bei Raumtemperatur mit Hilfe einer 100 µl Mikroliter-Spritze (Hamilton) zu dem getrockneten Bolton-Hunter-Reagenz gegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 40 min bei 0 °C und anschließend eine Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde daraufhin durch Zugabe von 500 µl Glycin-Lösung (Tab. 2.17) abgestoppt. Anschließend wurde das Gefäß 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Über eine Gelfiltration mit einer PD-10 Einwegsäule (mit 8,3 ml Sephadex G-25 Medium) wurde das markierte Protein vom [^{125}I]-

Glycin und freien BHR getrennt und mit Elutionspuffer in 500 µl Fraktionen eluiert. Die Radioaktivität jeder Fraktion wurde anschließend im Gammaprobenwechsler (Wallac Wizard 1480 3"; PerkinElmer) gemessen und eine Elutionskurve (Abb. 2.5) erstellt, um die [^{125}I]-EPDγ enthaltenden Fraktionen zu identifizieren. Diese Fraktionen wurden vereint und mithilfe der Radioaktivität (A), des Molekulargewichts (MW) und der Masse (m) die spezifische Aktivität (S) berechnet (Formel 4). Es wurden spezifische Aktivitäten von 1,99475*10^{15} Bq/mol und 1,61317*10^{16} Bq/mol ([^{125}I]-EPDγ) in zwei unabhängigen Markierungsreaktionen erreicht.

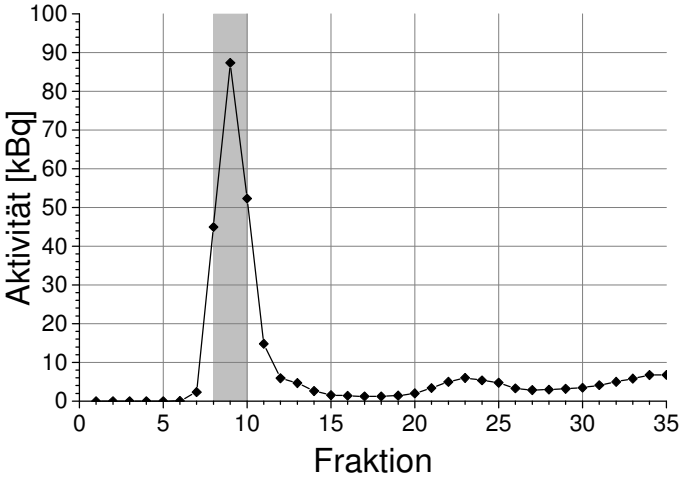


Abb. 2.5: Beispiel eines Elutionsprofils mit einer PD-10 Einwegsäule nach radioaktiver [^{125}I]-Markierung von EPDγ nach Bolton und Hunter. Die PD-10 Säulen enthalten Sephadex G-25 Medium. Zuerst kommt es zur Elution von [^{125}I]-EPDγ (Fraktion 8-10; grauer Bereich). Anschließend wird [^{125}I]-Glycin und freies Bolton-Hunter Reagenz eluiert (Fraktion 20-26). Die Messung der Fraktionen erfolgte im Gammaprobenwechsler (Wallac Wizard 1480 3"; PerkinElmer).

Formel 4

$$S\,[\mathrm{Bq/mol}] = \frac{A\,[\mathrm{Bq}] \times MW\,[\frac{g}{mol}]}{m\,[g]}$$

2.11.1.2 Lyse der meningealen Primärkulturen mit RIPA-Puffer

Um die Ependymin-Expression der meningealen Primärkulturen mittels Ependymin-RIA zu bestimmen, wurde zunächst das Medium aus den Zellkultur-Multischalen entnommen und zur Bestimmung der Ependymin-Konzentration im Medium in 2 ml Reaktionsgefäße auf *crushed ice* überführt. Die Zellen wurden anschließend mit HBSS(+) (mit Calcium und Magnesium) gewaschen und mit 200 µl RIPA-Puffer (nach Herstellerangaben mit 1:100 Phenylmethylsulfonyl-fluorid (PMSF)-Lösung, 1:100 Natriumorthovanadat-Lösung und 1:100 Proteaseinhibitor-Cocktail versetzt; Santa Cruz) pro Kultur lysiert, mit einem Zellschaber vollständig vom Boden gelöst und mit einer Mikroliterpipette 30 s resuspendiert. Die lysierten Zellen wurden dann in 1,5 ml Reaktionsgefäße auf *crushed ice* überführt und bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration (Kap. 2.6.5) und der Ependymin-RIAs (Kap. 2.11.1.3) bei -80 °C eingefroren.

2.11.1.3 Durchführung der Ependymin-RIAs

Zur Durchführung der Ependymin-RIAs wurde jeweils 1 ml einer Antikörperlösung (Verdünnung: 1:34000 in PGB-Puffer; Tab. 2.17) gegen EPDβ (Beteigeuze; Kap. 2.3; Tab. 2.8) in Reagenzröhrchen (3 ml, 75 x 10 mm, aus PP) gegeben, welches auch volle Kreuzreaktivität

gegenüber EPDγ aufweist (Schmidt *and* Shashoua, 1983). Zur Erstellung einer Eichkurve wurde eine Verdünnungsreihe aus 13 verschiedenen Standards mit 1000–0,24 ng EPDγ aus Kap. 2.6.4 (jeweils 1:2 Verdünnungsschritte) in Duplikaten angesetzt. Von den Proben, deren Ependymin-Konzentration bestimmt werden sollte, wurden 100 µl in die jeweiligen Reagenzröhrchen gegeben. Diese wurden vorher durch eine fünfminütige Inkubation bei 95 °C denaturiert, da das verwendete Antiserum gegen denaturiertes EPDβ hergestellt wurde. Die RIA-Ansätze wurden kurz gevortext und inkubierten anschließend für 1 h bei 37 °C im schüttelnden Inkubationsbad (Typ: 1083; GFL). Danach wurde in jedem Ansatz 2 ng radioaktives [^{125}I]-EPDγ (Kap. 2.11.1.1) zugegeben. Nach kurzem Vortexen inkubierten die RIA-Ansätze schüttelnd für 1 h bei 37 °C und anschließend über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag wurde in jedem RIA-Ansatz 100 µl der 1:15 verdünnten Zweitantikörper-Stammlösung (Ziegen anti-Kaninchen IgG; 250er Testpackung; in 5 ml PBS (*phosphate buffered saline*) gelöst; Kap. 2.3, Tab. 2.9) gegeben und erneut kurz gevortext. Anschließend inkubierten die Ansätze schüttelnd 1 h bei 37 °C und 7 h bei 4 °C. Um die Antikörper-gebundene Aktivität zu präzipitieren, wurden 75 µl eines neutralen Kaninchenserums in jedem RIA-Ansatz gegeben. Nach kurzem Vortexen inkubierten die RIA-Ansätze erneut schüttelnd 1 h bei 37 °C und über Nacht bei 4 °C. Das Präzipitat wurde anschließend durch Zentrifugation (Multifuge 3 S-R; Heraeus) für 30 min bei 2000 xg pelletiert, der Überstand mit der nicht gebundenen Radioaktivität dekantiert und der Rand der Reagenzröhrchen mit Zellstoff getrocknet. Alle Reagenzröhrchen wurden nun mit Eindrucksstopfen verschlossen und die Radioaktivität im Gammaprobenwechsler (Wallac Wizard 1480 3''; PerkinElmer) gemessen bis 10.000 Zerfälle (relativer Fehler von 1 %) registriert wurden. Um bei der späteren Auswertung die prozentuale Bindung des Tracers (%-Bindung) zu berechnen (Kap. 2.12.2, Formel 8), wurde in vier weiteren Probenröhrchen die eingesetzte Aktivität („Total“) gemessen.

2.11.2 Bestimmung der Cortisol-Konzentration mittels Cortisol-RIA

Im Kap. 2.8.1 wurden Experimente beschrieben, in denen der Einfluss von Glucocorticoiden (Cortisol und Corticosteron) auf die Expression von Ependymin in meningealen Primärkulturen untersucht wurde. Um nach Zugabe des Cortisols die Cortisol-Konzentration im Medium zu überprüfen, wurde ein kommerziell erhältlicher Cortisol-RIA-Kit (Demeditec Diagnostics; Kap. 2.2, Tab. 2.7) verwendet, der ursprünglich für die Bestimmung von Cortisol im menschlichen Serum konzipiert wurde. Es beinhaltet polyklonales anti-Cortisol Antiserum aus Kaninchen, Reagenzröhrchen (12 x 75 mm) die durch eine spezielle Beschichtung die IgGs im Antiserum binden, eine Tracer-Lösung mit radioaktiv markiertem [^{125}I]-Cortisol und sechs Cortisol-Standards (0, 40, 100, 250, 650 und 1.600 nmol/l) die in humanem Serum gelöst sind. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers, allerdings wurde die Standardreihe aufgrund der hohen

zu messenden Cortisol-Konzentration im Medium entsprechend erweitert (4.000, 12.000 und 30.000 nmol/l). Die Standards zur Erstellung der Eichkurve wurden als Duplikate angesetzt, die unbekannten Proben und der externe Standard als Triplikate. Die gebundene Aktivität wurde im Gammaprobenwechsler (Wallac Wizard 1480 3"; PerkinElmer) gemessen bis 10.000 Zerfälle (relativer Fehler von 1 %) registriert wurden. Um bei der späteren Auswertung die prozentuale Bindung des Tracers (%-Bindung) zu berechnen (Kap. 2.12.2, Formel 8), wurde in vier weiteren Probenröhrchen die eingesetzte Aktivität („Total“) gemessen.

2.12 Auswertung und statistische Methoden

Nach Abschluss der Datenerhebung wurden von den jeweiligen Messwerten (Ct-Werte bei RT-qPCR und %-Bindung bei RIA) mit dem Programm Microsoft Excel (Microsoft) Mittelwert ($\bar{x}$), Standardabweichung (σ_x) und Standardfehler (SEM; s*tandard error of the mean*) berechnet.

2.12.1 Auswertung der RT-qPCR-Studien

Die Auswertung der Daten aus den RT-qPCR-Studien, wurde mit einem erweiterten mathematischen Modell nach PFAFFL (2001) vorgenommen, bei dem unter Berücksichtigung der qPCR-Effizienz (E) (Kap. 2.10.10; Anhang Tab. 7.1) eine relative Quantifizierung des mRNA-Verhältnisses (*ratio*; R) der Zielgene erzielt wird (Formel 5). Von jeder Primärkultur wurde der Ct-Wert in Triplikaten gemessen und ein Mittelwert gebildet. Ausreißer wurden mittels Nalimov-Test (Kap. 2.12.2) bestimmt und ausgeschlossen. Um die Inter-Assay-Variabilität der qPCR auszugleichen (Vergleich von Proben unterschiedlicher qPCR-Ansätze), wurde die Differenz des Ct-Werts (ΔCt) des jeweiligen Gens (*epd1*, *epd2*, *l1-e587, gapdh* oder *actb*) mit dem einer Kalibrator-cDNA (Kalibrator) gebildet. Der Kalibrator stellt damit einen externen Standard dar, der aus einer Mischung von 30 verschiedenen cDNA-Proben aus acht Tage alten unbehandelten Zellkulturen hergestellt und in Triplikaten mitgemessen wurde.

Formel 5

$$\mathrm{R_{Gen}} = \mathrm{E_{Gen}}^{\Delta \mathrm{Ct_{Gen}}\,(\mathrm{Kalibrator} - \mathrm{Probe})}$$

Weiterhin wurden die mRNA-Verhältnisse der einzelnen Zielgene ($R_{Zielgen}$) e*pd1*, *epd2* und *l1-e587* unter Verwendung von Formel 6 auf die mRNA-Verhältnisse der Referenzgene (R_{gapdh} und R_{actb}) normalisiert.

Formel 6

$$\mathrm{R_{norm}} = \frac{\mathrm{R_{Zielgen}} \times 2}{\mathrm{R}_{gapdh} + \mathrm{R}_{actb}}$$

Um zu beurteilen, ob die verwendeten Referenzgene zur Normalisierung geeignet sind, wurde das mRNA-Verhältnis der Referenzgene (R_{gapdh} und R_{actb}) im Zeitverlauf nach Formel 5 bestimmt (Anhang Tab. 7.3). Weiterhin wurde das mRNA-Verhältnis der Referenzgene nach der jeweiligen Behandlung (z. B. nach Zugabe von Cortisol) nach Formel 10 (Kap. 2.12.3) berechnet (Anhang Tab. 7.6, Anhang Tab. 7.8 und Anhang Tab. 7.10).

2.12.2 Auswertung der Radioimmunassays

Die gemessenen Radioaktivitäten (A) der Ependymin- und Cortisol-RIAs (Kap. 2.11.1.3 und Kap. 2.11.2) wurden statistisch ausgewertet. Es wurde zunächst eine Zerfallskorrektur durchgeführt, um die nach einer bestimmten Zeit gemessene Radioaktivität A(t) auf die Radioaktivität beim Startpunkt der Messung A_0 zurück zu rechnen. Dafür wurde das Zerfallsgesetz nach A_0 aufgelöst (Formel 7) und die Zerfallskonstante für ^{125}I ($\lambda = 0{,}011676$) sowie die verstrichene Zeit (t) eingesetzt.

Formel 7

$$A_0 = \frac{A(t)}{e^{-\lambda t}}$$

Anhand der korrigierten Messwerte wurde für jeden RIA-Ansatz die prozentuale Bindung (%-Bindung) der Radioaktivität (A) nach Formel 8 berechnet.

Formel 8

$$\%\text{-Bindung} = \frac{A_{gebunden}}{A_{total}} \times 100$$

Die Triplikat-Messungen jeder experimentellen Probe wurden gemittelt, wobei Ausreißer mittels Nalimov-Test (Kap. 2.12.4) ausgeschlossen wurden. Mit dem Programm Origin 9.1 (OriginLab Corporation) wurden die bekannten Konzentrationen der Standards gegen die %-Bindung aufgetragen. Durch Approximation einer linearen Funktion (Ependymin-RIA) bzw. einer polynomischen Funktion (Cortisol-RIA) wurde eine Standardkurve erstellt (Abb. 2.6) und mit Hilfe der ermittelten Formelgleichung die Konzentration der unbekannten Proben berechnet. Um die ermittelten Konzentrationen unterschiedlicher RIA-Ansätze gemeinsam auswerten zu können, wurde die Interassay Varianz herausgerechnet. Dazu wurden die ermittelten Konzentrationen (x_i), durch den externen Standard des jeweiligen Ansatzes (E_i) geteilt und mit dem Mittelwert aller externen Standards ($\bar{E}$) multipliziert (Formel 9).

Formel 9

$$x_{korrigiert} = x_i \times \frac{\bar{E}}{E_i}$$

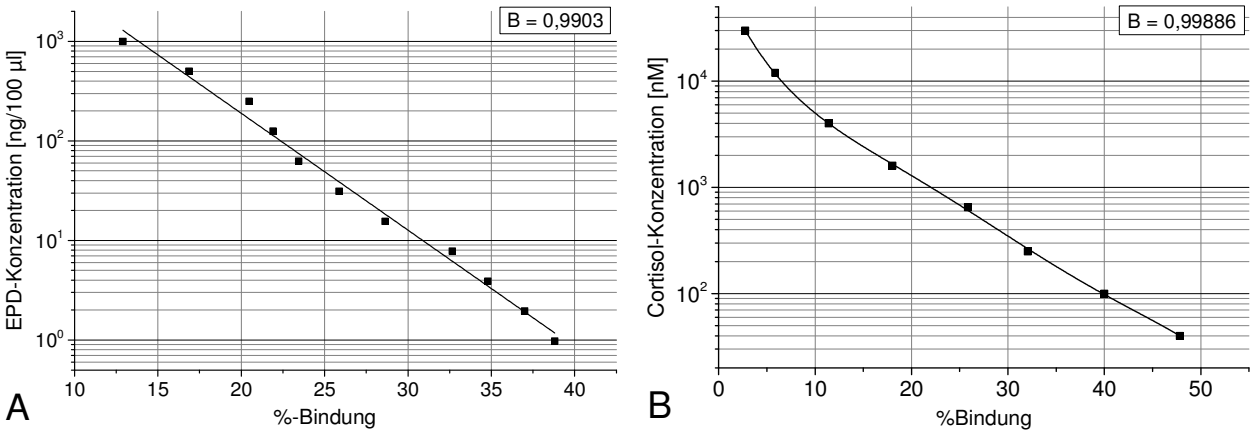


Abb. 2.6: Typische Standardkurven zur Ermittlung der Ependymin und Cortisol-Konzentrationen mittels RIA. Die Prozentuale Bindung (%-Bindung) ist auf der Abszisse und die entsprechende Konzentration auf der Ordinate aufgetragen. **A:** Standardkurve eines Ependymin-RIAs (Kap. 2.11.1.3). Zur Berechnung der Ependymin-Konzentrationen der unbekannten Proben wurde eine lineare Funktion an die Werte der Standards approximiert. **B:** Standardkurve eines Cortisol-RIAs (Kap. 2.11.2). Zur Berechnung der Cortisol-Konzentrationen im Zellkulturmedium wurde eine polynomische Funktion fünften Grades (Bestimmtheitsmaß (B) > 0,99) an die Werte der Standards approximiert. Bestimmtheitsmaß (B) > 0,99.

2.12.3 Auswertung der Expressionsstudien nach verschiedenen Behandlungen

Die Untersuchung des Einflusses verschiedener Substanzen auf die Ependymin-Expression (Kap. 2.8) wurde dadurch erschwert, dass zwischen Kulturen verschiedener Präparationen, sowohl das Ependymin-mRNA-Verhältnis (RT-qPCR) als auch die Ependymin-Konzentration (Radioimmunassay), stark variiert. Aus diesem Grund wurden die mRNA-Verhältnisse von jeweils drei behandelten Kulturen ($R_{behandelt}$) der gleichen Präparation gemittelt und unter Anwendung von Formel 10 auf den Mittelwert von drei scheinbehandelten Kontroll-Kulturen (R_{mock}) normalisiert. Ausreißer wurden vorher mittels Nalimov-Test (Kap. 2.12.4) aus der Mittelwertbildung ausgeschlossen. Das dadurch ermittelte mRNA-Verhältnis einer behandelten biologischen Probe (R_{biol}), ermöglichte einen Vergleich unabhängiger Experimente aus unterschiedlichen Kulturpräparationen.

Formel 10

$$R_{biol} = \frac{R_{behandelt}}{R_{mock}}$$

2.12.4 Hypothesentests

Um statistische Aussagen über die erhobenen Daten zu machen, wurden verschiedene Hypothesentests durchgeführt. Dabei werden Nullhypothesen (H_0) aufgestellt und anhand der erhobenen Daten die Irrtumswahrscheinlichkeit in Form eines Signifikanzniveaus (p-Wert) angegeben.

Zur Eliminierung von Ausreißer-Werten bei Triplikat-Messungen in normalverteilten Stichproben (CT-Werte bei RT-qPCR und %-Bindung bei Radioimmunassay), wurde der Nalimov-Test (Ausreißertest nach Nalimov; Formel 11) angewandt (KAISER & GOTTSCHALK, 1972). Dafür wurden Messwerte aus der Bildung des Mittelwerts eliminiert, die eine kritische Grenze für das gegebene Signifikanzniveau ($\alpha \leq 0{,}05$) der entsprechenden Freiheitsgrade f ($f = n-2$) überschreiten.

Formel 11

$$q = \left|\frac{x_1 - \bar{x}}{\sigma_x}\right| \times \sqrt{\frac{n}{n-1}}$$

Alle weiteren Hypothesentests wurden mit dem Programm Prism 6 (GraphPad Software) durchgeführt. Als Voraussetzung zur Anwendung geeigneter statistischer Methoden, wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test angewandt, um die intervall- oder verhältnisskalierten Variablen auf Normalverteilung hin zu überprüfen. Dabei wird die Hypothese einer Normalverteilung angenommen, wenn $p > 0{,}05$ (95 % Signifikanzniveau) ist. Da die erhobenen Datensätze der Expressionsstudien (mRNA-Verhältnisse bei RT-qPCR und Konzentration bei Radioimmunassay) lognormalen Verteilungen entsprechen, wurden sie für die Hypothesentests durch logarithmische Funktionen in normalverteilte Daten transformiert. Für die mRNA-Verhältnisse aus RT-qPCR-Experimenten wurde dazu Formel 12 und für die gemessenen Konzentrationen mittels Radioimmunassay Formel 13 angewandt. Bei allen Datensätzen ($n \geq 5$) konnte auf diese Weise nach einem Kolmogorov-Smirnov-Test die N_0 einer Normalverteilung mit $p > 0{,}1$ beibehalten werden, wodurch im weiteren Verlauf parametrische Hypothesentests auf die transformierten Daten angewendet werden konnten.

Formel 12

$$f(x) = \frac{\ln(x)}{\ln(2)}$$

Formel 13

$$f(x) = \log_{10}(x)$$

Da bei der Untersuchung des Einflusses von Substanzen auf die Ependymin-Expression (Kap. 2.8), eine Normalisierung auf die unbehandelten Gruppen (Kontrollen) durchgeführt wurde, konnte kein Test zur Überprüfung einer statistischen Signifikanz zwischen behandelten und unbehandelten Gruppen erfolgen (Kap. 2.12.3). Daher wurde der Einstichproben-t-Test angewendet, der anhand eines Mittelwerts einer Stichprobe prüft, ob der Mittelwert einer Grundgesamtheit sich von einem theoretischen Mittewert der Kontrollen (Kontrolle = 0,0; transformierter Wert) unterscheidet. Ein signifikanter Mittelwertunterschied ist gegeben, wenn $p \leq 0{,}05$ (95 % Signifikanzniveau).

Weiterhin wurden die unterschiedlich behandelten Gruppen untereinander auf signifikante Unterscheide getestet. Zur Überprüfung ob sich Stichprobenvarianzen signifikant voneinander unterscheiden, wurde ein F-Test (Vergleich von zwei Gruppen) bzw. ein Brown-Forsynthe-Test (Vergleich von ≥ 3 Gruppen) durchgeführt. Ein signifikanter Varianzunterschied ist gegeben, wenn $p \leq 0,05$ entspricht (95 % Signifikanzniveau). Bei diesen Tests konnte zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied in der Varianz nachgewiesen werden. Um zu prüfen, ob sich die Mittelwerte zweier Stichproben signifikant voneinander unterscheiden, wurde der Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Ein signifikanter Mittelwertunterschied ist gegeben, wenn $p \leq 0,05$ (95 % Signifikanzniveau) entspricht. Bei einem Vergleich von drei oder mehr Gruppen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) angewandt mit anschließendem Post-hoc-Test (Tukey-Test bzw. Holm-Sidak-Test). Auch hier ist ein signifikanter Mittelwertunterschied gegeben, wenn $p \leq 0,05$ entspricht (95 % Signifikanzniveau).

3 ERGEBNISSE

Zielsetzung dieser Arbeit war es, den Einfluss von Glucocorticoiden *in vitro* auf die Ependymin (EPD)-Expression meningealer Zellen zu untersuchen. Dafür wurde zunächst ein geeignetes Präparations- und Kultivierungsverfahren etabliert, mit dem Ependymin-exprimierende Zellen aus der Meninx (Hirnhaut) von Goldfischen isoliert und in Zellkultur gehalten werden können (Kap. 2.7). Anschließend wurden die vorhandenen Zellen in den Primärkulturen klassifiziert (Kap. 3.1) und die Zeitverläufe zur Ependymin-Expression auf mRNA- (mittels RT-qPCR) und Proteinebene (mittels Radioimmunassay) untersucht (Kap. 3.2). Schließlich wurde der Einfluss von Glucocorticoiden, Glucocorticoidrezeptor-Antagonisten, Antiseren und aufgereinigten Ependymin-Proben auf die Ependymin-Expression kultivierter meningealer Zellen analysiert (Kap. 3.3).

3.1 Klassifizierung und immuncytochemische Untersuchung meningealer Zellen

Ziel des Kultivierungsverfahrens war die Isolierung und Kultivierung von Zellen der inneren meningealen Schicht, da *in vivo* nur bei diesen Zellen eine Ependymin-Expression nachgewiesen werden konnte (Kap. 1.1.2). Nach der Etablierung des Kultivierungsverfahrens, wurde untersucht, ob Ependymin-exprimierende Zellen in den Primärkulturen vorhanden sind und welche Zelltypen dieses Zelladhäsionsmolekül exprimieren. Damit stellte die Klassifizierung der in den Primärkulturen enthaltenden Zellen eine wichtige Grundlage für die Genexpressionsanalysen in Kap. 3.3 dar. Im Hinblick darauf wurden die Ependymin-exprimierenden Zelltypen nach Immunfluoreszenz (IF)-Markierung von Ependymin (α-EPD Antiserum) morphologisch beschrieben. Zur Identifizierung der unterschiedlichen Zelltypen wurden die Zellen mittels IF-Markierungen durch verschiedene Zelltypmarker immuncytochemisch analysiert. Es wurden Antiseren (bzw. monoklonale Antikörper) gegen das saure Gliafaserprotein (α-GFAP; Zelltypmarker für Gliazellen), Fibronektin (α-FN15; Zelltypmarker für Fibroblasten), Vimentin (α-VIM; Zelltypmarker für mesenchymale Zellen) und Parvalbumin (α-PVALB; Zelltypmarker für Neurone) verwendet.

Durch die α-EPD-Markierung konnten bei acht Tage alten Kulturen nahezu alle Zellen umfassend angefärbt werden, sodass Zellgrenzen und sehr feine Strukturen zu erkennen waren. Weiterhin konnten charakteristische Markierungsmuster bei unterschiedlichen Zelltypen beobachtet werden, sodass sich diese Markierung zur morphologischen Klassifizierung der Zellen sehr gut eignete. Da Ependymin sekretiert wird und es als Zelladhäsionsmolekül verschiedene Moleküle an Zelloberflächen bindet, weist eine EPD-Markierung nicht unbedingt auf eine Synthese in den

entsprechenden Zellen hin. ROTHER *ET AL.* (1995) berichteten jedoch, dass sich Ependymin-exprimierende Zellen durch eine intensive granuläre Immunmarkierung in exzentrischer Anordnung um die Nuclei auszeichnen. Dadurch konnten die Zellen in vier verschiedene Ependymin-exprimierende Zelltypen eingeteilt werden, die sich eindeutig in ihrer Morphologie unterscheiden (Abb. 3.1).

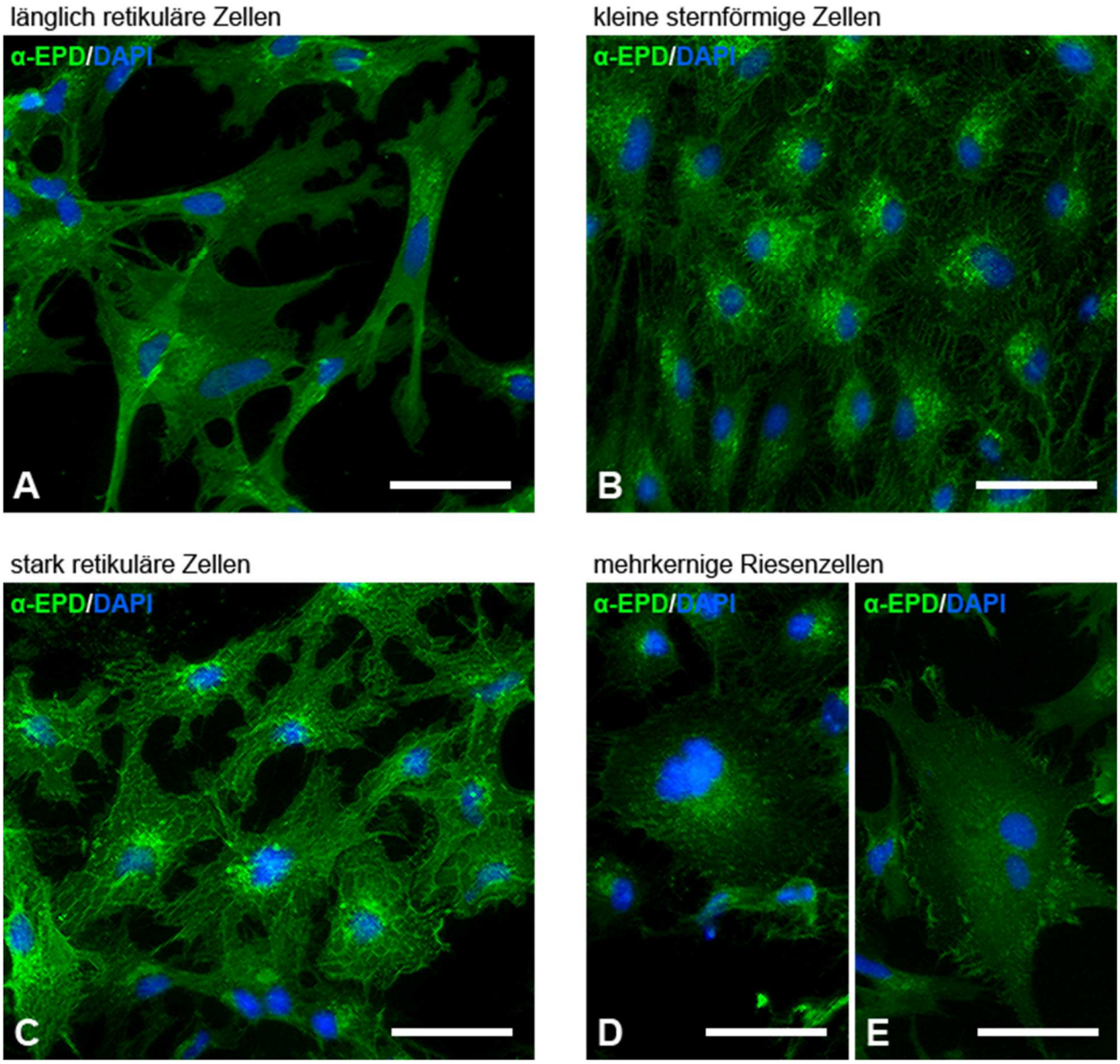


Abb. 3.1: Morphologische Klassifizierung Ependymin-positiver Zellen in meningealen Primärkulturen. Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen meningealer Primärkulturen (acht Tage nach der Präparation) von Goldfischen nach IF-Markierung mittels α-EPD/Alexa Fluor 488 (grün). Die Nuclei wurden mittels DAPI-Färbung (blau) markiert. Es konnten verschiedene Ependymin-positive Zellen mit unterschiedlichen Morphologien nachgewiesen werden. Ependymin-exprimierende Zellen weisen meist eine intensive Markierung um die Nuclei auf. **A:** Länglich-retikuläre Zellen mit lamellenförmigen Ausläufern und einheitlicher Immunfärbung. **B:** Kleine sternförmige Zellen mit feinen Filopodien-artigen Ausläufern. **C:** Stark-retikuläre Zellen mit netzartig gemusterter Ependymin-Markierung und stark verzweigten Zellgrenzen. **D-E:** Mehrkernige Riesenzellen mit meist zwei bis drei Zellkernen. Messbalken = 50 µm.

In der Abb. 3.2 (Primärmarkierung mit α-EPD) und der Abb. 3.3 (Primärmarkierung mit α-GFAP) werden für die in Abb. 3.1 dargestellten Ependymin-positiven Zelltypen repräsentative Beispiele der durchgeführten Immunmarkierungen dargestellt. Im Folgenden werden neben den morphologischen Beschreibungen der Zelltypen auch die Immunreaktivitäten zu den verwendeten Zelltypmarkern angegeben. Der prozentuale Anteil (angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung) der in den Kulturen vorkommenden Zellen wurde durch Zellzählung ermittelt. Dafür wurden fünf verschiedene, zufällig ausgewählte mikroskopische Bildausschnitte von fünf Kulturen aus unterschiedlichen Präparationen ausgewertet. Zellen deren Zugehörigkeit nicht erkannt werden konnte, wurden aus der Zählung ausgeschlossen.

Länglich-retikuläre Zellen (in den Abb. 3.2, Abb. 3.3 und Abb. 3.15, mit weißen Pfeilen markiert) haben eine längliche Form und besitzen zwei netzförmige Zellpole mit lamellenförmigen Ausläufern die sich meist fächerförmig ausbreiten. Zwischen den netzförmigen Zellpolen sind geradlinige oder rundliche Bereiche vorhanden. Sie besitzen außerdem einen ovalen Zellkern und werden durch eine EPD-Markierung sehr glatt und einheitlich angefärbt (Abb. 3.2-A). Sie sind mit einem Gesamtanteil von 45,7 ± 7,6 % die am häufigsten vorkommenden EPD-positiven Zellen. Länglich-retikuläre Zellen weisen eine Fibronektin-Immunreaktivität auf, wie in Abb. 3.2-A2 und Abb. 3.2-B zu erkennen ist. Besonders an großen Zellaggregationen findet man sehr intensive Markierungen (Abb. 3.2-A1). Die Fibronektin-Markierung ist bei diesen Zellen nicht homogen verteilt, sondern kommt fleckenartig mit lokaler und scharf abgegrenzter Konzentrierung vor (Abb. 3.2-A2). Vimentin- (Abb. 3.2-D1), GFAP- (Abb. 3.3-A1) und Parvalbumin-Immunreaktivitäten (Abb. 3.2-E1 und Abb. 3.2-E2) waren hingegen bei diesen Zellen nicht nachzuweisen.

Kleine sternförmige Zellen (in den Abb. 3.2, Abb. 3.3 und Abb. 3.15 mit „*“ markiert) besitzen einen runden Zellkern und viele dünne, radiär verlaufende Filopodien-artige Ausläufer, die ihnen ihre sternförmige Gestalt verleihen. Sie bilden oft dichte und homogene Zellaggregationen und stehen mit ihren Ausläufern im Kontakt mit gleichartigen Nachbarzellen (Abb. 3.2-B). An peripheren Bereichen dieser Aggregationen bilden sie meist längere Ausläufer als im Zentrum (Abb. 3.2-C). Mit einem Gesamtanteil von 22,5 ± 9,1 % kommen diese Zellen weniger häufig vor. Kleine sternförmige Zellen weisen im Gegensatz zu den länglich-retikulären Zellen keine Fibronektin-Immunreaktivität auf (Abb. 3.2-A3), sind aber positiv für Vimentin (Abb. 3.2-C2). Dieses Intermediärfilament ist überwiegend an peripheren Bereichen kleiner sternförmiger Zellen zu finden, wobei die Filopodien-artigen Ausläufer oft sehr intensiv gefärbt sind. Zusätzlich sind diese Zellen positiv für GFAP, das mit Vimentin kolokalisiert vorliegt (Abb. 3.3-B1). Weiterhin ist zu erwähnen, dass bei diesen Zellen keine Parvalbumin-Immunreaktivität nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt).

Stark-retikuläre Zellen (in den Abb. 3.2, Abb. 3.3 und Abb. 3.15 mit „#“ markiert) kennzeichnen sich durch allseitig vorhandene lamellenförmige Ausläufer aus, die ihnen eine netzförmige Morphologie verleihen. Die EPD-Immunmarkierung weist bei diesen Zellen ein charakteristisch verzweigtes Muster auf. Sie kommen mit einem Gesamtanteil von 27,4 ± 10,3 % am zweithäufigsten vor und weisen von allen Zelltypen die intensivsten Ependymin-Immunmarkierungen auf (Abb. 3.2-C). Stark-retikuläre Zellen zeigten keine Immunreaktivität für Fibronektin (α-FN15; Abb. 3.2-B1), Vimentin (α-VIM; Abb. 3.2-C1), GFAP und Parvalbumin (nicht gezeigt).

Mehrkernige Riesenzellen (in den Abb. 3.2, Abb. 3.3 und Abb. 3.15 mit „r“ markiert) sind sehr große und meist sphärische Zellen mit mehreren Zellkernen (bis zu acht Zellkerne wurden beobachtet). Sie sind den kleinen sternförmigen Zellen bis auf ihre Größe und Mehrkernigkeit morphologisch sehr ähnlich und bilden wie diese Filopodien-artige Ausläufer aus. Mit einem Gesamtanteil von 0,6 ± 0,4 % kommen sie relativ selten vor (Abb. 3.2-D und E). Mehrkernige Riesenzellen haben neben ihrer morphologischen Ähnlichkeit zu den kleinen sternenförmigen Zellen auch vergleichbare immuncytochemische Eigenschaften. Sie weisen ebenso kolokalisierte GFAP- und Vimentin-Immunreaktivitäten auf (Abb. 3.3-B), sind jedoch negativ für Fibronektin (Abb. 3.3-A) und Parvalbumin (nicht gezeigt).

Zusätzlich konnten Zellen nachgewiesen werden, die aller Wahrscheinlichkeit nach Neurone (in den Abb. 3.2, Abb. 3.3 und Abb. 3.15 mit „n“ markiert) sind. Diese machten einen Anteil von 3,9 ± 3,5 % aus. Diese Zellen wurden aufgrund ihrer länglichen Morphologie und der Parvalbumin-Immunreaktivität (Abb. 3.2-E2, Abb. 3.3-C1 und D1) als Neurone klassifiziert. Sie sind meist klein und schmal geformt und werden durch eine Ependymin-Markierung nur schwach angefärbt (Abb. 3.2-E2). Manche dieser Parvalbumin-positiven Zellen haben eine Pyramidenform und weisen zusätzlich eine GFAP-Immunreaktivität auf (Abb. 3.3-C1, rechts). Andere Parvalbumin-positive Zellen sind jedoch negativ für GFAP (Abb. 3.3-D1, links und Abb. 3.3-E1).

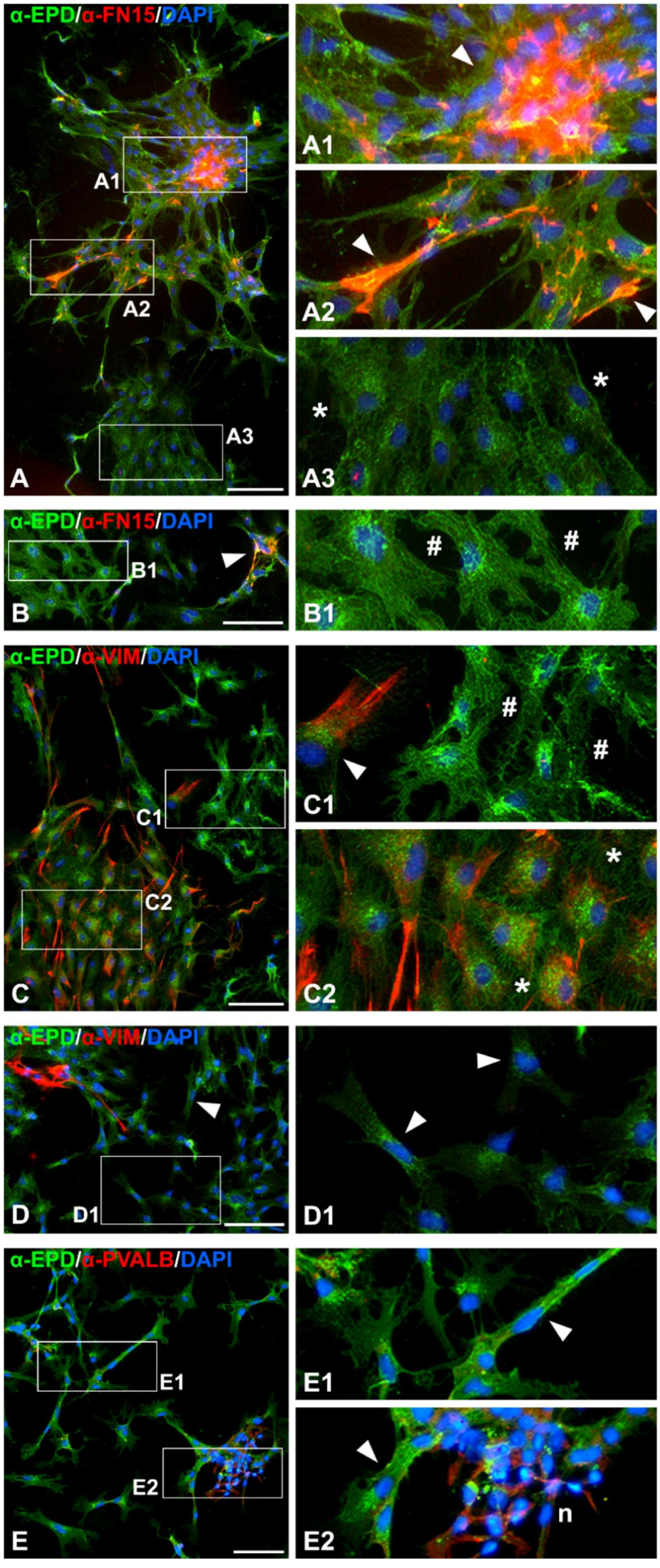


Abb. 3.2: Immunmarkierungen verschiedener Zelltypmarker bei Ependymin-positiven Zellen in meningealen Primärkulturen. Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen meningealer Primärkulturen (acht Tage nach der Präparation) von Goldfischen bei denen mittels IF-Markierung Ependymin (α-EPD; grün) und jeweils ein Zelltypmarker (α-FN15, α-VIM oder α-PVALB; rot) markiert wurde. Weiterhin wurden die Nuclei mittels DAPI-Färbung (blau) markiert. Länglich-retikuläre Zellen (Pfeile), kleine sternförmige Zellen (✶), stark-retikuläre Zellen (#) und Neurone (n). **A-B:** Fibronektin (α-FN15) konnte bei den meisten länglich-retikulären Zellen nachgewiesen werden (A1, A2). Besonders an großen Zellaggregationen dieser Art findet man sehr intensive Markierungen (A2). Bei kleinen sternförmigen Zellen konnte kein Fibronektin nachgewiesen werden (A3). **C-D:** Vimentin (α-VIM) konnte bei kleinen sternförmigen Zellen (C2) nachgewiesen werden. Stark-retikuläre Zellen (C1) und länglich-retikuläre Zellen (D2) exprimieren dagegen kein Vimentin. **E:** Neurone werden durch eine Parvalbumin-Markierung (α-PVALB) angefärbt (E2). Messbalken = 100 µm.

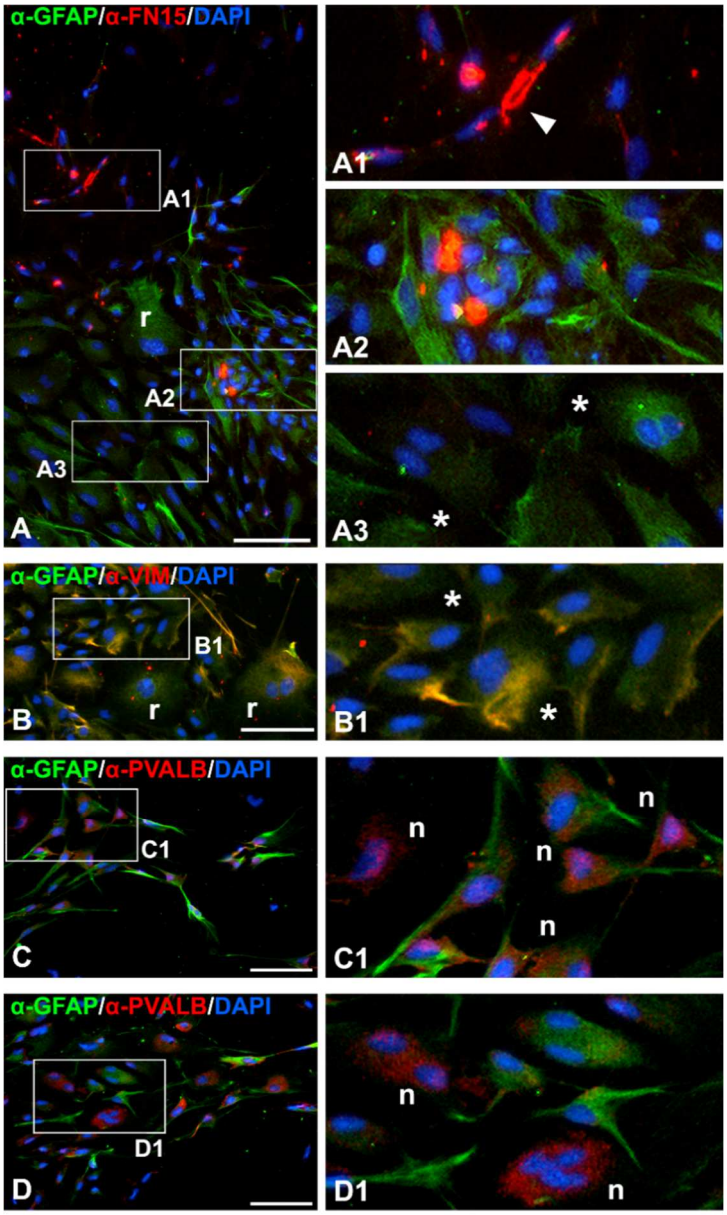


Abb. 3.3: IF-Doppelmarkierungen von Zelltypmarkern zur Unterscheidung verschiedener Zelltypen. Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen IF-doppelmarkierter meningealer Primärkulturen (acht Tage nach der Präparation) von Goldfischen. IF-Markierung vom sauren Gliafaserprotein (α-GFAP; grün) wurde mit einer roten Markierung von Fibronektin (α-FN15), Vimentin (α-VIM) bzw. Parvalbumin (α-PVALB) übereinandergelegt. Nuclei wurden durch eine DAPI-Färbung (blau) markiert. Länglich-retikuläre Zellen (Pfeile), kleine sternförmige Zellen (✶), stark-retikuläre Zellen (#), mehrkernige Riesenzellen (r) und Neurone (n). **A:** α-GFAP und α-FN15: Länglich-retikuläre Zellen exprimieren Fibronektin (FN15) aber kein GFAP (A1). Fibronektin-Markierungen sind häufig an Zellaggregationen mit GFAP-exprimierenden Zellen vorzufinden (A2). Kleine sternförmige Zellen exprimieren GFAP, aber kein Fibronektin (A3). **B:** α-GFAP und α-VIM: Sowohl kleine sternförmige Zellen (B1) als auch mehrkernige Riesenzellen exprimieren GFAP und Vimentin. **C-D:** α-GFAP und α-PVALB: Neurone exprimieren GFAP und Parvalbumin (C1) oder nur Parvalbumin (D1, E1). Messbalken = 100 µm.

3.2 Zeitverlauf der Ependymin-Expression in meningealen Primärkulturen

Um einen geeigneten Zeitpunkt für die Expressionsstudien zu finden, wurde die Ependymin-mRNA-Expression im Zeitverlauf über zwei Wochen ohne Zugabe von Glucocorticoiden oder anderen Substanzen bestimmt. Das ist notwendig, da die Präparation und Kultivierung eine starke Veränderung des Milieus darstellt und die Zellen sich durch eine veränderte Genexpression an die neuen Bedingungen anpassen. Zur Erstellung des Zeitverlaufs wurden die mRNA-Verhältnisse der Gene *epd1*, *epd2* und *l1-e587* bis 14 Tage nach Erstellung der Kulturen (in zwei Tagesabständen) mittels Reverse Transkriptase quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR) bestimmt (Abb. 3.4, Anhang Tab. 7.2). Dabei wurde festgestellt, dass die mRNA-Expressionen beider Ependymin-Gene (*epd1* und *epd2*) vom Präparationstag bis zu einem Kulturalter von acht Tagen um etwa fünf Größenordnungen absinken. Das Gen *epd1* hat am Präparationstag ein

mRNA-Verhältnis (relativ zu einer Kalibrator-cDNA; Kap. 2.12.1) von 77.040,85 ± 14.857,90 und fällt nach acht Tagen auf 2,05 ± 0,32 annähernd log-linear ab. Ähnlich verläuft das *epd2*-Verhältnis, das von 352,584,24 ± 71.373,19 am Präparationstag auf 2,21 ± 0,41 nach acht Tagen abfällt. Eine einfaktorielle ANOVA mit anschließendem Post-hoc Test (Holm-Sidak-Test zwischen benachbarten Zeitpunkten) hat ergeben, dass die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten sowohl für *epd1* als auch für *epd2* höchst signifikant sind ($p < 0{,}0001$). Die Unterschiede der mRNA-Verhältnisse zwischen neuen (Präparationstag) und zwei Tage bzw. zwei Tage und vier Tage alten Kulturen sind sowohl für *epd1* ($p < 0{,}0001$) als auch für *epd2* ($p = 0{,}0001$ bzw. $p = 0{,}0002$) hoch bzw. höchst signifikant. Die Unterschiede zwischen vier Tage alten und sechs Tage alten Kulturen sind sehr signifikant für *epd1* ($p = 0{,}0098$) und signifikant für *epd2* ($p = 0{,}045$). Bis zum Alter von zwei Wochen fallen die Expressionen beider Ependymin-Gene auf 0,53 ± 0,40 (*epd1*) bzw. 0,54 ± 0,41 (*epd2*), jedoch ist der Abfall zwischen den benachbarten Zeitpunkten nicht signifikant. Der Expressionsverlauf von *l1-e587* ist dagegen viel stabiler, unterliegt jedoch hochsignifikanten Schwankungen ($p = 0{,}0003$). Dieses Gen codiert ein L1-ähnliches Zelladhäsionsmolekül, das wie Ependymin in die Gedächtnisbildung bei *Teleostei* involviert ist (PRADEL *ET AL.,* 1999). Das *l1-e587*-Verhältnis beträgt am Präparationstag 1,57 ± 0,20, steigt nach zwei Tagen auf ein absolutes Maximum von 3,53 ± 0,10 signifikant an ($p = 0{,}0281$) und fällt nach vier Tagen sehr signifikant ($p = 0{,}009$) auf 1,00 ± 0,07 ab. Nach sechs Tagen ist die Expression mit 0,67 ± 0,22 am niedrigsten, steigt aber nach acht Tagen wieder auf 1,19 ± 0,28 und erreicht nach zwölf Tagen ein relatives Maximum bei 1,86 ± 0,27.

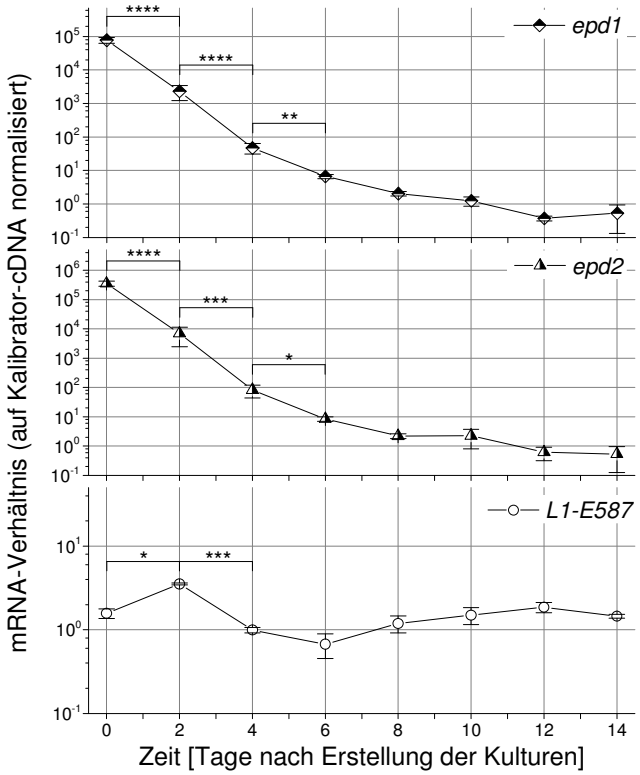


Abb. 3.4: Ependymin-mRNA-Expression sinkt in den meningealen Primärkulturen stark ab. Dargestellt ist der Zeitverlauf der normalisierten mRNA-Verhältnisse von *epd1*, *epd2* und *l1-e587* bis zwei Wochen nach der Herstellung der meningealen Primärkulturen. Das normalisierte mRNA-Verhältnis wurde mittels RT-qPCR bestimmt und auf einen externen Standard (Kalibrator-cDNA) normalisiert (Kap. 2.12.1). Die Expression von *epd1* und *epd2* sinkt acht Tage nach der Erstellung der Kultur um etwa fünf Größenordnungen ab. Zwischen acht Tage und zehn Tage alten Kulturen ist die Veränderung der Expression vergleichsweise gering. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (Anhang Tab. 7.2). Anzahl der biologischen Replikate beträgt n = 3 (außer an Tag 14; n = 2). *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001 (Holm-Sidak-Test zwischen benachbarten Zeitpunkten nach einfaktorieller ANOVA).

Es ist bekannt, dass Ependymin von Zellen der Endomeninx exprimiert und in die extrazelluläre Flüssigkeit sekretiert wird (ROTHER *ET AL.,* 1995). Deswegen wurde untersucht, ob meningeale Zellen auch *in vitro* Ependymin exprimieren und ins Zellkulturmedium sekretieren. In Hinsicht darauf wurde die Ependymin-Konzentration im Zellkulturmedium bis 16 Tage nach der Präparation mittels Radioimmunassay (Kap. 2.11.1) bestimmt. Um den Zellen zwischen den Untersuchungszeitpunkten die gleiche Zeitspanne für die Abgabe des Ependymins ins Medium zu geben, wurde exakt alle 48 h das Medium gewechselt und dabei das abgenommene Medium untersucht. Es konnte auf diese Weise gezeigt werden, dass die Menge des sekretierten Ependymins stetig über Zeit abnimmt (Abb. 3.5, Anhang Tab. 7.4). Eine einfaktorielle ANOVA mit anschließendem Post-hoc Test (Holm-Sidak-Test zwischen benachbarten Zeitpunkten) hat ergeben, dass die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten höchst signifikant ($p < 0{,}0001$) sind. Die Ependymin-Konzentration im Medium beträgt bei zwei Tagen alten Kulturen 3.405,94 ± 1.597,26 ng/ml und fällt vier Tage nach der Präparation sehr signifikant ($p = 0{,}0012$) auf 111,28 ± 51,27 ng/ml ab. Bei acht Tage alten Kulturen beträgt die Ependymin-Konzentration im Medium nur noch 18,45 ± 7,35 ng/ml und sinkt nach 16 Tagen weiter bis auf 2,16 ng/ml (die restlichen Werte sind im Anhang Tab. 7.4 zusammengefasst). Damit sind die Ergebnisse über die Sekretion des Ependymins konsistent mit der Expression auf mRNA-Ebene.

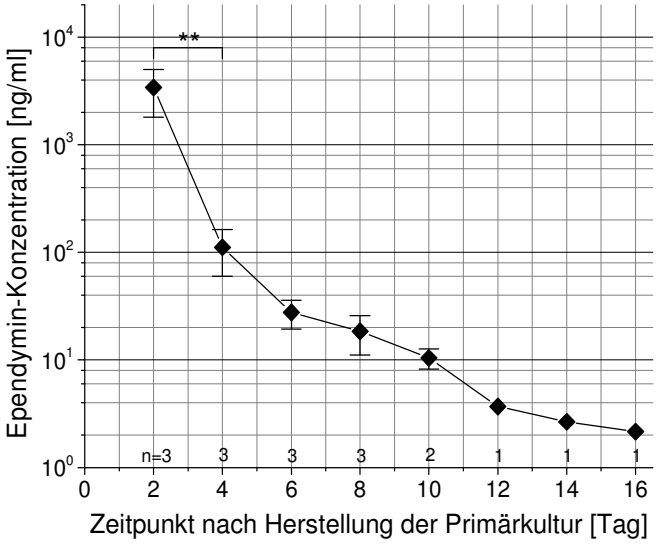


Abb. 3.5: Ependymin-Sekretion sinkt in den meningealen Primärkulturen stark ab. Nach der Herstellung der Primärkulturen wurden die Zellen wie in Kap. 2.7.6 beschrieben ausgesät. An jedem zweiten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Ependymin-Konzentration im entnommenen Medium mittels RIA bestimmt (Kap. 2.11.1). Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (Anhang Tab. 7.4). Anzahl der biologischen Replikate (n) ist über der Abszisse angegeben. **$p \leq 0{,}01$ (Holm-Sidak-Test zwischen den benachbarten Zeitpunkten nach einfaktorieller ANOVA; $p \leq 0{,}0001$).

Um die zelluläre und subzelluläre Lokalisierung des Ependymins im Zeitverlauf zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzmarkierungen von Ependymin (α-EPD Antiserum) bei ein, drei, fünf, sieben und zehn Tage alten Primärkulturen durchgeführt. Die Konfluenz der Kulturen beträgt nach mikroskopisch visueller Abschätzung nach einem Tag max. 10 %, nach drei Tagen 15 %, nach fünf Tagen 35 %, nach sieben Tagen 60 % und nach zehn Tagen nahezu 100 %, folglich findet unter Kulturbedingungen eindeutig eine Vermehrung der meningealen Zellen statt. Wie in Abb. 3.6-A und B zu sehen ist, kommt es bereits nach einem Tag zu einer vereinzelten Anheftung

und Ausdifferenzierung von Ependymin-positiven Zellen auf der Oberfläche des Kulturgefäßes. Die Anzahl der Ependymin-positiven Zellen nimmt mit der Zeit stark zu, während sich die Intensität der Markierung kaum verändert. Weiterhin kann man erkennen, dass die Ependymin-Markierung mit Zunahme des Kulturalters homogener verteilt vorliegt. In jungen Kulturen (bis nach fünf Tagen) sind noch viele Ependymin-negative Zellen zu verzeichnen (Abb. 3.6-B und C), während nach sieben oder zehn Tagen kaum noch Ependymin-negative Zellen (Zellen an denen nur die Nuclei markiert sind) zu erkennen sind (Abb. 3.6-E und F). Weiterhin konnte zwischen jungen und zehn Tage alten Kulturen ein Unterschied in der subzellulären Markierung festgestellt werden. Bei jungen Kulturen ist die Markierung sehr fein aufgelöst und man kann sehr gut die granuläre Färbung um die Nuclei erkennen (Abb. 3.6-B1, C2 und D1). In Abb. 3.6-B1 und Abb. 3.6-D2 wird ersichtlich, dass diese Markierungen punktuell vorkommen, was auf subzelluläre Ansammlungen von Ependymin in Vesikeln oder ähnlichen Strukturen hinweist. Häufig ist ein netzartiges Immunmarkierungsmuster zu erkennen, das für die morphologische Klassifizierung der Zellen in Kap. 3.1 herangezogen wurde. Ab einem Kulturalter von zehn Tagen (Abb. 3.6-F) werden diese feinen Strukturen nicht mehr hoch aufgelöst.

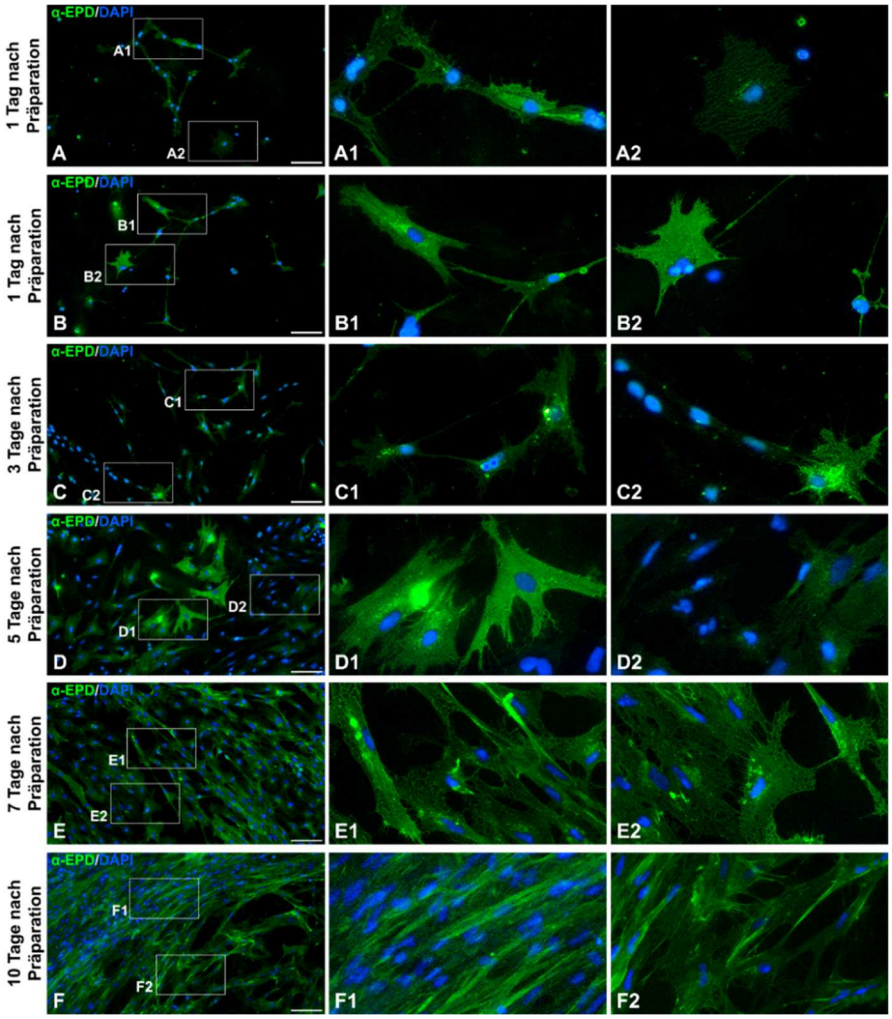


Abb. 3.6: Anzahl Ependymin-positiver meningealer Zellen steigt mit dem Alter der Kultur stark an. Dargestellt sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen meningealer Zellen von Goldfischen bis zu zehn Tagen nach der Präparation. Die Kulturen wurden mit einem α-EPD Antiserum IF-markiert. (grün). Die Nuclei wurden mittels DAPI-Färbung (blau) markiert. Zellen die Ependymin exprimieren, weisen eine intensive Immunfärbung um die Zellkerne auf. Es sind Kulturen ein Tag (**A-B**), drei Tage (**C**), fünf Tage (**D**), sieben Tage (**E**) und zehn Tage (**F**) nach der Präparation dargestellt. Messbalken: 100 µm.

3.3 Beeinflussung der Ependymin-Expression bei meningealen Zellen

In Kap. 3.2 wurde gezeigt, dass die Ependymin-Expression nach der Kultivierung stark absinkt. Das stellte für die Expressionsstudien, durch die der Einfluss von Stresshormonen und anderer Substanzen auf die Ependymin-Expression untersucht wurde, ein Problem dar. Es gab keinen Zeitpunkt, an dem sich die Ependymin-Expression vollkommen stabilisiert hatte. Daher wurden behandelte Kulturen bei diesen Versuchen immer mit gleichaltrigen scheinbehandelten Kulturen derselben Präparation miteinander verglichen. Aufgrund des zeitlichen Verlaufs (Kap. 3.2), wurde die Ependymin-Expression bei acht Tage alten Kulturen am stabilsten angesehen und dieses Kulturalter für die Versuche ausgewählt. Weiterhin ist zu erwähnen, dass die Ependymin-Expression zwischen Kulturen verschiedener Präparationen stark variierte. Auch aus diesem Grund wurden behandelte Kulturen auf die jeweiligen scheinbehandelten Kontrollen der gleichen Präparation normalisiert (Kap. 2.12.3).

3.3.1 Einfluss von Glucocorticoiden auf die Ependymin-Expression

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Glucocorticoiden auf die Ependymin-Expression in meningealen Zellen von Goldfischen zu untersuchen. Damit sollte ein möglicher Einfluss von Glucocorticoiden auf die Gedächtnisbildung nachgewiesen werden, da relevante Lernsituationen oft durch physiologische Stressreaktionen begleitet werden. Um den Anfang einer physiologischen Stresssituation in Zellkultur zu simulieren, wurden Glucocorticoide ins Zellkulturmedium zugegeben und nach verschiedenen Zeitpunkten die Ependymin-Expression mittels RT-qPCR (mRNA-Expression) und Radioimmunassay (Protein-Expression) bestimmt. Da Cortisol das wichtigste Glucocorticoid bei Säugetieren ist (MOMMSEN *ET AL.,* 1999), wurde der Fokus auf den Einfluss dieses Stresshormons gelegt. In Vorversuchen wurde der Einfluss von verschiedenen Konzentrationen getestet (250, 1250 und 6250 µg/l). Nach Zugabe von 6250 µg/l Cortisol wurde der größte Effekt auf die Ependymin-Expression erzielt, weshalb folgende Versuche mit dieser Cortisol-Konzentration durchgeführt wurden. Hierzu wurde ein Zeitverlauf der mRNA-Expression der Gene *epd1*, *epd2* und *l1-e587* nach Cortisol-Zugabe erstellt, wobei diese als normalisierte mRNA-Verhältnisse relativ zu den unbehandelten Kontrollen angegeben werden (Abb. 3.7 und Anhang Tab. 7.5). Nach Zugabe von Cortisol verläuft die Expression der Gene *epd1* und *epd2* zweigipflig. Das mRNA-Verhältnis nach 20 min beträgt 0,957 ± 0,141 (*epd1*) bzw. 0,968 ± 0,203 (*epd2*), steigt nach 40 min auf ein absolutes Maximum von 1,404 ± 0,149 (*epd1*) bzw. 1,426 ± 0,181 (*epd2*) und sinkt nach 60 min auf 0,954 ± 0,220 (*epd1*) bzw. 0,992 ± 0,339 (*epd2*). Nach 120 min steigt das mRNA-Verhältnis wieder auf 1,203 ± 0,110 (*epd1*) bzw. 1,349 ± 0,169 (*epd2*) an und erreicht nach 180 min das absolute Minimum bei 0,844 ± 0,158 (*epd1*) bzw. 0,749 ± 0,114 (*epd2*). Nach 300 min erreicht das mRNA-Verhältnis Werte von 1,013 (*epd1*) bzw. 1,100 (*epd2*). Mittels Einstichproben-t-Test

konnten keine signifikanten Unterschiede zum theoretischen Mittelwert der Kontrollen nachgewiesen werden, allerdings verfehlen die Mittelwerte nach 40 min mit p = 0,0536 (*epd1*) und p = 0,0659 (*epd2*) knapp die Signifikanzgrenze. Weiterhin wird das mRNA-Verhältnis von *l1-e587* nicht durch die Cortisol-Behandlung beeinflusst. Letzteres Gen codiert ein L1-ähnliches Zelladhäsionsmolekül, das wie Ependymin in die Gedächtnisbildung bei *Teleostei* involviert ist (PRADEL *ET AL.,* 1999). Die Mittelwertunterschiede zwischen den getesteten Zeitpunkten (mit n ≥ 3) sind mit p = 0,338 (*epd1*), p = 0,425 (*epd2*) und p = 0,987 (*l1-e587*) nicht signifikant (einfaktorielle ANOVA). Auffallend ist, dass der Mittelwert nach 60 min bei relativ häufiger Versuchswiederholung (n = 7) einen hohen Standardfehler aufweist. Dieser hohe Standardfehler wird weitestgehend durch einen Wert (Anhang Tab. 7.5) verursacht, der bei 2,132 (*epd1*) bzw. 2,875 (*epd2*) liegt. Die restlichen Werte liegen deutlich unter oder nahe dem Kontrollniveau. Betrachtet man diese Werte als Ausreißer (nach Nalimov-Test nicht signifikant; p > 0,05), würden die Mittelwerte bei 0,758 ± 0,117 (*epd1*) bzw. 0,679 ± 0,151 (*epd2*) liegen. Dadurch wäre die Diskrepanz zwischen den Mittelwerten nach 40 min und 60 min noch höher.

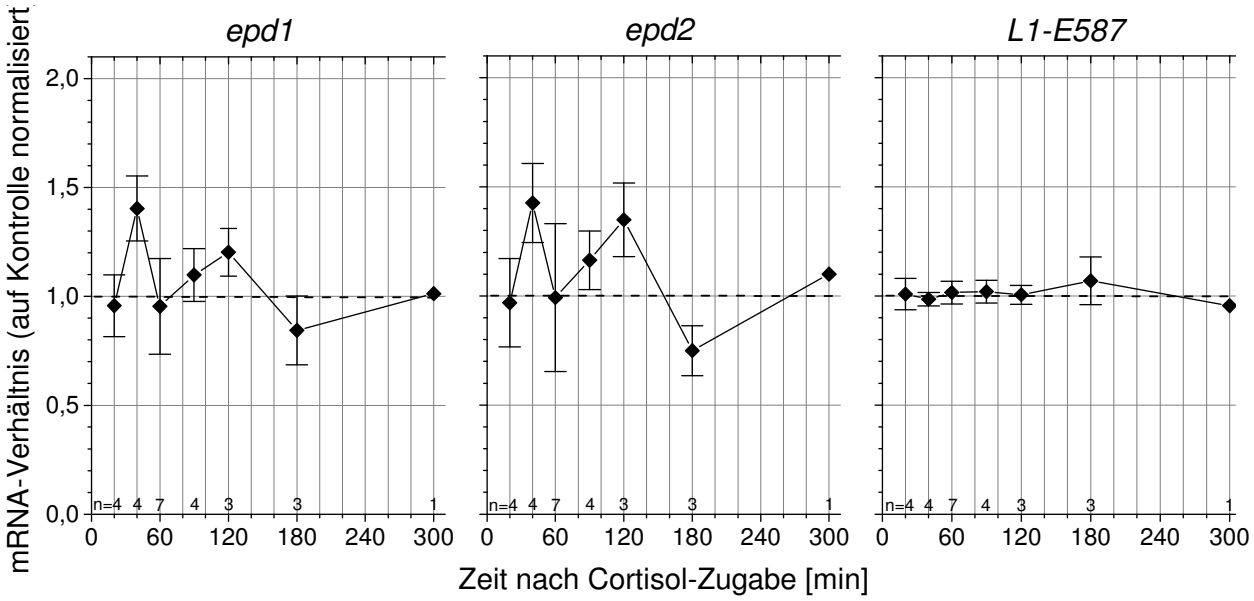


Abb. 3.7: Ependymin-mRNA-Expression in meningealen Zellen verläuft nach Cortisol-Behandlung zweigipflig. Dargestellt ist der Zeitverlauf der normalisierten mRNA-Verhältnisse der Gene *epd1*, *epd2* und *l1-e587* nach Cortisol-Behandlung der meningealen Primärkulturen. Am Versuchstag (8. Tag) wurden die Zellen mit Cortisol-haltigem Medium (6250 µg/l Cortisol) versetzt und die spezifische mRNA-Menge nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (20, 40, 60, 90, 120, 180 und 300 min) mittels RT-qPCR bestimmt. Anschließend wurden die Werte auf die Mittelwerte der jeweiligen scheinbehandelten Kontrollen normalisiert, denen Cortisol-freies Medium (mit 0,0625 % (v/v) Ethanol) zugegeben wurde (mRNA-Verhältnis). Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (Anhang Tab. 7.5). Anzahl der biologischen Replikate (n) ist über der Abszisse angegeben.

Zur Untersuchung ob auch andere Glucocorticoide eine Veränderung der Ependymin-Expression verursachen, wurden die Versuche mit Zugabe von 6250 µg/l Corticosteron (statt Cortisol)

wiederholt (Abb. 3.8, Anhang Tab. 7.7). Inkubationszeiten von 40 min (n = 4) und 60 min (n = 5) wurden am häufigsten durchgeführt, da nach dieser Zeit die größten Effekte erzielt wurden. Das mRNA-Verhältnis beträgt nach 40 min 0,953 ± 0,119 (*epd1*) bzw. 1,112 ± 0,120 (*epd2*) und sinkt nach 60 min auf 0,859 ± 0,052 (*epd1*) bzw. 0,867 ± 0,030 (*epd2*). Damit kommt es zwischen 40 und 60 min sowohl bei Zugabe von Cortisol als auch von Corticosteron zu einem Abfall der Ependymin-Expression. Nach Einstichproben-t-Tests unterscheiden sich die Mittelwerte nach 60 min p = 0,0491 (epd1) und p = 0,0139 (epd2) signifikant zu den theoretischen Mittelwerten der Kontrollen. Weiterhin steigt nach 90 min ähnlich wie bei Cortisol-Zugabe das mRNA-Verhältnis auf 1,139 (*epd1*) bzw. 1,104 (*epd2*). Damit ist der Verlauf teilweise mit dem der Cortisol-Zugabe vergleichbar, jedoch ist der Effekt deutlich geringer ausgeprägt. Ein ungepaarter t-Test zwischen den Daten der Inkubationszeiten von 40 und 60 min hat ergeben, dass die Mittelwerte mit p = 0,580 (*epd1*) und p = 0,060 (*epd2*) sich nicht signifikant voneinander unterscheiden. Allerdings ist zu erwähnen, dass Letzteres nur knapp die Signifikanzgrenze von p ≤ 0,05 verfehlt.

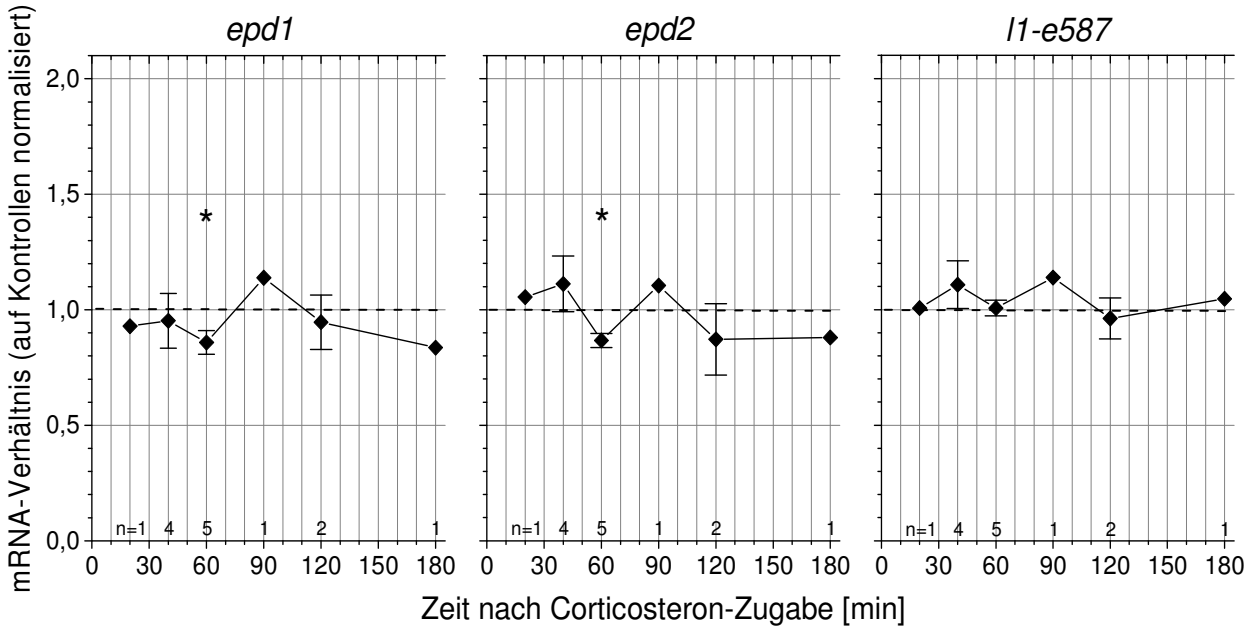


Abb. 3.8: Ependymin-mRNA-Expression in meningealen Zellen nach Corticosteron-Behandlung ist vergleichbar mit dem Einfluss von Cortisol. Dargestellt ist der Zeitverlauf der normalisierten mRNA-Verhältnisse der Gene *epd1*, *epd2* und *I1-e587* nach Corticosteron-Behandlung der meningealen Primärkulturen. Am Versuchstag (8. Tag) wurden die Zellen mit Corticosteron-haltigem Medium (6250 µg/l Corticosteron) versetzt und die spezifische mRNA-Menge nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (20, 40, 60, 90, 120, 180 und 300 min) mittels RT-qPCR bestimmt. Anschließend wurden die Werte auf die Mittelwerte der jeweiligen scheinbehandelten Kontrollen normalisiert, denen Corticosteron-freies Medium (mit 0,0625 % (v/v) Ethanol) zugegeben wurde (mRNA-Verhältnis). Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (Anhang Tab. 7.7). Anzahl der biologischen Replikate (n) ist über der Abszisse angegeben. Asteriske geben Signifikanzwerte aus Einstichproben-t-Tests im Vergleich zum hypothetischen Mittelwert der Kontrollen an (gestrichelte Linie). *p ≤ 0,05.

Lernsituationen die für einen Organismus relevant sind, werden nicht nur durch den Beginn, sondern oft auch durch die Beendigung von physiologischen Stressreaktionen begleitet. Während ein Verhaltensmuster das in der Vergangenheit zu einer physiologischen Stressreaktion führte zukünftig vermieden werden sollte, sollte ein Verhalten wiederholt werden, welches zu einer Beendigung der Stressreaktion führt. Das Nervensystem muss dafür in der Lage sein, ein solches Verhaltensmuster zu erkennen, wobei ein Erkennungsmerkmal eine Reduzierung der Serum-Glucocorticoid-Konzentration sein könnte (siehe Arbeitshypothese; Kap. 1.4). Das wurde *in vitro* durch einen Cortisol-Entzug simuliert, indem die meningealen Zellen drei Tage vor dem Versuch mit 6250 µg/l Cortisol im Kulturmedium behandelt wurden (Kap. 2.8.1) und am Versuchstag das Cortisol-haltige mit Cortisol-freiem Medium ersetzt wurde. Anschließend wurde die mRNA-Menge von *epd1*, *epd2* und *I1-e587* nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (20, 40, 60, 75, 90, 120, 180, 300 min) mittels RT-qPCR bestimmt. Der Cortisol-Entzug führt nach 60 min zu einer erhöhten Ependymin-Expression mit einem mRNA-Verhältnis von 2,150 ± 0,430 (*epd1*) bzw. 2,981 ± 0,641 (*epd2*) und steigt nach 75 min noch weiter auf 2,184 ± 0,521 (*epd1*) bzw. 3,681 ± 1,186 (*epd2*) (Abb. 3.9; Anhang Tab. 7.9). Mittels Einstichproben-t-Tests konnte gezeigt werden, dass sich die Mittelwerte nach 60 min mit p = 0,0027 (epd1) bzw. p = 0,0010 (epd2) sehr bzw. hoch signifikant vom hypothetischen Mittelwert der Kontrollen unterscheiden. Die Mittelwerte der 75 min Gruppe verfehlen mit p = 0,0609 (epd1) bzw. p = 0,0574 (epd2) knapp die Signifikanzgrenze. Dieser Effekt ist allerdings transient, da die Ependymin-Expression nach 90 min mit 0,840 ± 0,141 (*epd1*) bzw. 0,834 ± 0,178 (*epd2*) sogar leicht unter Kontroll-Niveau fällt. Im weiteren Verlauf (bis 5 h nach Entzug) bleibt die Ependymin-Expression auf Kontroll-Niveau. Eine einfaktorielle ANOVA mit Gruppen 40, 60, 75, 90 und 120 min (n ≥ 3) hat ergeben, dass sich die Mittelwerte mit p = 0,0082 (*epd1*) und p = 0,0049 (*epd2*) sehr signifikant voneinander unterscheiden. Mittels Tukey-Test (Post-hoc Test zur ANOVA) konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Mittelwertunterschiede zwischen 60 und 90 min mit p = 0,0230 (*epd1*) bzw. p = 0,023 (*epd2*) und die Unterschiede zwischen 75 und 90 min mit p = 0,0465 (*epd1*) bzw. p = 0,030 (*epd2*) signifikant sind. Die Mittelwertunterschiede zwischen 40 und 60 min sind mit p = 0,078 (*epd1*) und p = 0,086 (*epd2*) knapp über der Signifikanzgrenze. Ein Varianzunterschied zwischen den getesteten Gruppen konnte mittels Brown-Forsynthe-Test mit p = 0,620 (*epd1*) bzw. p = 0,608 (*epd2*) nicht nachgewiesen werden. Die Expression von *I1-e587* bleibt dagegen, wie bei allen gezeigten Glucocorticoid-Behandlungen, über die getestete Zeitspanne auf Kontroll-Niveau. Auch mittels einfaktorieller ANOVA der Daten von 40, 60, 75, 90 und 120 min (n ≥ 3) konnten mit p = 0,686 keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Damit eignet sich dieses Gen besonders gut als Negativkontrolle für diese Versuche.

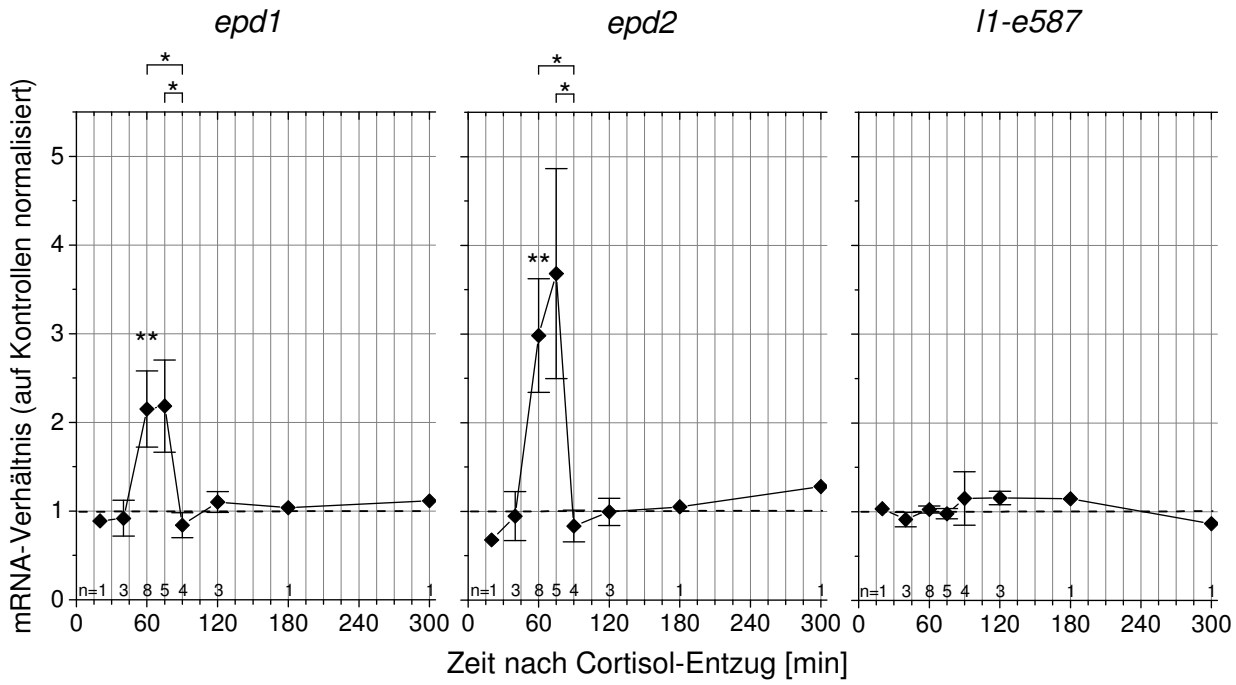


Abb. 3.9: Cortisol-Entzug führt in meningealen Primärkulturen zu einer transienten Erhöhung der Ependymin-mRNA-Expression. Dargestellt ist der Zeitverlauf der normalisierten mRNA-Verhältnisse der Gene *epd1*, *epd2* und *l1-e587* nach Cortisol-Entzug in meningealen Primärkulturen. Die Zellen wurden drei Tage vor dem Versuch mit 6250 µg/l Cortisol im Kulturmedium behandelt (Kap. 2.8.1). Am Versuchstag (8. Tag) wurde das Cortisol-haltige mit Cortisol-freiem Medium (mit 0,0625 % (v/v) Ethanol) ersetzt und die spezifische mRNA-Menge nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (20, 40, 60, 75, 90, 120, 180, 300 min) mittels RT-qPCR bestimmt. Anschließend wurden die Werte auf die Mittelwerte der jeweiligen scheinbehandelten Kontrollen normalisiert, die weiterhin Cortisol-haltiges Medium bekommen haben (mRNA-Verhältnis). Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (Anhang Tab. 7.9). Die Anzahl der biologischen Replikate (n) ist über der Abszisse angegeben. Asteriske über den Fehlerbalken geben Signifikanzwerte aus Einstichproben-t-Tests im Vergleich zum hypothetischen Mittelwert der Kontrollen (gestrichelte Linie) an. Asteriske über den Klammern geben Signifikanzwerte aus Tukey-Tests nach einfaktorieller ANOVA mit gegenseitigem Vergleich aller Gruppen mit n ≥ 3 an. *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01.

Es wurde gezeigt, dass ein Cortisol-Entzug in meningealen Primärkulturen zu einer transienten Erhöhung der Ependymin-mRNA-Expression führt. Da eine solch hohe Konzentration physiologisch nicht vorkommt, sollte analysiert werden, ob auch der Entzug von geringeren Cortisol-Konzentrationen eine erhöhte Ependymin-mRNA-Expression bewirkt. Dafür wurden die Ependymin-mRNA-Verhältnisse 60 min nach Entzug von 250 und 1250 µg/l Cortisol bestimmt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass auch ein Entzug von geringeren Cortisol-Konzentrationen eine leichte Erhöhung der Ependymin-Expression verursacht (Abb. 3.10, Anhang Tab. 7.11). Nach 60 min Entzug von 250 µg/l Cortisol ist ein leicht erhöhtes mRNA-Verhältnis von 1,328 ± 0,243 (*epd1*) bzw. 1,336 ± 0,470 (*epd2*) zu verzeichnen. Weiterhin steigt durch den Entzug von 1250 µg/l Cortisol das mRNA-Verhältnis auf 1,181 ± 0,127 (*epd1*) bzw. 1,514 ± 0,036 (*epd2*). Damit ist der Effekt niedriger, als bei einem Cortisol-Entzug bei einer Konzentration von 6250 µg/l. Eine statistische Auswertung wurde aufgrund der geringen Stichprobengröße (n = 2)

nicht durchgeführt. Das *l1-e587*-Verhältnis bleibt durch den Entzug von 250 und 1250 µg/l Cortisol nach 1 h unbeeinflusst.

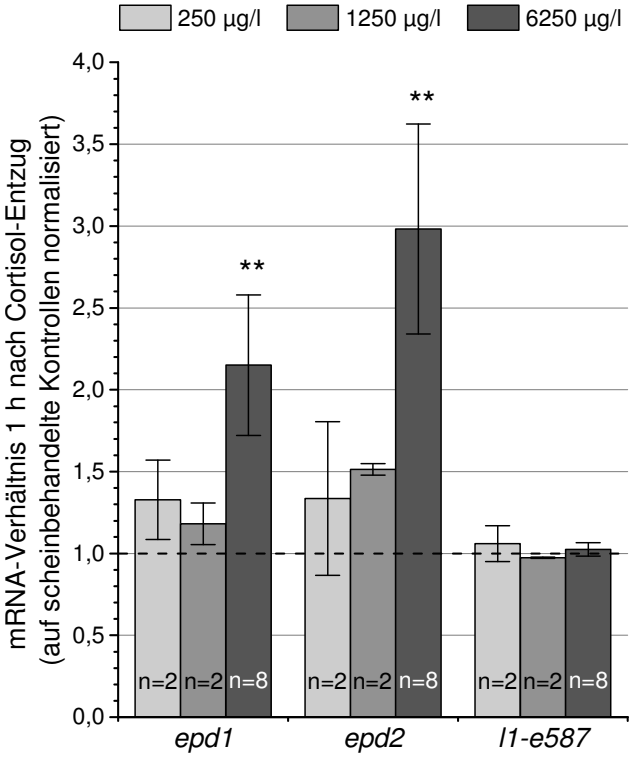


Abb. 3.10: Dosis-abhängige Wirkung des Cortisol-Entzugs auf die Ependymin-mRNA-Expression nach 1 h. Meningeale Zellen wurden drei Tage vor dem Versuch mit 250, 1250 bzw. 6250 µg/l Cortisol im Kulturmedium behandelt (Kap. 2.8.1). Am Versuchstag (8. Tag) wurde das Cortisol-haltige mit Cortisol-freies Medium (mit 0,0625 % (v/v) Ethanol) ersetzt. Nach 1 h Inkubation wurde mittels RT-qPCR die mRNA-Menge von *epd1*, *epd2* und *l1-e587* bestimmt und auf die Mittelwerte der jeweiligen scheinbehandelten Kontrollen normalisiert, die weiterhin mit Cortisol-haltiges Medium behandelt wurden (mRNA-Verhältnis). Dargestellt sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (Anhang Tab. 7.11). Anzahl der biologischen Replikate (n) ist in den jeweiligen Säulen angegeben. Asteriske über den Fehlerbalken geben Signifikanzwert aus Einstichproben-t-Test mit Vergleich vom hypothetischen Mittelwert der Kontrollen (gestrichelte Linie). **p ≤ 0,01.

Da gezeigt werden konnte, dass die Ependymin-mRNA-Expression in meningealen Primärkulturen nach Cortisol-Entzug transient ansteigt, sollte dieser Effekt auch auf Proteinebene verifiziert werden. Dafür wurden die Kulturen wie oben beschrieben behandelt und 60, 120 und 180 min nach Cortisol-Entzug die Ependymin-Konzentration im Kulturmedium und in den Zellen (Kap. 2.11.1.2) mittels Radioimmunassay (Kap. 2.11.1) bestimmt und auf die jeweiligen scheinbehandelten Kontrollen normalisiert. Wie in Abb. 3.11 (und Anhang Tab. 7.12) zu sehen ist, führt ein Cortisol-Entzug nach 60 min zu einem leicht erhöhten Ependymin-Verhältnis, sowohl in den lysierten Zellen (1,202 ± 0,168) als auch im Kulturmedium (1,199 ± 0,312). Nach 120 min sinkt die Konzentration in den lysierten Zellen mit 0,977 ± 0,150 auf Kontroll-Niveau, während es im Kulturmedium auf 2,156 ± 0,844 steigt. Nach 180 min erreicht auch das Ependymin-Verhältnis im Kulturmedium mit 1,040 ± 0,129 Kontrollniveau, während das der lysierten Zellen mit 0,977 ± 0,150 unverändert bleibt. Mittels einfaktorieller ANOVA konnte jedoch weder in den lysierten Zellen ($p = 0,412$) noch im Kulturmedium ($p = 0,260$) ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten festgestellt werden. Weiterhin konnte mittels Einstichproben-t-Test weder bei den Mittelwerten der 60 min Gruppen (lysierte Zellen; $p = 0,324$, Kulturmedium; $p = 0,786$) noch im Kulturmedium der 120 min Gruppen (Kulturmedium; $p = 0,166$) ein signifikanter Unterschied zum hypothetischen Mittelwert der scheinbehandelten Kontrollen festgestellt werden.

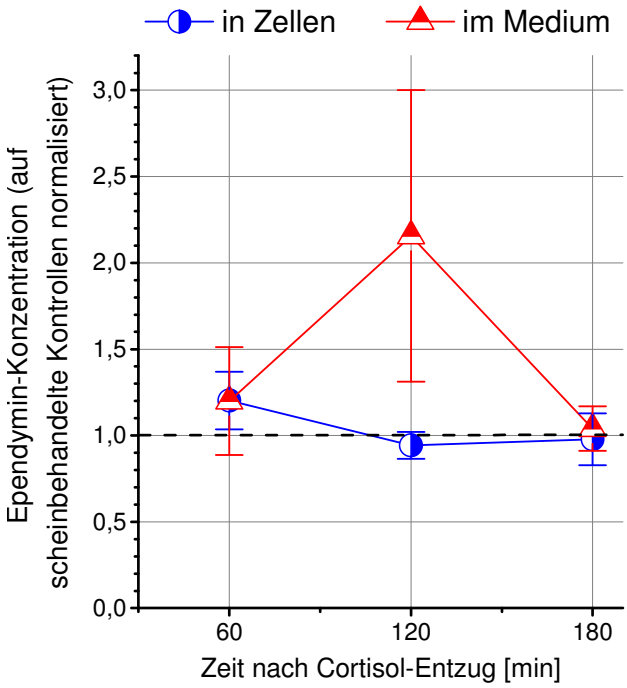


Abb. 3.11: Cortisol-Entzug führt nach 2 h zu einer erhöhten Ependymin-Sekretion ins Kulturmedium. Meningeale Zellen wurden drei Tage vor dem Versuch mit 6250 µg/l Cortisol im Kulturmedium behandelt (Kap. 2.8.1). Am Versuchstag (8. Tag) wurde das Cortisol-haltige mit Cortisol-freiem Medium (mit 0,0625 % (v/v) Ethanol) ersetzt (Cortisol-Entzug) und die Ependymin-Konzentration nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mittels Ependymin-RIA (Kap. 2.11.1) in den Zellen und Medium bestimmt. Die bestimmten Konzentrationen wurden auf die Mittelwerte der jeweiligen scheinbehandelten Kontrollen normalisiert, die weiterhin Cortisol-haltiges Medium bekommen haben. Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte (n = 3) mit den jeweiligen Standardfehlern (Anhang Tab. 7.12).

3.3.2 Untersuchung der Stabilität von Cortisol unter Zellkulturbedingungen

In Kap. 3.3.1 wurde gezeigt, dass ein Cortisol-Entzug in meningealen Zellen einen signifikanten, jedoch transienten Anstieg der Ependymin-Expression verursacht. Um auszuschließen, dass dieser Effekt durch Zersetzung des Cortisols im Kulturmedium verursacht wird, wurde die Stabilität von Cortisol in den Kulturmedien der meningealen Zellen untersucht. Im Hinblick darauf wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der das Kulturmedium mit unterschiedlichen Mengen an Cortisol (250, 1250 und 6250 µg/l) versetzt und den meningealen Zellen zugegeben wurde. Das Kulturmedium inkubierte unter Zellkulturbedingungen (Kap. 2.7.7) und wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten (0 h, 5 h, ein Tag und sieben Tage) abgenommen, um die Cortisol-Konzentration mittels Cortisol-Radioimmunassay (Cortisol-RIA) zu bestimmen. Wie in Abb. 3.12 zu erkennen ist, bleibt die anfänglich vorhandene Cortisol-Konzentration (0 h) bis zum Ende der Inkubationsdauer nach sieben Tagen stabil. Das zugegebene Cortisol wird dementsprechend unter den Versuchsbedingungen in Kap. 3.3.1 und Kap. 3.3.3 nicht zersetzt oder von den Zellen abgebaut. Von einer statistischen Auswertung wurde aufgrund der geringen Stichprobengröße (n = 2) abgesehen. Es ist allerdings zu erwähnen, dass die mittels Cortisol-RIA bestimmte Cortisol-Konzentration durchschnittlich 18,3 % unterhalb der zugegeben Menge (gestrichelte Linie) liegt. Damit wurde nach Zugabe von 250 µg/l Cortisol nur 176,0 ± 9,6 µg/l, nach Zugabe von 1250 µg/l Cortisol nur 1061,5 ± 73,9 µg/l und nach Zugabe von 6250 µg/l Cortisol nur 5608,4 ± 148,3 µg/l mittels Cortisol-RIA bestimmt.

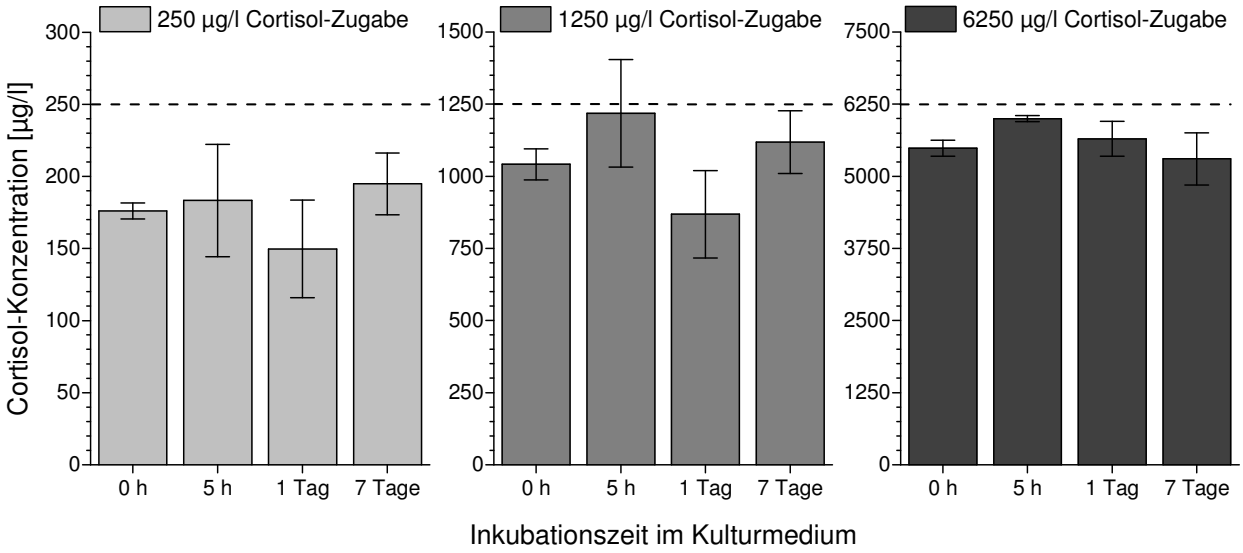


Abb. 3.12:Cortisol-Konzentration ist unter Zellkulturbedingungen stabil. Zur Untersuchung der Stabilität von Cortisol unter Kulturbedingungen wurde den Kulturen 250, 1250 und 6250 µg/l Cortisol (Kap. 2.8.1) zugegeben und nach 0 h, 5 h, ein Tag und sieben Tagen Inkubation die Konzentrationen mittels Cortisol-RIA-Kit (Demeditec Diagnostics; Kap. 2.8.2) bestimmt. Die schwarze gestrichelte Linie zeigt die erwartete Cortisol-Konzentration entsprechend der Cortisol-Zugabe an. Die Säulen zeigen Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern an (n = 2, Anhang Tab. 7.15). Über die Dauer von sieben Tagen konnte keine Abnahme der Cortisol-Konzentration unter Kulturbedingungen festgestellt werden.

3.3.3 Einfluss von Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonisten auf die Ependymin-mRNA-Expression

In Kap. 3.3.1 wurde gezeigt, dass die Ependymin-Expression durch Cortisol-Entzug in meningealen Zellen transient ansteigt. Ein möglicher Wirkmechanismus der zu dieser Veränderung der Expression führt, könnte über den Glucocorticoid-Rezeptor (GR) erfolgen, da dieser zu den Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktoren gehört und der natürliche Rezeptor für Cortisol ist. Wenn die Wirkung des Cortisol-Entzugs auf die Ependymin-Expression kein unspezifischer Effekt ist und über eine veränderte Aktivierung des GR abläuft, sollte eine Behandlung mit einem GR-Antagonisten wie RU486 (Mifepriston) einen ähnlichen Effekt verursachen. Im Hinblick darauf wurde den Zellen (wie in Kap. 3.3.3) drei Tage vor dem Versuch 6250 µg/l Cortisol zugegeben. Anschließend wurde 1 h nach Cortisol-Entzug bzw. nach Zugabe von 1 mM RU486 oder auch nach gleichzeitigem Cortisol-Entzug und RU486-Zugabe die mRNA-Verhältnisse mittels RT-qPCR bestimmt. Wie in Abb. 3.13 (und Anhang Tab. 7.13) zu sehen ist, führt die Zugabe des GR-Antagonisten nach 1 h etwa zu einer dreifachen Erhöhung, sowohl des *epd1*-Verhältnisses (3,234 ± 0,950; p = 0,0855) als auch des *epd2*-Verhältnisses (3,234 ± 0,950; p = 0,0296). Damit ist der Effekt sogar höher als nach einem Cortisol-Entzug. Das gleichzeitige Zugeben von RU486 und dem Entzug von Cortisol führt wiederum mit einem *epd1*-Verhältnis von 1,947 ± 0,897 (p = 0,431) und einem *epd2*-Verhältnis von 3,165 ± 2,067

(p = 0,389) zu einem ähnlich hohen jedoch nicht signifikanten Effekt. Weiterhin entspricht das *l1-e587*-Verhältnis nach den genannten Behandlungen etwa dem Kontroll-Niveau, sodass sich dieses Gen auch hier als Negativkontrolle eignet. Mittels einfaktorieller ANOVA konnte gezeigt werden, dass die Mittelwerte aller getesteten Gruppen mit p = 0,3858 (*epd1*), p = 0,518 (*epd2*), p = 0,199 (*l1-e587*) sich nicht signifikant voneinander unterscheiden.

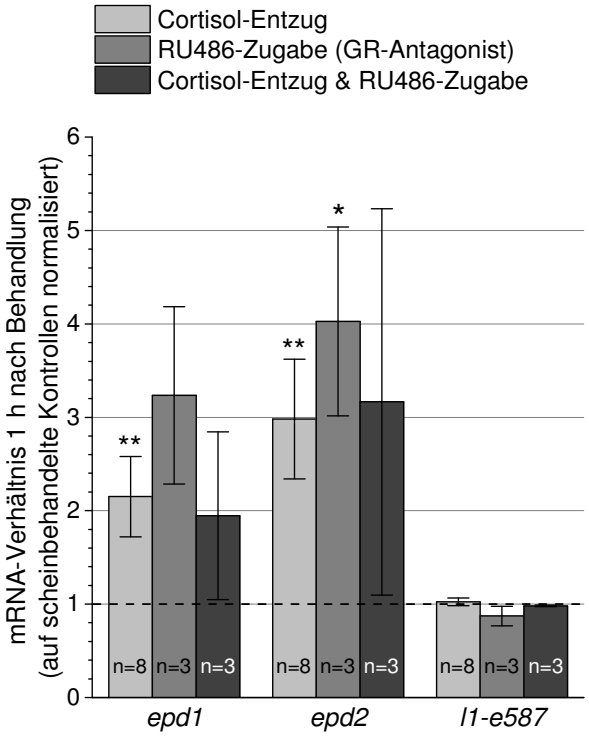


Abb. 3.13: GR-Antagonist RU486 bewirkt bei Cortisol-behandelten meningealen Zellen einen Anstieg der Ependymin-mRNA-Expression. Meningeale Zellen wurden drei Tage vor dem Versuch mit 6250 µg/l Cortisol im Kulturmedium behandelt (Kap. 2.8.1). Am Versuchstag (8. Tag) wurde das Cortisol-haltige mit Cortisol-freiem Medium (mit 0,0625 % (v/v) Ethanol) ersetzt (Cortisol-Entzug) bzw. 1 mM RU486 (GR-Antagonist) zugegeben oder beide Behandlungen gleichzeitig durchgeführt. Nach 1 h Inkubation wurde mittels RT-qPCR die mRNA-Menge von *epd1*, *epd2* und *l1-e587* bestimmt und auf die scheinbehandelten Kontrollen normalisiert, die weiterhin Cortisol-haltiges Medium bekommen haben (mRNA-Verhältnis). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern (Anhang Tab. 7.13). Anzahl der biologischen Replikate (n) ist in den Säulen angegeben. Asteriske geben Signifikanzwerte aus Einstichproben-t-Tests mit Vergleich zum hypothetischen Mittelwert der Kontrollen (gestrichelte Linie). **p ≤ 0,01.

Zur Überprüfung, dass der GR-Antagonist RU486 seine Wirkung spezifisch durch Verdrängung von Cortisol vom GR entfaltet, wurden die gleichen Versuche mit Kulturen wiederholt, die nicht mit Cortisol-Zusatz im Medium herangezogen wurden. Da im Zellkulturmedium eine nur sehr geringe Cortisol-Konzentration (0,18 µg/l; mittels Cortisol-RIA bestimmt) vorhanden ist, sollten die Glucocorticoid-Rezeptoren in den Zellen nicht aktiviert sein. Es ist deshalb zu erwarten, dass durch Zugabe des GR-Antagonisten keine weitere Inaktivierung des GR erzielt werden kann. In Abb. 3.14 sind die mRNA-Verhältnisse 1 h nach Zugabe von 6250 µg/l Cortisol, 6250 µg/l Cortisol und 1 mM RU486 und nur 1 mM RU486 gezeigt. Die alleinige Zugabe von Cortisol führt nach 1 h nicht zu einer Erhöhung der Ependymin-mRNA-Expression (bereits beim Zeitverlauf in Abb. 3.7 gezeigt). Dabei beträgt das mRNA-Verhältnis 0,954 ± 0,220 (*epd1*) bzw. 0,992 ± 0,339 (*epd2*). Die gleichzeitige Zugabe von Cortisol und des GR-Antagonisten führt mit 0,920 ± 0,069 zu einem vergleichbaren *epd1*-Verhältnis wie die alleinige Zugabe von Cortisol, jedoch mit 0,715 ± 0,191 zu einem verringerten *epd2*-Verhältnis. Weiterhin führt die ausschließliche Zugabe von RU486 zu einem leicht erhöhten *epd1*-Verhältnis (1,163 ± 0,402), während das *epd2*-Verhältnis leicht abnimmt (0,811 ± 0,182). Außerdem nimmt das *l1-e587*-Verhältnis 1 h nach gleichzeitiger

Zugabe von Cortisol und RU486 mit 0,845 ± 0,108 ab, wobei die ausschließliche Zugabe des GR-Antagonisten mit 0,848 ± 0,093 einen ähnlichen Wert verursacht. Mittels einfaktorieller ANOVA konnten zwischen den Mittelwerten mit p = 0,860 (*epd1*), p = 0,977 (*epd2*) und p = 0,1968 (*l1-e587*) keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

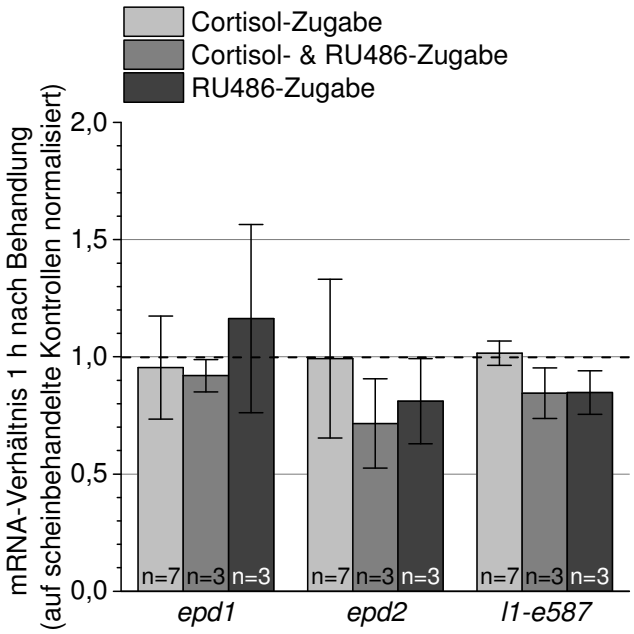


Abb. 3.14: GR-Antagonist (RU486) hat bei Cortisol-unbehandelten meningealen Zellen keinen Einfluss auf die Ependymin-mRNA-Expression. Cortisol-unbehandelte meningeale Zellen wurden am Versuchstag (8. Tag) mit 6250 µg/l Cortisol bzw. dem GR-Antagonisten RU486 (1 mM) oder beidem gleichzeitig behandelt (Kap. 2.8.1). Nach 1 h Inkubation wurde mittels RT-qPCR die mRNA-Menge von *epd1*, *epd2* und *l1-e587* bestimmt und auf die Mittelwerte der jeweiligen scheinbehandelten Kontrollen normalisiert, die weiterhin Cortisol-freies Medium (mit 0,0625 % (v/v) Ethanol) bekommen haben (mRNA-Verhältnis). Dargestellt sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (Anhang Tab. 7.14). Anzahl der biologischen Replikate (n) ist in den jeweiligen Säulen angegeben.

3.3.4 Nachweis des Glucocorticoidrezeptors (GR) in meningealen Zellen

In Kap. 3.3.1 wurde gezeigt, dass ein Cortisol-Entzug die Ependymin-Expression bei meningealen Zellen erhöht und die Zugabe eines Glucocorticoidrezeptor (GR)-Antagonisten (RU486) einen ähnlichen Effekt auf die Ependymin-Expression hervorruft (Kap. 3.3.3). Damit ist die gesteigerte Ependymin-Expression nach Cortisol-Entzug über eine veränderte Aktivität des GR zu erklären. Eine weitere Untersuchung bestand darin, das Vorkommen des GR in den meningealen Zellen zu überprüfen. Diesbezüglich wurden meningeale Zellen immuncytochemisch mittels IF-Markierung von GR (α-GR Antiserum; Kap. 2.3) und einem Zelltypmarker (Fibronektin, Vimentin und Parvalbumin) untersucht (Abb. 3.15). Durch eine IF-Markierung des GR konnten alle beschriebenen meningealen Zelltypen angefärbt werden, was auf eine ubiquitäre Expression des GR schließen lässt. Weiterhin deutet die gleichmäßige Immunfärbung des Cytosols auf eine homogene Verteilung der GR-Moleküle in der Zelle hin. Allerdings gibt es einige Unterschiede in der Intensität der Immunmarkierung zwischen den beschriebenen Zelltypen. Die stärkste Immunfärbung ist dabei an Neuronen (Abb. 3.15-D1) und vielen länglich-retikulären Zellen zu finden (Abb. 3.15-A1). Kleine sternförmige Zellen, mehrkernige Riesenzellen (Abb. 3.15-B1) sowie stark-retikuläre Zellen weisen eine niedrigere Expression auf (Abb. 3.15-C1).

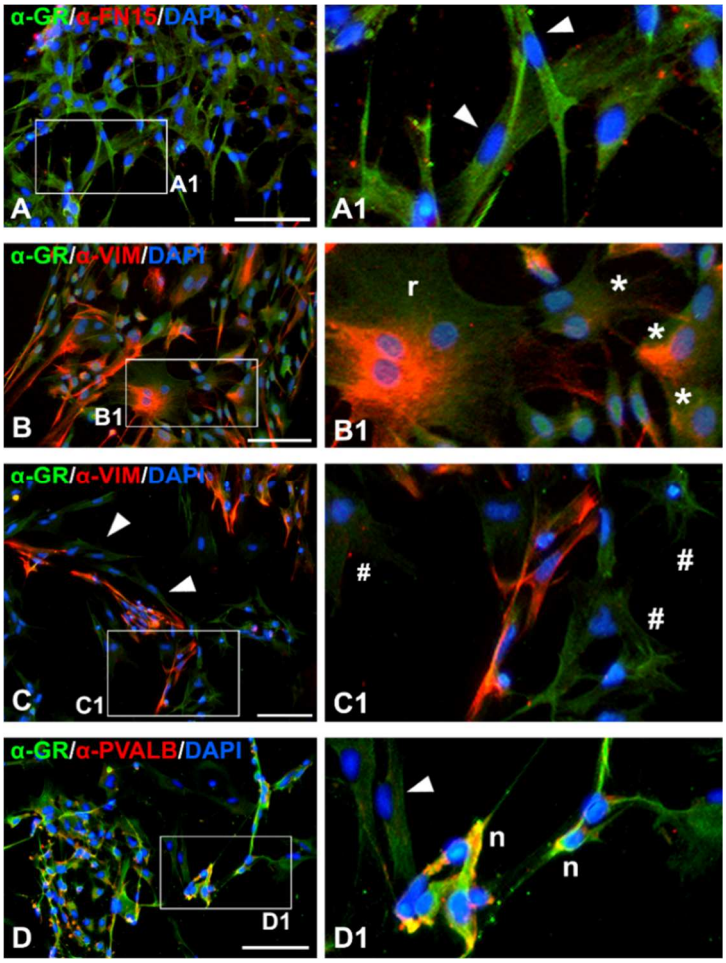


Abb. 3.15: Glucocorticoid-Rezeptoren werden in allen Zelltypen meningealer Primärkulturen exprimiert. Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen IF-doppelmarkierter meningealer Primärkulturen (acht Tage nach der Präparation) von Goldfischen. Eine Markierung des GR (α-GR) ist grün dargestellt und mit einer Markierung eines Zelltypmarkers (rot) übereinandergelegt. Nuclei wurden mittels DAPI-Färbung (blau) markiert. Länglich-retikuläre Zellen (Pfeile), kleine sternförmige Zellen (✶), stark-retikuläre Zellen (#), mehrkernige Riesenzellen (r) und Neurone (n). **A:** α-GR und α-FN15: länglich-retikuläre Zellen exprimieren den GR (A1). **B-C:** α-GR und α-VIM: Sowohl mehrkernige Riesenzellen als auch kleine sternförmige Zellen exprimieren den GR (B1). Stark-retikuläre Zellen exprimieren den GR (C1). **D:** α-GR und α-PVALB: Neurone exprimieren den GR am stärksten (D1). Messbalken = 100 µm.

3.3.5 Einfluss Ependymin-haltiger Proben auf die Ependymin-mRNA-Expression

Es wurde gezeigt, dass die in Kap. 3.3.1 durch Cortisol-Entzug hervorgerufene transiente Erhöhung der Ependymin-Expression in meningealen Zellen nicht durch eine Zersetzung oder Abbau des Cortisols erklärbar ist (Kap. 3.3.2). Es ist daher denkbar, dass neu synthetisiertes Ependymin die eigene Expression durch eine Feedback-Hemmung inhibiert. Wenn das der Fall ist, sollte eine Entfernung oder Blockierung der Ependymin-Moleküle in den Kulturen zu einer erhöhten Ependymin-Expression führen, während eine Zugabe von Ependymin eine Verringerung der Expression verursachen sollte. Um die Konzentration von freien Ependymin-Molekülen in den Kulturen herabzusetzen, wurden zwei verschiedene anti-Ependymin Antiseren (α-EPD und α-EPDβ; Kap. 2.3, Tab. 2.8) in einem Verhältnis von 1:50 dem Kulturmedium zugegeben. Die Antiseren unterscheiden sich dahingehend, dass α-EPD durch Immunisierung mittels deglycosyliertem Ependymin hergestellt wurde, während α-EPDβ gegen bi-N-glycosyliertes Ependymin gerichtet ist. Nach 1 h Inkubation wurden die zu den scheinbehandelten Kontrollen (Zugabe von neutralem Kaninchenserum; NRS) normalisierten mRNA-Verhältnisse der Gene *epd1*, *epd2, l1-e587* durch RT-qPCR bestimmt (Abb. 3.16 und Anhang Tab. 7.16) und mittels Einstichproben-t-Test mit dem hypothetischen Mittelwert der NRS-Kontrollen verglichen.

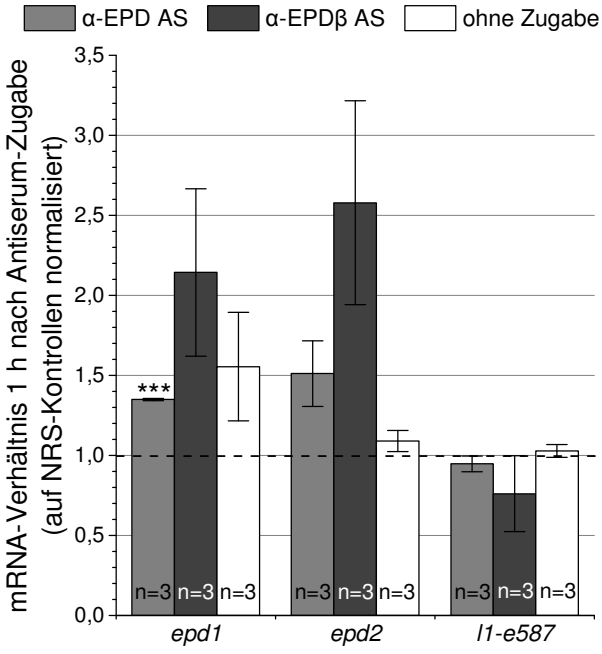


Abb. 3.16: Blockierung der Ependymin-Moleküle mittels Antiseren bewirken eine erhöhte Ependymin-Expression in meningealen Zellen. Meningeale Zellen wurden am Versuchstag (8. Tag) mit α-EPD (gegen deglycosyliertes Ependymin) bzw. α-EPDβ (gegen bi-N-glycosyliertes Ependymin) Antiserum (AS; 1:50) behandelt (Kap. 2.8.2). Nach 1 h Inkubation wurde mittels RT-qPCR die mRNA-Menge von *epd1*, *epd2* und *l1-e587* bestimmt und auf die Mittelwerte der scheinbehandelten Kontrollen normalisiert, die mit neutralem Kaninchenserum (NRS; 1:50) behandelt wurden (mRNA-Verhältnis). Dargestellt sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (Anhang Tab. 7.16). Anzahl der biologischen Replikate (n) ist in den jeweiligen Säulen angegeben. Asteriske geben Signifikanzwerte aus Einstichproben-t-Tests mit Vergleich zum hypothetischen Mittelwert der Kontrollen (gestrichelte Linie). ***p ≤ 0,001.

1 h nach Zugabe des α-EPD Antiserums erhöht sich das mRNA-Verhältnis der Ependymin-Gene hoch signifikant auf 1,350 ± 0,007 (*epd1*; p = 0,0003) bzw. auf 1,511 ± 0,205 (*epd2*; p = 0,0918). Die Zugabe des Antiserums gegen das bi-N-glycosylierte Protein (α-EPDβ) hat mit einem *epd1*-Verhältnis von 2,143 ± 0,641 (p = 0,1412) und *epd2*-Verhältnis von 2,579 ± 0,781 (p = 0,0911) einen noch stärkeren Effekt. Dagegen bleibt das mRNA-Verhältnis des Kontrollgens *l1-e587* nach α-EPD-Zugabe mit 0,948 ± 0,049 (p = 0,3865) auf Kontroll-Niveau, während es nach α-EPDβ-Zugabe auf 0,761 ± 0,290 (p = 0,4199) leicht absinkt. Des Weiteren wurde untersucht, ob Neutrales Kaninchenserum (NRS) als Kontrolle einen unspezifischen Effekt auf die Expression ausübt. Dafür wurden die mRNA-Verhältnisse (*epd1*, *epd2, l1-e587*) von unbehandelten gleichaltrigen Zellen derselben Präparation bestimmt. Das *epd1*-Verhältnis von unbehandelten Zellen liegt mit 1,554 ± 0,339 (p = 0,1966) höher als 1 h nach Zugabe von NRS (NRS-Kontrollen), während das *epd2*-Verhältnis mit 1,090 ± 0,066 (p = 0,2957) und das *l1-e587*-Verhältnis mit 1,028 ± 0,040 (p = 0,5757) auf NRS-Kontrollniveau liegen. Die Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (einfaktorielle ANOVA; *epd1*: p = 0,4353, *epd2*: p = 0,0584, *l1-e587*: p = 0,4385), wobei die Mittelwertunterschiede von *epd2* knapp die Signifikanzgrenze verfehlen.

Zur weiteren Analyse der Feedback-Hemmung wurde schließlich untersucht, ob die Ependymin-mRNA-Expression der Zellen sinkt, wenn die extrazelluläre Ependymin-Konzentration künstlich erhöht wird. Dafür wurden den Kulturen Ependymin-haltige Proben (Extrazellulärflüssigkeit (ECF)-Extrakt; Kap. 2.6.1) zugegeben und die zu den scheinbehandelten Kontrollen (Zugabe von *tris buffered saline*; TBS) normalisierten mRNA-Verhältnisse der Gene *epd1*, *epd2* und *l1-e587* mittels RT-qPCR bestimmt (Abb. 3.17).

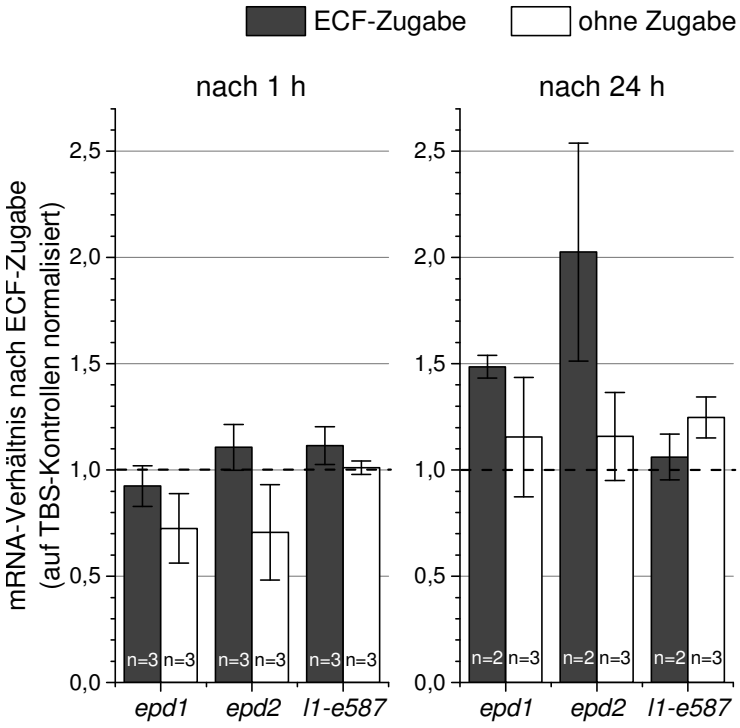


Abb. 3.17: Behandlung mit Ependymin-haltigem ECF-Extrakt führt bei meningealen Zellen nach 24 h zu einer erhöhten Ependymin-Expression. Meningeale Zellen wurden am Versuchstag (8. Tag) mit 54 µg/ml Ependymin-haltigem (15,5 %) ECF-Extrakt (Kap. 2.6.1) im Kulturmedium (10 % (v/v) ECF-Extrakt) behandelt (Kap. 2.8.2). Nach 1 h bzw. 24 h Inkubation wurde mittels RT-qPCR die mRNA-Menge von *epd1*, *epd2* und *l1-e587* bestimmt und auf die Mittelwerte der scheinbehandelten Kontrollen normalisiert, die mit 10 % (v/v) TBS (*tris buffered saline*) behandelt wurden (mRNA-Verhältnis). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern (Anhang Tab. 7.17). Anzahl der biologischen Replikate (n) ist in den jeweiligen Säulen angegeben.

Die Zugabe des ECF-Extrakts bewirkt nach 1 h mit mRNA-Verhältnissen von 0,925 ± 0,095 (*epd1*; p = 0,4716) und 1,107 ± 0,107 (*epd2*; p = 0,4258) keine signifikante Veränderung (nach Einstichproben-t-Test) der Ependymin-mRNA-Expression. Nach 24 h steigt dagegen das *epd1*-Verhältnis auf 1,486 ± 0,054, das mit p = 0,0584 knapp die Signifikanzgrenze verfehlt. Auf das *epd2*-Verhältnis hat die Zugabe des ECF-Extrakts mit 2,026 ± 0,513 (p = 0,2339) sogar einen noch größeren Einfluss. Das *l1-e587*-Verhältnis ändert sich weder nach 1 h (1,115 ± 0,089; p = 0,3139) noch nach 24 h (1,061 ± 0,108; p = 0,6868) signifikant. Da der ECF-Extrakt in TBS (*tris buffered saline*) gelöst ist, folgte eine Untersuchung auf die Auswirkung von alleiniger Zugabe von TBS auf die Ependymin-mRNA-Expression. In Hinsicht darauf wurde das mRNA-Verhältnis (*epd1*, *epd2, l1-e587*) von unbehandelten gleichaltrigen Zellen derselben Präparation bestimmt. Sowohl das *epd1*-Verhältnis (0,725 ± 0,163; p = 0,2207) als auch das *epd2*-Verhältnis (0,706 ± 0,224; p = 0,2866) ist nach 1 h Inkubation niedriger als der Mittelwert der NRS-Kontrollen. Das *l1-e587*-Verhältnis bleibt dagegen mit 1,011 ± 0,032 (p = 0,7874) auf Kontroll-Niveau. Nach 24 h beträgt das *epd1*-Verhältnis 1,155 ± 0,281 (p = 0,7520), das *epd2*-Verhältnis 1,158 ± 0,206 (p = 0,5565) und das *l1-e587*-Verhältnis 1,247 ± 0,097 (p = 0,1051). Mittels ungepaarter t-Tests konnten weder nach 1 h (*epd1*: p = 0,2946; *epd2*: p = 0,1714; *l1-e587*: p = 0,3260) noch nach 24 h (*epd1*: p = 0,3914; *epd1*: p = 0,1514; *l1*-e587: p = 0,2852) signifikante Unterschiede zwischen ECF-Zugabe und unbehandelte Proben festgestellt werden.

4 DISKUSSION

Nach der in Kap. 1.4 aufgestellten Arbeitshypothese könnte Ependymin ein Schlüsselprotein zur Integration von Stressreaktionen in die Gedächtniskonsolidierung der Knochenfische darstellen. Diese Hypothese wurde aufgestellt, da einerseits *de novo*-synthetisiertes Ependymin essentiell für die Gedächtniskonsolidierung ist (SCHMIDT, 1995; SCHMIDT *ET AL.,* 1995) und andererseits Ependymin nach einer aversiven Verhaltenskonditionierung eine erhöhte Expression aufweist, während die Expression nach einer Stressprozedur sinkt (ROTHER *ET AL.,* 1995). Es wird dabei angenommen, dass Glucocorticoide bei den Zellen in der inneren Schicht der Meninx die Ependymin-Expression regulieren, wobei hohe Konzentrationen hemmend und niedrige Konzentrationen stimulierend wirken. Erlernt ein Tier ein Aversionsverhalten, welches zur Abnahme seines Stressniveaus und damit auch der Glucocorticoid-Konzentration führt, kommt es zur Ependymin-Expression und zur Sekretion und Umverteilung dieser Zelladhäsionsmoleküle im neuralen Parenchym. Dort greifen sie in die synaptische Plastizität ein und tragen zur Konsolidierung von vorher erlernten Verhaltensmustern bei. Um diese Hypothese zu prüfen, ist es nötig den Einfluss von Stresshormonen, insbesondere von Glucocorticoiden, bei der Ependymin-Expression zu untersuchen. Als Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit wurde eine solche Untersuchung *in vitro* an meningealen Zellen von *C. auratus* unternommen.

4.1 Charakterisierung der kultivierten meningealen Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses von Stresshormonen auf die Ependymin-Expression, wurden zunächst Ependymin-exprimierende Zellen aus Goldfisch-Meningen isoliert und kultiviert. Die Ependymin-exprimierenden Zellen wurden dabei immuncytochemisch anhand einer starken granulären Immunreaktivität um die Nuclei erkannt, wobei vier morphologisch unterschiedliche, Ependymin-exprimierende Zelltypen charakterisiert wurden (Abb. 3.1). Wie frühere ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten (ROTHER, 1992; SCHWARZ *ET AL.,* 1993; ROTHER *ET AL.,* 1995), weist eine solche Markierung auf eine Biosynthese am rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) hin. PORRMANN (1998), der ebenso Zellen der Goldfischmeninx kultvierte, berichtete von vergleichbaren Ependymin-exprimierenden Zelltypen. Er teilte sie in Clusterzellen (≙ kleine sternförmige Zellen), retikulär geformte Zellen (≙ stark retikuläre Zellen), flächig ausgebreitete Zellen (≙ länglich retikuläre Zellen) und vielkernige großflächige Zellen (≙ mehrkernige Riesenzellen) ein. Außerdem wies er mittels *in situ*-Hybridisierung an den Zellkulturen bei allen vier Zelltypen eine Ependymin-mRNA-Expression nach.

Es ist anzumerken, dass aufgrund der Isolierungsmethode nicht nur meningeale Zellen in den Primärkulturen zu erwarten sind, sondern auch neurale Zellen (Neurone und Gliazellen). Da eine Ependymin-mRNA-Synthese im Goldfisch nur bei retikulären Zellen der inneren Schicht (IS) der Endomeninx nachgewiesen werden konnte (SCHMIDT *ET AL.,* 1992; LAKOS *ET AL.,* 1994; ROTHER *ET AL.,* 1995), kann eine starke Ependymin-Immunreaktivität um die Nuclei auch als Marker für eine Abstammung aus dieser Schicht herangezogen werden. Nach ultrastrukturellen Untersuchungen wurden die Ependymin-exprimierenden Zellen der Endomeninx oft dem Fibroblasten-Typen zugeordnet (ROTHER *ET AL.,* 1995; SCHMIDT, 1995), allerdings geht man heute davon aus, dass auch Makrophagen in dieser Schicht vorkommen (WANG *ET AL.,* 1995; DECIMO *ET AL.,* 2012). Ob auch Letztere Ependymin exprimieren ist nicht bekannt, allerdings wiesen LAKOS *ET AL.* (1994) einen granulären Zelltypen mit starker Ependymin-Immunreaktivität im neuralen Parenchym um Endothelien nach. Die Autoren vermuten, dass sie aufgrund ihrer Peroxidase-Aktivität zu der Monocyten/Makrophagen-Zelllinie gehören. Da das Gewebe unmittelbar um die Endothelien bis zur *Glia limitans* zur Meninx topologisch äquivalent ist (MERCIER *ET AL.,* 2002), könnte es sich somit um meningeale Ependymin-exprimierende Makrophagen handeln. Aufgrund nicht bekannter Zelltypmarker zur Unterscheidung der Zellen in dieser Schicht wurden übliche Zelltypmarker eingesetzt, die sich bei der Zelltypbestimmung in anderen Geweben bewährt haben.

Zwei der Ependymin-positiven Zelltypen haben eine retikuläre Morphologie (länglich-retikuläre und stark-retikuläre Zellen) und bilden *in vitro* mit ihren zellulären Ausläufern ein netzartiges Geflecht mit großen interzellulären Räumen, das durch ultrastrukturelle Untersuchungen auch bei den Zellen der IS der Endomeninx beobachtet wurde (MOMOSE *ET AL.,* 1988; ROTHER, 1992; MERCIER *ET AL.,* 2002). Weiterhin exprimieren sowohl länglich-retikuläre als auch stark-retikuläre Zellen keine neuralen Zelltypmarker (GFAP als Zelltypmarker vieler Gliazelltypen und Parvalbumin als Zelltypmarker für Neurone). Da beide retikulären Zelltypen eine sehr intensive Ependymin-Immunmarkierung um die Nuclei aufweisen, kann man bei diesen Zellen von einer Ependymin-Synthese ausgehen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl länglich-retikuläre als auch stark-retikuläre Zellen aus der IS der Endomeninx stammen und dort Ependymin exprimieren. Länglich-retikuläre Zellen zeigten zusätzlich eine Fibronektin-Immunreaktivität (Zelltypmarker für Fibroblasten), sodass diese wahrscheinlich zum Fibroblasten-Typen gehören. Auch im Goldfischgehirn konnte Fibronektin vermehrt in der IS der Endomeninx und vermehrt um meningeale Blutgefäße nachgewiesen werden (ROTHER, 1992; ROTHER *ET AL.,* 1995; PORRMANN, 1998). Stark retikuläre Zellen sind dagegen für beide Fibroblasten-Marker (Fibronektin und Vimentin) nicht immunreaktiv, sodass sie vermutlich nicht zu diesem Zelltyp gehören. Möglich ist, dass diese Zellen zur Makrophagen/Monozyten-Zelllinie gehören. Diese

Hypothese sollte bei weiterführenden Untersuchungen durch immuncytochemische Markierung mit gängigen Makrophagen-Markern überprüft werden.

Neben den beiden retikulären Zelltypen wurde eine starke Ependymin-Immunreaktivität um die Nuclei auch bei kleinen sternförmigen Zellen nachgewiesen. Zusätzlich weisen diese Zellen eine Vimentin- und GFAP-Immunreaktivität auf. Während die Expression von Vimentin auf eine mesenchymale Herkunft hinweist, spricht eine GFAP-Expression eher für einen glialen Ursprung. Ausgehend davon, dass Ependymin jedoch nur in der IS der Endomeninx synthetisiert wird (SCHMIDT *ET AL.,* 1992; LAKOS *ET AL.,* 1994; ROTHER *ET AL.,* 1995), ist ein glialer Ursprung unwahrscheinlich. Aufgrund der Vimentin-Immunreaktivität wäre auch ein endothelialer Ursprung möglich, jedoch spricht die GFAP-Immunreaktivität dieser Zellen dagegen. Weiterhin berichten SCHWARZ *ET AL.* (1993), dass Endothelzellen nicht zu den Ependymin-synthetisierenden Zellen gehören. Viel wahrscheinlicher ist, dass es sich hierbei um einen weiteren Fibroblasten-Typen handelt. Zwar ist eine GFAP-Expression für diesen Zelltyp untypisch, jedoch konnte bei Fibroblasten der *Dura mater* (und auch aus anderen Geweben) von Mäusen eine solche Expression nachgewiesen werden (HAINFELLNER *ET AL.,* 2001). Außerdem wurde gezeigt, dass auch humane endomeningeale Zellen nach einer Transplantation ins Rückenmark von Ratten ein Astrozyten-ähnliches Aussehen annehmen und GFAP exprimieren (BERNSTEIN *ET AL.,* 1996). Das weist darauf hin, dass meningeale Zellen bei direktem Kontakt mit neuralen Zellen eine Astrozyten-ähnliche Differenzierung einleiten. Auch die meningealen Zellen der Primärkulturen kommen bei der Isolierung mit neuralen Zellen in Kontakt, wodurch diese vermutlich eine solche Differenzierung einleiten und daraufhin GFAP exprimieren. Es ist also wahrscheinlich, dass kleine sternförmige Zellen zum Fibroblasten-Zelltyp gehören und durch die Isolierung einen unterschiedlichen Phänotyp ausbilden. Diese Hypothese wird durch Studien unterstützt, in denen beobachtet wurde, dass Fibroblasten *in vitro* heterogene Populationen mit unterschiedlichen Phänotypen bilden (PHAN, 2008). BAYREUTHER *ET AL.* (1988) zeigten beispielsweise, dass sich menschliche Fibroblasten aus der Haut *in vitro* spontan entlang einer siebenphasigen Entwicklungslinie in drei verschiedene mitotische und vier verschiedene postmitotische Morphotypen differenzieren. DECIMO *ET AL.* (2012) berichteten weiterhin, dass meningeale Zellen Stammzellcharakter besitzen. So konnten in der Endomeninx von Mäusen neurale Stammzellpopulationen (*neural stem/progenitor cells*) nachgewiesen werden, die *in vivo* bei Rückenmarksverletzungen oder Schlaganfällen aktiviert werden, ins Parenchym migrieren und dort zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten differenzieren (DECIMO *ET AL.,* 2012). In einer anderen Studie konnten postnatale Fibroblasten von Mäusen durch Zugabe von nur drei Faktoren (Ascl1, Brn2 und Myt1l) *in vitro* in funktionale Neurone konvertiert werden (VIERBUCHEN *ET AL.,* 2010). Der physiologische Sinn dieser Multipotenz könnte darin liegen, dass meningeale Fibroblasten zusammen mit Astrozyten eine wichtige Rolle bei akuten und subakuten Reaktionen bei Verletzungen des

zentralen Nervensystems spielen. Meningeale Fibroblasten infiltrieren schnell das verletzte Gewebe, proliferieren und sekretieren dort extrazelluläre Matrixproteine, einschließlich Typ-IV-Kollagen, Fibronektin und Laminin, die zur Vernarbung des verletzten Gewebes beitragen (KAWANO *ET AL.,* 2012). Zusammen mit Astrozyten bilden Fibroblasten eine neue *Glia limitans*, die essentiell für die Wiederherstellung der Blut-Hirn-Schranke und somit der ZNS-Homöostase ist (DECIMO *ET AL.,* 2012). Gesteuert wird diese Differenzierung durch Ephrine der B-Klasse, wobei Ephrin-B2 bei reaktiven Astrozyten und EphB2 als Rezeptor bei Fibroblasten vorkommt. Ein Zellkontakt zwischen diesen Zellen führt damit zur Aktivierung von EphB2 und zur Einleitung der Differenzierung (BUNDESEN *ET AL.,* 2003). Bei der Kultivierung der meningealen Zellen könnte es somit durch Aufeinandertreffen von Astrozyten und meningealen Fibroblasten zu einer solchen Aktivierung kommen, wodurch bei Fibroblasten eine Transdifferenzierung initiiert wird.

Weitere Ependymin-exprimierende Zellen sind mehrkernige Riesenzellen (*multinucleate giant cells*), die durch Fusion verschiedener Zellen, häufig aus der Monocyten/Makrophagen-Zelllinie, entstehen. Die Entstehung mehrkerniger Riesenzellen wurde bei Knochenfischen (*Teleostei*) bereits nach Inkubation von reinen Makrophagen-Kulturen mit allogenetischen Spermatozoen nachgewiesen (SECOMBES, 1985). Diese Zellen sind wie kleine sternförmige Zellen immunreaktiv für Ependymin, GFAP und Vimentin und besitzen bis auf ihre Größe eine ähnliche Morphologie, was auf eine Fusion von Makrophagen mit kleinen sternförmigen Zellen deutet. Das Vorkommen solcher Riesenzellen wäre außerdem ein weiterer Hinweis, dass Makrophagen tatsächlich in den meningealen Kulturen vorkommen und Ependymin exprimieren (siehe stark retikuläre Zellen). Der Anteil dieser Riesenzellen in den meningealen Kulturen ist jedoch so gering (0,6 ± 0,4 %), dass ein möglicher Einfluss in den Expressionsstudien zu vernachlässigen ist.

Weiterhin konnten auch Neurone nachgewiesen werden, die im Vergleich zu den vorher beschriebenen Zelltypen nur eine leichte Ependymin-Immunreaktivität zeigten. Bei diesen Zellen war auch keine typische intensive Immunmarkierung um die Nuclei zu beobachten, sodass man davon ausgehen kann, dass diese Zellen kein Ependymin exprimieren. Die schwache Immunreaktion ist auf eine Bindung an der neuronalen Oberfläche oder auf eine Internalisierung zurückzuführen. Dieses Ergebnis ist mit vorherigen Untersuchungen konsistent, bei denen keine Ependymin-Expression bei Neuronen nachgewiesen werden konnte (ROTHER, 1992; ROTHER *ET AL.,* 1995). Allerdings wurde durch diese Arbeiten eine verstärkte Ependymin-Immunreaktion nach einer operanten Konditionierung bei Typ-I- und Typ-XIV-Neuronen im *Tectum opticum* nachgewiesen (SCHMIDT, 1995), sodass eine Aggregation von sekretierten Ependymin-Molekülen an Neuronen *in vitro* erwartet werden kann.

4.2 Zeitverlauf der Ependymin-Expression in meningealen Primärkulturen

Nach der Isolierung und Kultivierung der meningealen Zellen nahm die Ependymin-Expression in den Primärkulturen stark ab. Die mRNA-Expression beider Ependymin-Gene sank dabei bis zum Kulturalter von acht Tagen um etwa fünf Größenordnungen (Abb. 3.4), die Ependymin-Sekretion der meningealen Zellen ins Kulturmedium um etwa zwei Größenordnungen (Abb. 3.5). Die stärkste Abnahme fand dabei in den ersten Tagen statt, während die Expression bei acht Tage alten Kulturen am stabilsten war. Aus diesem Grund wurden die Experimente zur Beeinflussung der Ependymin-Expression an diesem Zeitpunkt durchgeführt (Kap. 3.3). Der Grund für die Abnahme könnte das Ablösen der Zellen aus ihren Zellverbänden im Rahmen der Isolierung und Kultivierung, sowie das Knüpfen neuer Zell-Zell-Kontakte *in vitro* sein. Wie bereits in Kap. 4.1 dargelegt, wurde bei meningealen Fibroblasten ein multipotenter Charakter beschrieben, wodurch sie zur Transdifferenzierung in verschiedene Zelltypen in der Lage sind. Bei Läsionen des Nervensystems migrieren meningeale Fibroblasten ins Nervengewebe und führen zusammen mit reaktiven Astrozyten zur Vernarbung der Läsion und zur Wiederherstellung der Homöostase des ZNS. *In vitro* sind Fibroblasten in der Lage sich in unterschiedliche Phänotypen zu transdifferenzieren (VIERBUCHEN *ET AL.,* 2010; DECIMO *ET AL.,* 2012). Zur Umsetzung einer solchen Veränderung müssen die meningealen Zellen ihr Genexpressionsmuster anpassen, wodurch auch eine Abnahme der Ependymin-Expression denkbar ist. Für eine persistent hohe Ependymin-Expression, könnten Zellkontakte zu den umgebenden Zelltypen (z.B. Endothelzellen, Perizyten oder Zellen der intermediären meningealen Schicht) und der Basallamina notwendig sein. Eine interessante Studie von MERCIER *ET AL.* (2002) unterstreicht die wichtige Rolle der Basallamina und der Endomeninx für die Differenzierung und Proliferation von Stammzellen. Sie zeigten mittels Konfokal- und Transelektronenmikroskopie an Ratten, dass das Fibroblasten-Makrophagen-Netzwerk der Endomeninx um Blutgefäße herum tief ins neurale Parenchym eindringt. Die Basallamina zweigt weiterhin von den Blutgefäßen ab und dringt extravaskulär bis ins Ependym ein, sodass sie in der subependymalen Zone Kontakt mit neuralen Stammzellen herstellt. Da sich an der Basallamina Wachstumsfaktoren und Cytokine anreichern, die von endomeningealen Zellen produziert werden, ist sie essentiell für die Differenzierung und Proliferation neuraler Stammzellen in der subependymalen Zone (MERCIER *ET AL.,* 2002; DECIMO *ET AL.,* 2012). Es ist daher denkbar, dass multipotente Ependymin-exprimierende Fibroblasten in den Primärkulturen aufgrund von fehlenden Wachstumsfaktoren und Cytokinen transdifferenzieren und im Rahmen dieser Veränderung die Ependymin-Expression herunterregulieren. Hinweise dafür, dass für den Erhalt der Ependymin-Expression solche Signalmoleküle fehlen, lieferte die Behandlung meningealer Zellen mit Ependymin-haltigen Proben (Extrazellulärflüssigkeit (ECF)-Extrakt). Außerdem wurde 24 h nach Zugabe des ECF-Extrakts eine erhöhte Ependymin-Transkription bestimmt (Abb. 3.17). Möglicherweise haben im ECF-Extrakt

enthaltende Wachstumsfaktoren und Cytokine zu der gesteigerten Expression geführt. Es wäre daher sinnvoll den spezifischen Einfluss von Basallamina-assoziierten Wachstumsfaktoren und Cytokinen auf die Differenzierung und der Ependymin-Expression bei meningealen Zellen zu untersuchen.

Die Theorie, dass meningeale Fibroblasten mit der Zeit ihren Phänotyp verändern, wird durch die Zeitverläufe der mRNA-Expressionen der Referenzgene (*gapdh* und *actb;* Anhang Tab. 7.3) unterstützt. Zwar ist nach der Kultivierung der Zellen eine Anpassung an die Kulturbedingungen notwendig, wodurch auch eine Anpassung der Referenzgen-Expression denkbar ist, jedoch schwankt die Expression dieser Gene nach bis zwei Wochen nach Kultivierung der Zellen um etwa eine Größenordnung. Diese hohen Expressionsunterschiede der Referenzgene können darauf hinweisen, dass unter Kulturbedingungen eine Transdifferenzierung bei Ependymin-exprimierenden Zellen stattfindet.

4.3 Regulation der Ependymin-Expression durch Glucocorticoide

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit war die Untersuchung der Regulation der Ependymin-Expression durch Glucocorticoide. Dazu wurden meningeale Zellen mit Cortisol und Corticosteron behandelt, um eine physiologische Stressreaktion *in vitro* zu simulieren. Nach der Arbeitshypothese wurde erwartet, dass diese Behandlung zu einer verminderten Ependymin-Expression führt. Sowohl die Zugabe von Cortisol als auch Corticosteron führte insgesamt nicht zu einer verminderten Ependymin-mRNA-Expression, auch wenn die Expression zweitweise (nach 60 und 180 min) unter Kontrollniveau fiel. Im Zeitverlauf konnte ein zweigipfliger Zeitverlauf beobachtet werden (Maxima nach 40 min und 2 h), wobei Cortisol einen stärkeren Einfluss als Corticosteron hatte. Das kann damit erklärt werden, dass Cortisol eine höhere Affinität zum Glucocorticoid-Rezeptor (GR) besitzt (MOMMSEN *ET AL.,* 1999). Auffällig ist, dass beide Glucocorticoide nach 40 min tendenziell eine Erhöhung (außer bei Corticosteron-Zugabe bei *epd1*) und nach 60 min eine Verringerung der Ependymin-mRNA-Expression verursachen.

Im Vergleich zu der Behandlung der meningealen Zellen mit Glucocorticoiden ist der Zeitverlauf der Ependymin-mRNA-Expression bei Goldfischen nach einer Stressprozedur (nach ROTHER *ET AL.,* 1995; Abb. 4.1-A) innerhalb der ersten Stunde sehr ähnlich (Abb. 4.1-B). Damit konnte der Einfluss einer Stressprozedur mit dem *in vitro*-Modell zumindest teilweise simuliert werden. Allerdings sinkt 60 min nach der Stressprozedur die Ependymin-mRNA-Expression auf etwa 60 % vom Kontrollwert (ähnlich wie durch Glucocorticoid-Behandlung ohne Einbezug des Ausreißer-Werts) und bleibt mehrere Stunden unter Kontrollniveau, während die Ependymin-mRNA-Expression 90 min und 120 min nach Cortisol-Behandlung über dem Kontrollwert liegt. Diese Unterschiede sind jedoch nicht verwunderlich, da das *in vitro*-Experiment eine starke

Vereinfachung der Stressprozedur am Tier darstellt. Erstens verursacht eine Stressreaktion auch die Ausschüttung anderer Stresshormone (WENDELAAR BONGA, 1997), die in die Regulation der Ependymin-mRNA-Expression eingreifen könnten. Zweitens wurde eine Cortisol-Behandlung der Kulturen durch ein Mediumwechsel (Cortisol-freies Medium wurde durch 6250 µg/l Cortisol-haltiges Medium ersetzt) umgesetzt, sodass im Gegensatz zu einer Stressprozedur eine viel schnellere und extremere Änderung der Cortisol-Konzentration stattfand.

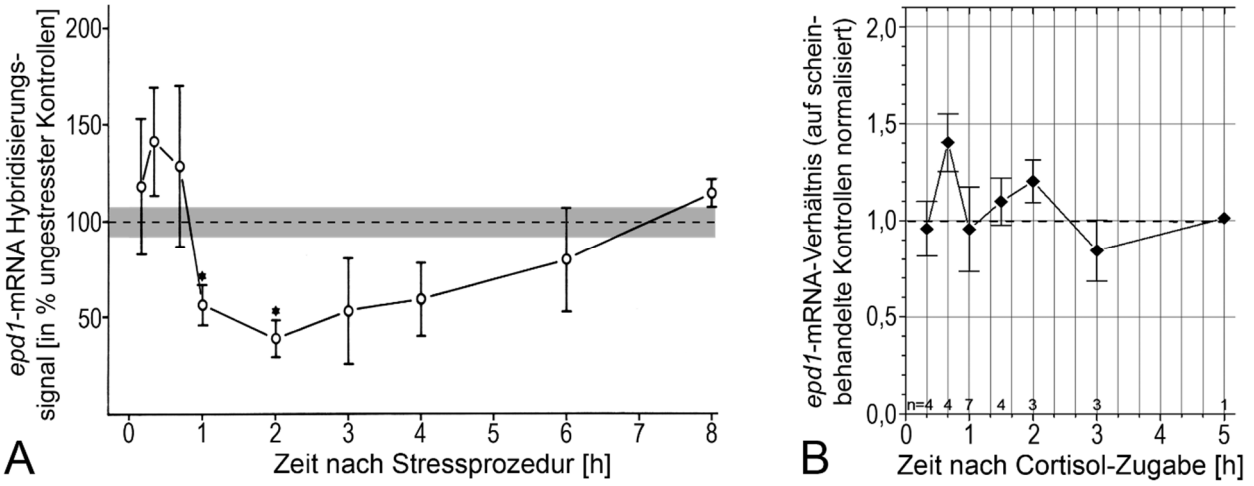


Abb. 4.1: Vergleich der Zeitverläufe der *epd1*-mRNA-Expression nach einer Stressprozedur bei Goldfischen und einer Cortisol-Zugabe bei meningealen Kulturen. A: Zeitverlauf nach einer Stressprozedur bei Goldfischen nach ROTHER *ET AL.* (1995) mittels *in situ*-Hybridisierung bestimmt (aus Abb. 1.2-B) **B:** Zeitverlauf nach Cortisol-Zugabe in meningealen Kulturen (aus Abb. 3.7).

Im Gegensatz zu einer Stressprozedur lernt ein Goldfisch bei einer aversiven Verhaltenskonditionierung einen roten Lichtreiz (konditionierter Stimulus) zu meiden, welcher mit einem Stromreiz (unkonditionierter Stimulus) gekoppelt wird. Nach dem Lernen wurde eine erhöhte Ependymin-mRNA-Expression im Gehirn von Goldfischen nachgewiesen (ROTHER, 1992; ROTHER *ET AL.,* 1995; Abb. 4.2-A). Diese weist einen zweigipfligen Verlauf mit relativem Maximum innerhalb der ersten Stunde und absolutem Maximum nach 2 h auf (Abb. 4.2-A). Die Expression bleibt dabei mindestens 4 h signifikant über dem Kontrollniveau. Es wird angenommen (siehe Arbeitshypothese; Kap. 1.4), dass nach dem Erlernen des Aversionsverhaltens die Stressreaktion abklingt, wodurch die Ependymin-Synthese induziert wird. Dementsprechend wurde in dieser Arbeit *in vitro* eine nachlassende physiologische Stressreaktion durch Cortisol-Entzug simuliert. Durch diese Behandlung steigt die Ependymin-mRNA-Expression nach 60 und 75 min signifikant auf über das Doppelte an (Abb. 4.2-B), allerdings fällt die Expression schon nach 90 min wieder auf Kontrollniveau ab. Demzufolge ist der Effekt durch eine Verhaltenskonditionierung der Tiere deutlich persistenter als durch einen Cortisol-Entzug *in vitro* (Abb. 4.2). Der Grund dafür könnte darin liegen, dass im Unterschied zur Verhaltenskonditionierung am Tier,

auch bei diesem *in vitro*-Experiment die Änderung der Cortisol-Konzentration extremer und schneller verläuft.

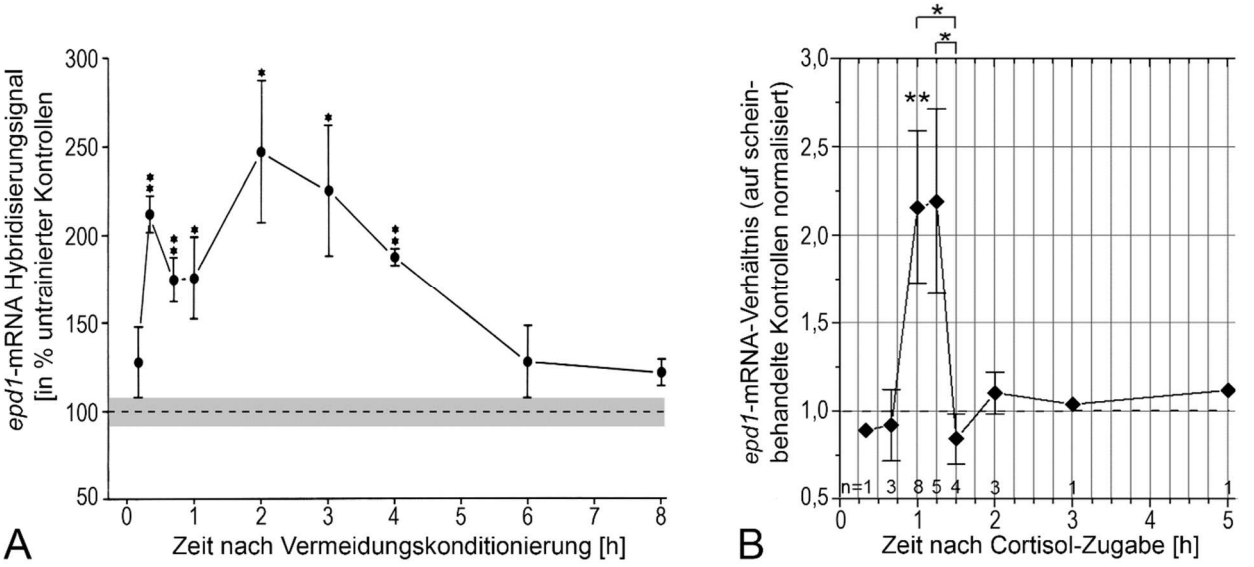


Abb. 4.2: Vergleich der Zeitverläufe der *epd1*-mRNA-Expression nach einer aversiven Verhaltenskonditionierung bei Goldfischen und Cortisol-Entzug bei meningealen Kulturen. A: Zeitverlauf nach einer aversiven Verhaltenskonditionierung von Goldfischen nach ROTHER *ET AL.* (1995) mittels *in situ*-Hybridisierung bestimmt (aus Abb. 1.2-B) **B:** Zeitverlauf nach Cortisol-Entzug in meningealen Kulturen (aus Abb. 3.9).

Auch auf Protein-Ebene wird durch Cortisol-Entzug in den meningealen Zellen ein leichter transienter Effekt auf die Ependymin-Expression verzeichnet (Abb. 3.11). In den Zellen und im Medium ist die Ependymin-Konzentration nach 1 h nur sehr leicht über Kontrollniveau erhöht. Allerdings steigt die Konzentration im Medium nach 2 h auf etwa das Doppelte an, während die Konzentration in den Zellen auf Kontrollniveau bleibt. Der Grund dafür könnte darin liegen, dass synthetisierte Ependymin-Moleküle schnell ins Medium sekretiert werden, sodass in den meningealen Zellen keine erhöhte Konzentration zu messen ist. Anschließend sinkt auch nach 3 h die Ependymin-Konzentration im Kulturmedium auf Kontrollniveau. Dies weist darauf hin, dass Ependymin-Moleküle unter Kulturbedingungen entweder Abbauprozessen unterliegen oder eine Aggregation an den Zellen stattfindet, sodass die Moleküle nicht im Kulturmedium gelöst bleiben. Letztere Hypothese wird dadurch unterstützt, dass die Ependymin-Immunreaktivität mit dem Kulturalter zunimmt (Abb. 3.6), obwohl gleichzeitig die Ependymin-mRNA-Expression stark abnimmt (Abb. 3.4). Die Gründe, die zu einer solchen Anlagerung geführt haben könnten, werden in Kap. 4.4 diskutiert.

Die in Kap. 1.4 beschriebene Arbeitshypothese, bei der steigende Cortisol-Konzentrationen inhibierend und sinkende Konzentrationen stimulierend auf die Ependymin-Expression wirken, kann nach den erzielten Ergebnissen nicht in dieser Form beibehalten werden. Zwar verursacht

ein Cortisol-Entzug einen transienten positiven Einfluss, eine Cortisol-Behandlung jedoch keinen eindeutigen negativen Einfluss auf die Ependymin-mRNA-Expression. Die Arbeitshypothese kann jedoch erweitert werden, wodurch sowohl die Ergebnisse dieser Arbeit als auch die Ergebnisse von ROTHER *ET AL.* (1995) zu erklären sind. Möglicherweise reguliert ein Dosis-abhängiger Mechanismus mit invertiertem U-förmigen Verlauf die Ependymin-mRNA-Expression. Dabei wirkt eine moderate Cortisol-Konzentration stimulierend, während eine sehr niedrige sowie eine sehr hohe Konzentration die Ependymin-mRNA-Expression inhibiert (zur Übersicht Abb. 4.3). Ein solcher Dosis-abhängiger invertierter U-förmiger Effekt durch Stresshormone ist bereits mehrfach in Verbindung mit der Gedächtnisbildung berichtet worden. Verschiedene Studien zeigten, dass moderater Stress für die Gedächtnisbildung förderlich ist, während starker Stress hemmend wirkt (MCEWEN & SAPOLSKY, 1995; DE KLOET *ET AL.,* 1999; SANDI & PINELO-NAVA, 2007). Es gibt mehrere Hinweise, dass dieser Effekt durch eine Glucocorticoid-vermittelte, Dosis-abhängige Aktivierung von zwei verschiedenen Corticosteroid-Rezeptor-Typen verursacht wird (MCEWEN & SAPOLSKY, 1995; MAGGIO & SEGAL, 2010). Dabei wird angenommen, dass bei basalen Konzentrationen an Glucocorticoiden vermehrt der hochaffine Mineralcorticoid-Rezeptor (MR; auch Typ-I-Rezeptor genannt) aktiviert vorliegt, der Gene transaktiviert, die kognitive Fähigkeiten und Gedächtnisbildung verbessern. Wenn die Glucocorticoid-Konzentration jedoch über eine bestimmte Schwelle ansteigt, liegen die MR-Glucocorticoid-Komplexe gesättigt vor, wodurch zusätzlich der weniger affine Glucocorticoid-Rezeptor (GR; auch Typ-2-Rezeptor genannt) aktiviert wird. Das führt zur Beeinträchtigung der kognitiven Fähigkeiten und der Gedächtnisbildung (MCEWEN & SAPOLSKY, 1995). Im Zusammenhang mit der Expressions-regulation der Ependymin-Gene könnte eine Aktivierung des MR induzierend und eine Aktivierung des GR reprimierend auf die Expression wirken. Diese Theorie wird im Folgenden genau erläutert.

Bei der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) konnte gezeigt werden, dass kurz nach einem fünfminütigen erschöpfenden Training die Plasma-Cortisol-Konzentration auf etwa das fünffache ansteigt, 2 h auf diesem Niveau verbleibt und im Verlauf von weiteren 4 h langsam wieder auf Kontrollniveau fällt (MILLIGAN, 1997). Bei der Annahme, dass ein solcher Verlauf auch nach aversiver Verhaltenskonditionierung bei Goldfischen (Abb. 4.2-A) stattfindet, diffundiert Cortisol über die meningealen Endothelien langsam zu den meningealen Zellen und verursacht dort eine Aktivierung des MR, wodurch die Ependymin-mRNA-Synthese induziert wird. Möglicherweise steigt bei der von ROTHER *ET AL.* (1995) durchgeführten aversiven Verhaltenskonditionierung die Cortisol-Konzentration kurzzeitig über die Aktivierungsschwelle des GR an. Dadurch fällt die Ependymin-mRNA-Expression nach 40 min kurzzeitig leicht ab, bevor sie nach 2 h das absolute Maximum erreicht, sodass sich ein zweigipfliger Verlauf ergibt. Im Laufe von weiteren 4 h fällt die Cortisol-Konzentration vermutlich wieder auf Basislevel ab, sodass auch die Ependymin-mRNA-

Expression Kontrollniveau erreicht. Durch den *in vitro*-Cortisol-Entzug (Abb. 4.2-B) nahm die Ependymin-mRNA-Expression erst nach 1 h signifikant zu. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich an der sehr hohen Cortisol-Konzentration (6250 µg/l) in der die Zellen vor dem Entzug aufgezogen wurden. Diese entspricht etwa der 25-fachen Menge der höchsten Tageskonzentration unter nicht gestressten Bedingungen. Das nach dem Entzug in den Zellen verbliebene Cortisol diffundiert sukzessiv ins Medium, sodass die lokale Cortisol-Konzentration mit der Zeit abnimmt. Der verzögerte Anstieg der Ependymin-mRNA-Expression könnte daher resultieren, dass die lokale Cortisol-Konzentration erst nach 1 h unterhalb der GR-Aktivierungsschwelle sinkt. Nach 90 min ist jedoch die Cortisol-Konzentration soweit abgefallen, dass die Ependymin-mRNA-Expression wieder Kontrollniveau erreicht.

Im Gegensatz zu einer aversiven Verhaltenskonditionierung verursacht eine Stressprozedur, in der ein Tier der gleichen Anzahl, jedoch unkontrollierbaren und unvorhersehbaren Stressreizen ausgesetzt wird, eine viel stärkere Stressreaktion (MINEKA & HENDERSEN, 1985). Einer solchen Stresssituation sind auch die Versuchstiere bei der Stressprozedur nach ROTHER *ET AL.* (1995) ausgesetzt, die mit Lichtreizen und Stromschlägen in zufälliger Reihenfolge behandelt wurden (Abb. 4.1-A). Durch die daraus resultierende heftigere und persistentere Stressreaktion wird die Aktivierungsschwelle des GR schnell überschritten. Dadurch kommt es zunächst zum kurz-zeitigen Anstieg der Ependymin-mRNA-Expression nach 40 min, bevor sie nach 60 min auf etwa 50% des Kontrollniveaus fällt. Da die Cortisol-Konzentration anschließend längere Zeit über der Aktivierungsschwelle des GR verbleibt, kommt es zu einer langandauernden (bis zu 6 h) verringerten Ependymin-mRNA-Expression. Ebenso nimmt die mRNA-Expression der *in vitro* Cortisol-behandelten Zellen nach 40 min kurzzeitig zu (Abb. 4.1-B). Dieses Ergebnis kann ebenfalls, wie bei einer Stressprozedur der Goldfische, durch eine schnelle Überschreitung der GR-Aktivierungsschwelle erklärt werden. Im weiteren Verlauf kommt es jedoch, trotz negativer Tendenz nach 1 und 3 h, nicht zu einem eindeutigen Absinken der Ependymin-mRNA-Expression. Der Grund dafür könnte darin liegen, dass vor der Cortisol-Behandlung im Kulturmedium Cortisol vollständig fehlt, während im Blutplasma des Goldfisches eine basale Konzentration an Cortisol auch unter ungestressten Bedingungen vorhanden ist. Dadurch liegen *in vivo* einige MR-Komplexe auch unter ungestressten Bedingungen durch Cortisol aktiviert vor, sodass es zu einer basalen Ependymin-mRNA-Expression kommt. Dementsprechend kann, im Gegensatz zu dem *in vitro*-Versuch, die Ependymin-mRNA-Expression bei einem starken Anstieg der Cortisol-Konzentration unter Kontrollniveau fallen.

Die Voraussetzung für eine Regulation der Ependymin-mRNA-Expression mittels MR und GR ist, dass meningeale Zellen der Goldfische sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beide Rezeptor-Typen exprimieren. Genomanalysen haben gezeigt, dass bei *Teleostei* zwei GR-Isoformen (GR1 und

GR2) und ein MR vorhanden sind (BURY & STURM, 2007). In meningealen Kulturen konnte bei allen Ependymin-exprimierenden Zelltypen mittels Immuncytochemie eine GR-Immunreaktivität nachgewiesen werden, auch wenn Neurone die stärkste GR-Immunreaktivität zeigten. Immunhistochemische Untersuchungen zum MR in meningealen Kulturen von Goldfischen fehlen bislang und sollten deshalb als Voraussetzung für einen Nachweis der Transaktivierung der Ependymin-Gene über diesen Rezeptor nachgeholt werden. Allerdings wurde bereits mehrfach berichtet, dass GR1, GR2 und MR im Gehirn der *Teleostei* exprimiert werden (BURY & STURM, 2007; STOLTE *ET AL.,* 2008; TAKAHASHI & SAKAMOTO, 2013). Aus diesem Grund ist eine Beteiligung der Corticosteroid-Rezeptoren bei der Regulation der Ependymin-mRNA-Expression und Gedächtnisbildung wahrscheinlich. Es liegen jedoch keine Daten zur spezifischen Expression dieser Rezeptoren in der Meninx vor. Daher sollten *in situ*-Hybridisierungen mit spezifischen Antisense-Sonden für GR1, GR2 und MR an Gehirnschnitten durchgeführt werden, um Hinweise auf eine mRNA-Expression in der Meninx zu erhalten.

Um den Einfluss des GR bei der Ependymin-Expression zu untersuchen, wurden in Cortisol-haltigem Medium kultivierte meningeale Zellen mit einem spezifischen GR-Antagonisten (RU486) behandelt. Die Inaktivierung des GR verursachte 1 h nach Behandlung eine noch höhere Ependymin-mRNA-Expression als ein Cortisol-Entzug (Abb. 3.13). Im Umkehrschluss müsste eine Aktivierung des GR tatsächlich zur Transrepression der Ependymin-Gene führen. Das kann einerseits durch Bindung des aktivierten GR-Rezeptor-Komplexes an *negative glucocorticoid response elements* (nGRE) in der 5‘-Promotorregion der Ependymin-Gene stattfinden (UMLAND *ET AL.,* 2002). Andererseits könnte der GR-Rezeptor-Komplex die Aktivität von anderen Transkriptionsfaktoren, die normalerweise eine Ependymin-Expression induzieren, negativ modulieren (KASSEL & HERRLICH, 2007). Die Tatsache, dass RU486 die Transkription der Ependymin-mRNA noch stärker induziert als ein Cortisol-Entzug, ist ein Hinweis, dass die Transaktivierung der Ependymin-Gene nicht über den GR vermittelt wird. Da RU486 den GR inhibiert, nicht aber den MR, könnte Letzterer für die Transaktivierung der Ependymin-Gene verantwortlich sein. Ist das der Fall, müsste durch die hohe Cortisol-Konzentration der MR aktiviert vorliegen, wodurch der hohe Effekt zu erklären wäre. Der Cortisol-Entzug mit gleich-zeitiger RU486-Behandlung führte zu einem weniger hohen Effekt, was wiederum dadurch erklärt werden kann, dass der MR aufgrund der abnehmenden Cortisol-Konzentration weniger stark aktiviert wurde. Um diese Hypothese zu bestätigen, sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig, unter anderem mit längeren Inkubationszeiten von RU486. Sollte dieser Dosis-abhängige Effekt auf die Ependymin-mRNA-Expression tatsächlich durch den MR und den GR vermittelt werden, dürfte RU486 als spezifischer GR-Inhibitor (im Gegensatz zu einem Cortisol-Entzug) zu einer dauerhaft erhöhten Expression führen. Um einen Einfluss des MR bei dieser Regulation zu bestätigen, sollten außerdem Behandlungen an meningealen Zellen mit

Spironolacton oder RU26752 als spezifische MR-Antagonisten und mit 11-Deoxycorticosteron als spezifischer MR-Agonist durchgeführt werden.

Ähnliche Versuche wurden auch mit Kulturen durchgeführt die vor dem Versuch nicht mit Cortisol behandelt wurden. Bei einer gleichzeitigen Behandlung mit RU486 und Cortisol wurde eine erhöhte Ependymin-mRNA-Expression erwartet, da aufgrund der hohen Cortisol-Konzentration der MR aktiviert und der GR durch den Antagonisten inaktiviert vorliegen müsste. Allerdings verursachte diese Behandlung keine Veränderung der Ependymin-mRNA-Expression (Abb. 3.14). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass meningeale Zellen nach der Präparation der Kulturen acht Tage nicht mit Glucocorticoiden in Kontakt gekommen sind. Es ist denkbar, dass aufgrund eines langfristigen Fehlens von Glucocorticoiden die MR-Expression herunterreguliert wird, wodurch Glucocorticoide keinen messbaren Einfluss mehr auf die Ependymin-mRNA-Expression ausüben. Um die Antwortfähigkeit auf diese Hormone aufrecht zu erhalten, könnte daher ein basales Level an Glucocorticoiden benötigt werden. STOLTE *ET AL.* (2008) haben tatsächlich gezeigt, dass die mRNA-Expressionen der Corticosteroid-Rezeptoren (GR1, GR2 und MR) des Karpfens (*Cyprinus carpio*) nach einer Kältestressprozedur (*cold transfer stress*) um etwa 50 % herunter reguliert werden. Ein solcher Regulationsmechanismus der Expression von Corticosteroid-Rezeptoren wäre sinnvoll, um durch Veränderung des MR/GR-Verhältnisses den Organismus beispielsweise bei Stressperioden anzupassen. Es wäre daher sinnvoll, bei meningealen Zellen die mRNA-Expression (mittels RT-qPCR) der Corticosteroid-Rezeptoren unter Einfluss von Glucocorticoiden zu untersuchen.

Die Wirkung eines Cortisol-Entzugs auf die Ependymin-mRNA-Expression wurde bei vorheriger Zugabe von unterschiedlichen Cortisol-Konzentrationen untersucht. Der stärkste Effekt wurde bei einem Entzug der höchsten Cortisol-Konzentration (6250 µg/l) bestimmt (Abb. 3.10). Der Entzug von niedrigeren Cortisol-Konzentrationen (250 und 1250 µg/l) führte nach 1 h nur zu einem leichten Anstieg der Ependymin-mRNA-Expression. Allerdings wurden bei diesen Behandlungen keine kürzeren Entzugszeiten als 1 h getestet. Denkbar wäre, dass die lokale Cortisol-Konzentration bei diesen Versuchen schneller unter die GR-Aktivierungsschwelle fällt und anschließend schneller den Basislevel erreicht, wodurch der Effekt zum getesteten Zeitpunkt nach 1 h schon vorüber ist. Daher sollten in weiterführenden Untersuchungen bei niedrigeren Cortisol-Konzentrationen kürzere Entzugszeiten getestet werden.

Durch die Theorie der Dosis-abhängigen Aktivierung mittels Glucocorticoiden könnte auch erklärt werden, warum die Ependymin-Expression nach Beginn der Kultivierung der meningealen Zellen stark abnimmt. Wie bereits angedeutet, könnte das an einem Mangel an Glucocorticoiden im Kulturmedium liegen. Wenn eine MR-Aktivierung für die Transkription der Ependymin-Gene

benötigt wird, würde bei einem Mangel von Glucocorticoiden eine Transaktivierung der Ependymin-Gene unterbleiben. Aus diesen Gründen wäre eine Versuchsreihe mit basalen Cortisol-Konzentrationen sinnvoll, um eventuell den Konzentrationsbereich zu bestimmen, an dem der MR aber nicht der GR aktiviert vorliegt, sodass die Ependymin-Expression ansteigt.

Stressreaktionen sind sehr komplexe physiologische Abläufe (zur Übersicht Kap. 1.2) die nicht nur über Glucocorticoide, sondern auch über Katecholamine und anderen Stresshormonen vermittelt werden. Daher muss berücksichtigt werden, dass *in vivo* potentiell noch andere Stresshormone bei der Regulation der Ependymin-Expression eingreifen. In Nebenversuchen wurde 1 und 2 h nach Behandlung meningealer Kulturen mit ähnlich hohen Konzentrationen an Adrenalin und Noradrenalin kein Effekt auf die Ependymin-mRNA-Expression nachgewiesen (nicht gezeigt). Auch die Behandlung mit ACTH oder Met-Enkephalin verursachte nach 1 h keine Veränderung der Ependymin-mRNA-Expression (nicht gezeigt). Weitere Hormone, die für diese Regulation in Betracht kommen sind Mineralcorticoide, die ebenso bei Stressreaktionen ausgeschüttet werden und in der Lage sind beide Corticosteroid-Rezeptoren (GR und MR) zu aktivieren (BURY & STURM, 2007). Außerdem könnten auch Sexualhormone (Estrogene, Gestagene und Androgene) aufgrund ihrer molekularen Ähnlichkeit zu Corticosteroiden Einfluss auf die Ependymin-mRNA-Expression haben. Es wurden bereits weitgehendende Effekte auf das serotonerge System, das noradrenerge System und das cholinerge System des basalen Vorderhirns und dem Hippocampus berichtet, wodurch Sexualhormone auch Lern- und Gedächtnisprozesse modulieren (MCEWEN, 2002). Daher scheint eine Beeinflussung der Ependymin-mRNA-Expression durch Sexualhormone denkbar. Zusätzlich könnten auch im zentralen Nervensystem produzierte Neurosteroide Einfluss auf die Ependymin-Expression haben. Neurosteroide modulieren Neurotransmitter-Rezeptoren, Ionenkanäle und Ionenpumpen und haben somit physiologische Auswirkungen auf Kognition und Verhalten des Organismus (SPINDLER, 1997, S. 129). Abhängig vom Neurosteroid-Typ, können sie die Bindung von γ-Aminobuttersäure (GABA) am $GABA_A$-Rezeptor sowohl fördern als auch hemmen, wodurch sie Einfluss auf die Öffnungszeit des Kanals haben. Als wichtigster inhibitorischer Rezeptor im zentralen Nervensystem führt eine Modulation des $GABA_A$-Rezeptors auch zu einer Modulation der neuronalen Aktivität und des Verhaltens (SPINDLER, 1997, S. 129).

4.4 Einfluss einer Feedback-Hemmung bei der Ependymin-Expression

Das Prinzip der Feedback-Hemmung ist in der Biologie, vor allem bei der Regulation des Stoffwechsels, des Nervensystems und des Hormonsystems, weit verbreitet. Es gibt mehrere Hinweise, dass auch die Ependymin-Expression durch eine Feedback-Hemmung reguliert wird (SCHMIDT, 1987; ROTHER *ET AL.,* 1995). Ein solcher Mechanismus könnte bei der Gedächtnis-konsolidierung dazu beitragen, eine durch Glucocorticoide induzierte erhöhte Ependymin-

Expression (Kap. 4.3) zeitlich einzugrenzen, damit spezifisch diejenigen Synapsen verstärkt werden, die im Zeitraum des Lernereignisses aktiviert wurden (zur Übersicht Abb. 4.3-C; S. 94).

Nach einer Behandlung meningealer Kulturen mit spezifischen anti-Ependymin Antiseren konnte nach 1 h eine bis zu 2,5-fache Steigerung der Ependymin-mRNA-Expression nachgewiesen werden (Abb. 3.16). Auch bei Goldfischen führten intracerebroventrikuläre Injektionen von anti-Ependymin Antiseren nach 3 h zu einer signifikanten Erhöhung der Ependymin-mRNA-Expression um 28 % im Vergleich zu scheinbehandelten Kontrollen (ROTHER *ET AL.,* 1995). Wahrscheinlich führt eine solche Behandlung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu einer reduzierten Feedback-Hemmung, die in eine erhöhte Ependymin-mRNA-Expression resultiert.

Darüber hinaus existieren weitere indirekte Hinweise für einen negativen Feedback-Mechanismus. Beispielsweise nimmt sowohl die Ependymin-mRNA-Expression als auch die Menge des sekretierten Ependymins nach Beginn der Kultivierung der meningealen Zellen stark ab (Abb. 3.4 und Abb. 3.5), während gleichzeitig die Ependymin-Immunreaktivität und die Anzahl Ependymin-positiver Zellen in den Kulturen ansteigt (Abb. 3.6). Diese extrem unterschiedlichen Ergebnisse lassen vermuten, dass sekretiertes Ependymin nicht im Zellkulturmedium gelöst bleibt, sondern an meningealen Zellen anlagert. Eine Aggregation könnte bei den Zellen eine Feedback-Hemmung induzieren und damit die Ursache für die Abnahme der mRNA-Expression und Sekretion von Ependymin darstellen. Diese Hypothese wird auch dadurch unterstützt, dass 2 h nach Cortisol-Entzug eine erhöhte Ependymin-Konzentration im Kulturmedium bestimmt wurde, jedoch nicht nach 3 h (Abb. 3.11). Scheinbar werden Ependymin-Moleküle nach einem Cortisol-Entzug ins Kulturmedium sekretiert, allerdings lagern sich diese nach kurzer Zeit an den Zellen an, sodass die Konzentration im Medium wieder sinkt.

Es ist allerdings auch zu erwähnen, dass einige Ergebnisse zunächst gegen eine Regulation durch Feedback-Hemmung sprechen. Beispielsweise hatte die Behandlung von meningealen Zellen mit Ependymin-haltigen Proben (Extrazellulärflüssigkeit (ECF)-Extrakt) nach 1 h keine Auswirkung auf die mRNA-Expression (Abb. 3.17). Die Erklärung könnte darin liegen, dass aufgrund der Ependymin-Aggregation an den Zellen bereits eine Feedback-Hemmung induziert wird, sodass eine Behandlung mit ECF-Extrakt keine weitere Inhibierung der Ependymin-Expression bewirkt. Darüber hinaus verursachte eine solche Behandlung nach 24 h sogar eine Erhöhung des Ependymin-mRNA-Levels. Letzterer Effekt ist dadurch zu erklären, dass der ECF-Extrakt keine reine Ependymin-Probe ist, sodass möglicherweise enthaltende Wachstums-faktoren und Cytokine stimulierend auf die Ependymin-Expression wirken könnten (siehe Kap. 4.2).

Es wäre erstrebenswert den Grund für eine solche Aggregation in den Kulturen zu untersuchen, da unter Umständen neue Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen von Ependymin gewonnen werden könnten. Durch Verhinderung einer solchen Aggregation könnte das in der vorliegenden Arbeit etablierte *in vitro*-Modell entscheidend optimiert werden. Die Ursache für die Aggregation, könnte mit der Fähigkeit von Ependymin-Molekülen zusammenhängen, in Abwesenheit von zweiwertigen Kationen zu unlöslichen Fasern (*fibrous insoluble polymers*; FIPs) zu polymerisieren (SHASHOUA, 1988). Nach SHASHOUA (1991) ist für eine Polymerisierung der Ependymin-Moleküle eine Reduzierung der in der Cerebrospinalflüssigkeit enthaltenden Ca^{2+}-Konzentration (2,5 mM; SHASHOUA, 1985) um 50 % notwendig. Auch GANSS & HOFFMANN (2009) konnten zeigen, dass Ependymin-Moleküle abhängig von der Ca^{2+}-Konzentration zwei verschiedene Konformationen mit scharfem Übergang bei 1 mM einnehmen. Da im Kulturmedium die Ca^{2+}-Konzentration etwa 1 mM beträgt, ist eine Polymerisierung und Anlagerung von Ependymin-Molekülen unter Kulturbedingungen denkbar. Um diesen Sachverhalt zu klären, wären daher weiterführende Untersuchungen an meningealen Zellen notwendig, die mit erhöhter Ca^{2+}-Konzentration (2,5 mM) kultiviert werden. Mittels Immuncytochemie könnte untersucht werden, ob auch unter diesen Bedingungen eine Aggregation der Ependymin-Moleküle stattfindet. Weiterhin kann mittels RT-qPCR untersucht werden, ob die Ependymin-mRNA-Expression im Zeitverlauf weiterhin im gezeigten Ausmaß abfällt. Sollte durch die erhöhte Ca^{2+}-Konzentration keine Ependymin-Aggregation mehr stattfinden, könnten die Versuche mit reineren Ependymin-Proben (mittels Affinitätschromatographie und Gelfiltration aufgereinigt) wiederholt werden. Dadurch kann der Feedback-Mechanismus unter optimierten Bedingungen untersucht werden.

4.5 Bedeutung der Ependymin-Expression für die synaptische Plastizität

Im Gehirn werden die über die Sinnesorgane eingegangenen Informationen durch ein komplexes Bewertungssystem nach ihrer Relevanz gefiltert, sodass nur wichtige Inhalte im Langzeitgedächtnis gespeichert werden (MCEWEN & SAPOLSKY, 1995). Bei diesem Bewertungssystem greifen Stressreaktionen auf vielfältige Weise in die Speicherung ein und können aufgrund ihrer Diversität sowohl positive als auch negative Einflüsse auf das Gedächtnis haben (DE KLOET *ET AL.,* 1999; SANDI & PINELO-NAVA, 2007). Beispielsweise wirken Stresshormone Dosis-abhängig in einem invertierten U-förmigem Verlauf auf die Gedächtnisbildung (MCEWEN & SAPOLSKY, 1995; BALDI & BUCHERELLI, 2005). Zudem hat akuter Stress eine positive Auswirkung, während sich chronischer Stress störend auf die Gedächtnisbildung auswirkt (SANDI & LOSCERTALES, 1999). Auch wurde bereits erwähnt, dass kontrollierbare und vorhersehbare Stressoren eine positive Auswirkung auf Kognition und Gedächtnisbildung haben, während unkontrollierbare und unvorhersehbare Stressoren eine hemmende Wirkung entfalten (MINEKA & HENDERSEN, 1985). Schließlich wurden unterschiedliche Effekte auch zwischen intrinsischem

(Stressor wurde durch die kognitive Aufgabe ausgelöst) und extrinsischem Stress (Stressor ist unabhängig von der kognitiven Aufgabe) berichtet (SANDI & PINELO-NAVA, 2007).

Um den Einfluss von Stressreaktionen auf die Gedächtnisbildung zu verstehen, müssen die Mechanismen entschlüsselt werden, auf welche Weise Stress seine Wirkung auf die neuronale Verschaltung entfaltet. Da die Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses abhängig von der Proteinbiosynthese ist (AGRANOFF *ET AL.,* 1965; MALENKA & BEAR, 2004), ist es denkbar, dass Stresshormone während Lernsituationen die Expression von Plastizitäts-assoziierten Proteinen modulieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *in vitro* die Ependymin-Expression einer Regulation durch Cortisol unterliegt (Kap. 4.3). Für die Gedächtniskonsolidierung ist eine *de novo*-Synthese von Ependymin-Molekülen essentiell (SCHMIDT, 1995; SCHMIDT *ET AL.,* 1995). Somit könnten Stressreaktionen durch die Cortisol-vermittelte Regulation der Ependymin-Expression in die synaptische Plastizität integriert werden. Aufgrund mehrerer Indizien wurde die Hypothese aufgestellt, dass Glucocorticoide die Ependymin-Expression durch eine Dosis-abhängige Aktivierung von Mineralcorticoid-Rezeptoren (MR) und Glucocorticoid-Rezeptoren (GR) regulieren (Kap. 4.3). Es wird angenommen, dass Glucocorticoid-Konzentrationen unterhalb der GR-Aktivierungsschwelle insbesondere eine Aktivierung des MR verursachen, wodurch die Ependymin-Synthese induziert wird (Abb. 4.3-A und B). Steigt die Konzentration über diese Schwelle an, sind die MR-Glucocorticoid-Komplexe gesättigt, sodass durch die zusätzliche Aktivierung des GR die Ependymin-Synthese inhibiert wird. Durch diesen Mechanismus induzieren moderate akute Stressreaktionen, wie sie bei relevanten Lernsituationen (z. B. bei aversiver Verhaltenskonditionierung) auftreten, die Ependymin-Synthese (Abb. 4.3-A). Daraufhin diffundieren Ependymin-Moleküle in das neurale Parenchym und verursachen bei denjenigen Synapsen, die während des Lernereignisses aktiviert wurden, eine plastische Veränderung, wodurch das vorher erlernte Verhaltensmuster konsolidiert wird (Abb. 4.3-C). Da in radiären Gliazellen eine Ependymin-Immunreaktivität nachgewiesen werden konnte (ROTHER *ET AL.,* 1995), ist es denkbar, dass diese Zellen an der Verteilung der Ependymin-Moleküle beteiligt sind (Abb. 4.3-C). Im Gegensatz zu einer aversiven Verhaltenskonditionierung, ist eine Stressprozedur mit einer heftigeren und langandauernden Stressreaktion verbunden, da das Tier einer unkontrollierbaren und unvorhersehbaren Stresssituation ausgesetzt ist (MINEKA & HENDERSEN, 1985). Die daraus resultierende höhere Serum-Cortisol-Konzentration führt demnach zur Aktivierung der weniger affinen Glucocorticoid-Rezeptoren (GR), wodurch die Ependymin-Expression inhibiert wird (Abb. 4.3-B).

Evolutiv betrachtet könnte das Nervensystem durch Stress eine potenziell gefährliche Situation besser erkennen, sodass bei ähnlichen zukünftigen Gefahren eine schnellere und geeignetere Reaktion ermöglicht wird. Führt das daraufhin gezeigte Verhalten zu einer Beendigung der

Stressreaktion, wird Ependymin synthetisiert und das Verhaltensmuster konsolidiert. Dauert die Stressreaktion weiter an, ist das gezeigte Verhalten ungeeignet, sodass die Ependymin-Synthese herunterreguliert und das Verhaltensmuster nicht konsolidiert wird. Durch einen solchen Mechanismus werden verstärkt Verhaltensweisen konsolidiert, die sich zur Vermeidung von Stressoren bewährt haben und die biologische Fitness des Tiers erhöhen.

Wie Ependymin-Moleküle in die Gedächtnisbildung eingreifen könnten, soll am Beispiel einer aversiven Verhaltenskonditionierung eines Goldfisches in einer *shuttle-box* genauer erläutert werden. Bei diesem Lernparadigma werden wichtige Elemente dieses visuell ausgelösten Verhaltensmusters im *Tectum opticum* integriert, dem wichtigsten visuellen Integrationszentrum der Knochenfische (SCHMIDT, 1995). Eine der Hauptaufgaben des *Tectum opticums* ist die Orientierung und die Lokalisierung von visuellen Stimuli in einem Raum, wodurch der Goldfisch in der Lage ist diese Stimuli zu meiden (HERRERO *ET AL.,* 1998). Typ-I-Neurone im *Tectum opticum* erhalten visuellen Input über optische Fasern von retinalen Ganglienzellen und vestibulären Input des *Torus longitudinalis* über die Marginalfasern (Abb. 4.3-C; Schmidt, 1995). Nach einer aversiven Vermeidungskonditionierung konnte an manchen Typ-I-Neuronen (aber auch an Typ-XIV-Neuronen) eine erhöhte Ependymin-Immunreaktivität an den dendritischen Synapsen nachgewiesen werden (SCHMIDT, 1995). Vermutlich handelt es sich dabei um diejenigen Synapsen, die während dem Lernvorgang aktiviert wurden, sodass Ependymin-Moleküle an der plastischen Veränderung dieser Synapsen beteiligt sein könnten. Ein Einfluss von Ependymin bei der synaptischen Plastizität konnte bereits nachgewiesen werden, da es bei der aktivitätsgesteuerten Verschärfung rezeptiver Felder bei regenerierenden, retinotectalen Projektionen beteiligt ist (SCHMIDT & SHASHOUA, 1988). Die dahinterstehenden molekularen Mechanismen sind jedoch noch nicht bekannt, sodass im Folgenden Hypothesen zur Funktionsweise der Ependymin-Moleküle dargelegt werden.

Wie bereits in Kap. 4.4 beschrieben, gibt es mehrere Hinweise, dass Ependymin-Moleküle bei einem Absinken der extrazellulären Ca^{2+}-Konzentration um 50 % (gemessen an der Ca^{2+}-Konzentration der Extrazellulärflüssigkeit; ECF) zu langen, unlöslichen Fasern (*fibrous insoluble polymers*; FIPs) polymerisieren (SHASHOUA, 1988). Aufgrund dieser Befunde wurde 1991 von SHASHOUA die Hypothese aufgestellt, dass Ependymine bei einem Absinken der extrazellulären Ca^{2+}-Konzentration in der Mikroumgebung von aktivierten Synapsen zu FIPs polymerisieren und auf diese Weise Einfluss auf die synaptische Plastizität haben. MORRIS *ET AL.* (1986) konnten an Typ-I-Neuronen nach einer tetanischen Reizung der Marginalfasern einen transienten Abfall (1–5 min) der extrazellulären Ca^{2+}-Konzentration um 10 % messen. Durch die gleichzeitige Stimulation von Marginalfasern und optischen Fasern, wurde das Absinken der Ca^{2+}-Konzentration noch verstärkt. Anhand dieser Ergebnisse folgert SHASHOUA (1991), dass

vermutlich nur bei kooperativem Feuern mehrerer afferenter Fasern ein ausreichendes Absinken der Ca^{2+}-Konzentration erreicht wird, welches zur Polymerisierung von Ependymin-Molekülen nötig ist. Allerdings berichtet SCHMIDT (1995), dass für die Konsolidierung des Gedächtnisses *de novo*-synthetisierte Ependymin-Moleküle benötigt werden, die erst Stunden später diese Synapsen erreichen. Daher ist es fraglich, ob Ependymin nach dieser Theorie in die Gedächtnisbildung eingreift, wenn das Absinken der Ca^{2+}-Konzentration nur wenige Minuten andauert. Nach dem Lernen kommt es jedoch bei Goldfischen in der ECF zum leichten Absinken der Ependymin-Konzentration, bevor mehrere Stunden später durch Sekretion *de novo*-synthetisierter Ependymine ein Anstieg erfolgt (SCHMIDT, 1987). Dieses temporäre Absinken deutet darauf hin, dass Ependymin-Moleküle beim Lernen (oder kurz danach) vom Nervensystem verbraucht werden. Allerdings scheinen bereits vorhandene Ependymin-Moleküle für die Gedächtnisbildung nicht essentiell zu sein, da eine intracerebroventrikuläre Injektion von anti-Ependymin Antiseren 30 min vor dem Training (im Gegensatz zu 30 min nach dem Training) das Erlernen des Verhaltens und die Gedächtniskonsolidierung nicht beeinflusst (PIRONT & SCHMIDT, 1988). Der Zusammenhang zwischen der Polymerisierung der Ependymin-Moleküle bei Reduzierung der Ca^{2+}-Konzentration und der synaptischen Plastizität ist somit noch weitgehend ungeklärt. Des Weiteren ist anzusprechen, dass Ependymin-Moleküle untereinander Homo- oder Heterodimere bilden können, welche durch Zn^{2+} stabilisiert werden (SCHMIDT & MAKIOLA, 1991). Allerdings ist unklar, ob diese Komplexierung für die synaptische Plastizität eine Relevanz besitzt.

Es ist denkbar, dass Ependymin-Moleküle in Mechanismen wie der Langzeitpotenzierung (LTP; *long-term potentiation*) und der Langzeitdepression (*long term depression*; LTD) involviert sind (Kap. 1.1.1). Bei Zebrabärblingen konnte bereits eine *N*-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDAR)-abhängige LTP im Telencephalon nachgewiesen werden (NAM *ET AL.,* 2004). Der NMDAR ist dabei auch im Goldfischgehirn sehr weit verbreitet (BARNES & HENLEY, 1994). Weiterhin wurde beim Goldfisch und der Regenbogenforelle eine LTP im *Tectum opticum* nach Reizung der optischen Eingänge (1-20 Hz) nachgewiesen (LEWIS & TEYLER, 1986; KINOSHITA *ET AL.,* 2004). Da *de novo*-synthetisierte Ependymin-Moleküle den aktivierten Synapsen erst Stunden nach dem Lernen zur Verfügung stehen (SCHMIDT, 1987), ist eine Beteiligung in der späten Phase der LTP (*late*-LTP; L-LTP) denkbar. In der frühen Phase der LTP (*early*-LTP; E-LTP) werden transiente Veränderungen an den Synapsen durchgeführt, wodurch bei zukünftigen exzitatorischen Stimuli stärkere postsynaptische Antworten erfolgen (MALENKA & BEAR, 2004). Während der L-LTP werden diese Veränderungen dauerhaft, allerdings erfordert diese Phase die Synthese von neuen Proteinen (SAJIKUMAR & FREY, 2003). Die L-LTP beginnt etwa 3 h nach Induktion der LTP (SAJIKUMAR & FREY, 2003), sodass *de novo*-synthetisierte Ependymin-Moleküle in der Lage sind diese Synapsen zu erreichen und dort stabile Veränderungen zu verursachen. Dabei kommt es unter anderem zu strukturellen Vergrößerungen der Synapsen, was auch mit einer

Reorganisation und Zunahme der Mikrofilamente assoziiert ist (MALENKA & BEAR, 2004). Ependymin-Moleküle könnten bei diesen Prozessen eine wichtige Rolle spielen, sodass dazu weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden sollten.

Unter physiologischen Bedingungen kommen Ependymin-Moleküle mono-N- (31 kDa; γ-Ependymin) oder bi-N-glycosyliert (37 kDa; β-Ependymin) vor (KÖNIGSTORFER *ET AL.,* 1989b; KÖNIGSTORFER *ET AL.,* 1990). Die N-Glycosylgruppen enthalten ein HNK-1 (*human natural killer-1*)-Epitop (SHASHOUA *ET AL.,* 1986), das charakteristisch für viele Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie ist und entscheidend für die aktivitätsgesteuerte Verschärfung der rezeptiven Felder bei regenerierenden, retinotectalen Projektionen ist (SCHMIDT & SCHACHNER, 1998; PRADEL *ET AL.,* 1999). Damit spielt die HNK-1-vermittelte Adhäsivität eine wichtige Rolle bei der synaptischen Plastizität. Außerdem können die N-Glycosylgruppen zusätzlich stark sialyliert sein (SCHMIDT, 1995; PENNINELLA, 2009). Es gibt Hinweise, dass es sich um eine spezielle Form der Sialylierung, nämlich der Polysialylierung handelt, da diese Modifikation mittels einer Endoneuraminidase (EndoN) verdaut werden konnte (KRONES, 2014). Dieses Enzym spaltet spezifisch die α-2,8-glycosidischen Bindungen der Polysialinsäure (PSA; *polysialic acid*) (SCHNAAR *ET AL.,* 2014). Bei Säugetieren (*Mammalia*) ist der Hauptträger der PSA das neurale Zelladhäsionsmolekül (*neural cell adhesion molecule*; NCAM), das wie Ependymin Mitglied der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie ist (SCHMIDT, 1995; BISAZ *ET AL.,* 2009). PSA moduliert an NCAM die Zell-Zell-Interaktionen indem es die homo- und heterophile Adhäsivität reduziert (BISAZ *ET AL.,* 2009). In Verbindung mit der Polysialylierung spielt NCAM bei *Mammalia* eine Schlüsselrolle bei der neuralen Entwicklung, Steuerung des axonalen Wachstums, Zellmigration, synaptischer Plastizität und Gedächtniskonsolidierung (BRUSES & RUTISHAUSER, 2001; SENKOV *ET AL.,* 2006; BISAZ *ET AL.,* 2009). Interessanterweise wird die Expression von PSA-NCAM bei *Mammalia*, ähnlich wie Ependymin bei *Teleostei*, in einer Dosis-abhängigen Weise durch Glucocorticoide reguliert (BISAZ *ET AL.,* 2009). Zudem wurde gezeigt, dass die enzymatische Entfernung der PSA von NCAM mittels EndoN zu einem kompletten Verlust der LTP und LTD führt (BISAZ *ET AL.,* 2009). Auch bei *Teleostei* könnte PSA an Ependymin entscheidend für die Ausbildung dieser Mechanismen sein. Im Hinblick darauf, dass nur *de novo*-synthetisierte Ependymin-Moleküle essentiell für die Gedächtnisbildung sind, könnte die Polysialylierung dieser Moleküle ein möglicher Unterschied zu länger vorhandenen Molekülen darstellen, wodurch Erstere in der Lage sind in die synaptische Plastizität einzugreifen. Die Polysialylierung von NCAM wird sowohl bei *Mammalia* als auch bei *Teleostei* von zwei membranständigen Polysialyltransferasen (ST8SiaII und ST8SiaIV) im Golgi-Apparat katalysiert (MARX *ET AL.,* 2007; SCHNAAR *ET AL.,* 2014). Es ist daher möglich, dass PSA mit der Zeit durch Enzyme in der ECF entfernt wird, sodass ältere Ependymin-Moleküle diese Modifizierung nicht mehr besitzen. Um diese Hypothese zu prüfen,

könnte mittels Immunoblot und Einsatz spezifischer Antiseren gegen PSA untersucht werden, ob nach aversiver Verhaltenskonditionierung der Anteil von PSA-Ependymin ansteigt.

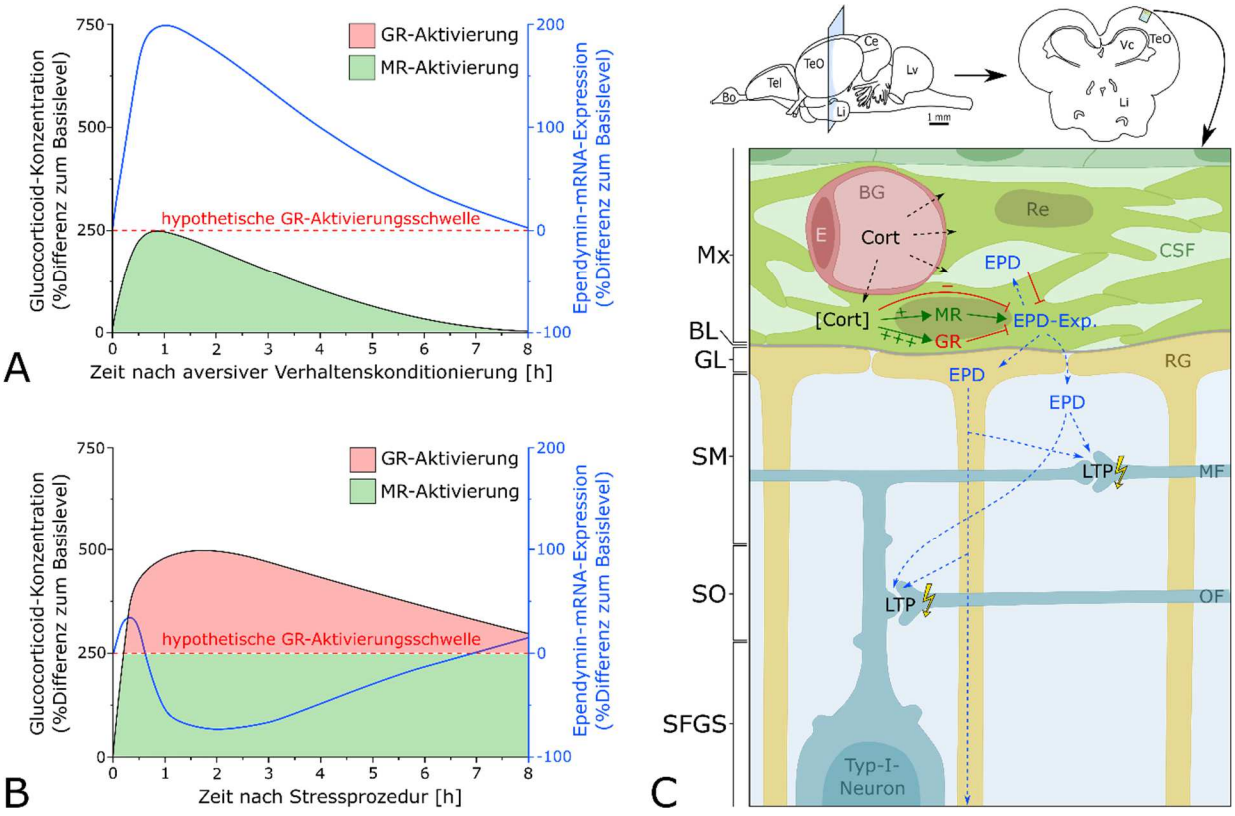


Abb. 4.3: Arbeitshypothese zu den Regulationsmechanismen und der Wirkungsweise von Ependymin (EPD). A-B: Modellhafte Beispiele zu den Zeitverläufen der EPD-Expression (blaue Kurve) und Glucocorticoid-Konzentration in meningealen retikulären Zellen (Re) nach aversiver Verhaltenskonditionierung (**A**) und Stressprozedur (**B**). Die EPD-Expression wird durch differenzielle Aktivierung des Mineralcorticoid-Rezeptors (MR; Transaktivierung der EPD-Expression; grün) und des Glucocorticoid-Rezeptors (GR: Transrepression der EPD-Expression; rot) dosisabhängig reguliert. Dadurch wird nach aversiver Verhaltenskonditionierung, im Gegensatz zu einer Stressprozedur, eine erhöhte Ependymin-Expression induziert, wodurch vorher erlernte Verhaltensmuster konsolidiert werden. Die rote gestrichelte Linie zeigt die hypothetische GR-Aktivierungsschelle an **C:** Hypothetische Wirkungsweise von Ependymin nach aversiver Verhaltenskonditionierung am Beispiel der Typ-I-Neuronen im *Tectum opticum* (TeO). Die Lage dieser Neuronen im Goldfischgehirn wird durch die Schnittebene oben im Bild dargestellt. Das bei relevanten Lernsituationen von der Nebennierenrinde sekretierte Glucocorticoid Cortisol (Cort) erreicht die meningealen Blutgefäße (Bg) und diffundiert in die Endomeninx (Mx). Dort führt Cortisol durch eine Dosis-abhängige Aktivierung des MR zu einer erhöhten EPD-Expression (EPD-Exp.). EPD gelangt daraufhin auf unbekanntem Weg in das neurale Parenchym und führt zur plastischen Veränderung von Synapsen, die beim Lernvorgang aktiviert wurden (Blitzsymbol). Möglicherweise greift Ependymin in die LTP ein. Bei einem aversiven Verhaltensmuster mit visuellen Reizen sind maßgeblich die Synapsen der Typ-I-Neuronen mit den Marginalfasern (MF) und den optischen Fasern (OF) beteiligt, an denen aversive Verhaltensmuster mit visuellen Reizen integriert werden. Der Aufbau der Meninx ist verändert nach ROTHER (1992) dargestellt. Das Ausmaß der Cortisol-Konzentration ([Cort]) wird durch + und − veranschaulicht. Gestrichelte Pfeile verdeutlichen Wege von Molekülen (schwarz = Cortisol; blau = EPD) an, grüne Pfeile eine Aktivierung und rote Balkenpfeile eine Inhibierung an. BL (Basallamina), Bo (*Bulbus olfactorius*), Ce (Cerebellum), CSF (Cerebrospinalflüssigkeit), E (Endothelzelle), GL (*Glia Limitans*), Li (*Lobus inferior*), Lv (*Lobus vagus*), RG (Radialglia), SFGS (*Stratum fibrosum et griseum superficiale*), SM (*Stratum marginale*), SO (*Stratum opticum*), Tel (Telencephalon), Vc (*Valvula cerebelli*).

5 FAZIT UND AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zellkultursystem aus meningealen Zellen von *C. auratus* etabliert, um die Expressions-Mechanismen von Ependymin zu untersuchen. Die Charakterisierung der enthaltenden Zellen lassen folgende Schlüsse zu.

- In den meningealen Primärkulturen kommen vier Ependymin-exprimierende Zelltypen vor, die zur Fibroblasten- bzw. Makrophagen zugeordnet werden können.
- Ein multipotenter Ursprung dieser Zelltypen aus einer Fibroblasten-Zelllinie der Endomeninx ist möglich.

Die Ependymin-Expression nimmt nach Herstellung der meningealen Kulturen stark ab, während die Anzahl Ependymin-Immunreaktiver Zellen zunimmt. Im Folgenden werden mögliche Gründe dafür genannt.

- Meningeale Zellen sind in der Lage aufgrund ihres multipotenten Charakters zu anderen Zelltypen zu transdifferenzieren. Sollten meningeale Zellen *in vitro* einen solchen Prozess durchlaufen, wäre auch die Verringerung der Ependymin-Expression im Zeitverlauf erklärbar.
- Möglicherweise fehlen die nötigen Zell-Zellkontakte oder diffusible Faktoren aus der inneren Endomeninx, um die *in vivo* herrschende Ependymin-Expression weiterhin zu gewährleisten.
- Ein basales Level an Glucocorticoiden wie es *in vivo* vorkommt, könnte durch Aktivierung der Mineralcorticoid-Rezeptoren (MR) für die Erhaltung der Ependymin-Synthese essentiell sein.
- Unter den verwendeten Kulturbedingungen kommt es zur Aggregation von Ependymin-Molekülen an meningealen Zellen. Eine lokal erhöhte Ependymin-Konzentration könnte somit die Expression durch eine Feedback-Hemmung herunterregulieren. Vermutlich steht das mit der Fähigkeit der Ependymin-Moleküle im Zusammenhang bei geringen Ca^{2+}-Konzentrationen zu polymerisieren.

Um die Fragestellung zu beantworten, ob Ependymin ein Schlüsselmolekül zur Integration von Stressreaktionen in die Gedächtniskonsolidierung ist, wurden die Expressionsmechanismen an meningealen Primärkulturen untersucht. Dabei konnten folgende Schlüsse gezogen werden.

- Ein Cortisol-Entzug verursacht bei meningealen Kulturen eine transiente Erhöhung der Ependymin-mRNA-Expression, ähnlich wie nach einer aversiven Verhaltenskonditionierung von Goldfischen. Eine Cortisol-Behandlung verursacht dagegen stellenweise einen ähnlichen Verlauf wie nach einer Stressprozedur.

- Vermutlich regulieren Glucocorticoide durch einen Dosis-abhängigen Mechanismus mit invertierten U-förmigen Verlauf die Ependymin-Expression. Moderate Cortisol-Konzentrationen wirken dabei durch Aktivierung der MR stimulierend und sehr hohe Cortisol-Konzentrationen durch Aktivierung der Glucocorticoid-Rezeptoren (GR) inhibierend.
- Zusätzlich zu Glucocorticoiden konnten Hinweise für einen negativen Feedback-Mechanismus erhalten werden.

Zu den Mechanismen wie Ependymin-Moleküle in die synaptische Plastizität eingreifen ist noch wenig bekannt. Allerdings weisen die molekularen Eigenschaften von Ependymin darauf hin, dass es an der Reorganisation von Synapsen nach Lernereignissen beteiligt ist. Vor allem die Sialylierung (eventuell Polysialylierung) dieser Moleküle könnte eine wichtige Rolle spielen und sollte demnach Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Es ist weiterhin denkbar, dass Ependymin-Moleküle die synaptische Plastizität beeinflussen, indem sie in die Mechanismen der späten Phase der LTP (L-LTP) eingreifen. Um diese Hypothese zu prüfen, könnte untersucht werden, ob durch Behandlung mit Ependymin-haltigen Proben oder anti-Ependymin Antiseren, die Dauer der LTP im *Tectum opticum* beeinflusst werden kann. Durch enzymatische Entfernung der Polysialinsäuren (PSA) bei den Ependymin-haltigen Proben oder durch Verwendung spezifischer Antikörper gegen PSA, könnte weiterhin der Einfluss dieser Modifikation untersucht werden. Zusätzliche wichtige Erkenntnisse zum Arbeitsmechanismus der Ependymin-Moleküle, können mittels Co-Immunpräzipitation und *Blue native*-PAGE durch Aufklärung der Protein-Protein-Interaktionen erhalten werden.

Auch bei *Mammalia* kommen Ependymin-verwandte Proteine vor (MERPs; *mammalian ependymin related proteins*), sodass diese auch bei höheren Vertebraten eine Rolle bei der Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses spielen könnten. HINCHLIFFE (2013) konnte zeigen, dass der Syntheseort von *MERP2* bei Mäusen, ähnlich wie Ependymin bei *Teleostei*, in der Meninx liegt. Weiterhin stieg die mRNA-Expression von *MERP2* nach einem räumlichen Lerntraining, ähnlich wie die Ependymin-mRNA nach aversiver Verhaltenskonditionierung beim Goldfisch, in einem zweigipfligen Zeitverlauf an. Immuncytochemisch wurden MERPs an endomeningealen Invaginationen, an auskleidenden Zellen des dorsalen dritten Ventrikels und an Strukturen des Hippocampus nachgewiesen. Letzterer spielt eine wichtige Rolle bei der räumlichen Orientierung und der Bildung des Langzeitgedächtnisses. Es ist also denkbar, dass auch die MERPs der Säugetiere (evtl. der Menschen) bei der Gedächtnisbildung zur Integration von Stressreaktionen beitragen. Zur Untersuchung dieser Hypothese, könnte ein MERP-*knock out* bei Mäusen (beispielsweise mittels RNAi-Technik) sehr hilfreich sein. Bei MERP-*knock out* Mäusen könnte man untersuchen, ob die Fähigkeiten zur Gedächtniskonsolidierung, sowie der LTP, erhalten bleiben.

6 LITERATURVERZEICHNIS

AGRANOFF, B.W., DAVIS, R.E. & BRINK, J.J. (1965): Memory fixation in the goldfish. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54** (3): 788-793.

APOSTOLOPOULOS, J., SPARROW, R.L., MCLEOD, J.L., COLLIER, F.M., DARCY, P.K., SLATER, H.R., NGU, C., GREGORIO-KING, C.C. & KIRKLAND, M.A. (2001): Identification and characterization of a novel family of mammalian ependymin-related proteins (MERPs) in hematopoietic, nonhematopoietic, and malignant tissues. In: *DNA Cell. Biol.*, **20** (10): 625-635.

BALDI, E. & BUCHERELLI, C. (2005): The inverted "u-shaped" dose-effect relationships in learning and memory: modulation of arousal and consolidation. In: *Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.*, **3** (1): 9-21.

BARNES, J.M. & HENLEY, J.M. (1994): Quantitative analysis of the distributions of glutamatergic ligand binding sites in goldfish brain. In: *Brain Res.*, **637** (1-2): 323-327.

BAYREUTHER, K., RODEMANN, H.P., HOMMEL, R., DITTMANN, K., ALBIEZ, M. & FRANCZ, P.I. (1988): Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85** (14): 5112-5116.

BEAR, M.F. (1995): Mechanism for a sliding synaptic modification threshold. In: *Neuron*, **15** (1): 1-4.

BENOWITZ, L.I. & SHASHOUA, V.E. (1977): Localization of a brain protein metabolically linked with behavioral plasticity in the goldfish. In: *Brain Res.*, **136** (2): 227-242.

BERNSTEIN, J.J., KARP, S.M., GOLDBERG, W.J., La DeGiorgio & BLASS, J.P. (1996): Human leptomeningeal-derived cells express GFAP and HLADR when grafted into rat spinal cord. In: *Int. J. Dev. Neurosci.*, **14** (5): 681-687.

BI, G.Q. & POO, M.M. (1998): Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type. In: *J. Neurosci.*, **18** (24): 10464-10472.

BISAZ, R., CONBOY, L. & SANDI, C. (2009): Learning under stress: a role for the neural cell adhesion molecule NCAM. In: *Neurobiol. Learn. Mem.*, **91** (4): 333-342.

BLISS, T.V. & LOMO, T. (1973): Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. In: *J. Physiol.*, **232** (2): 331-356.

BOLTON, A.E. & HUNTER, W.M. (1973): The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a 125I-containing acylating agent. In: *Biochem. J.*, **133** (3): 529-539.

BRADFORD, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.

BRUSES, J.L. & RUTISHAUSER, U. (2001): Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development. In: *Biochimie*, **83** (7): 635-643.

BUNDESEN, L.Q., SCHEEL, T.A., BREGMAN, B.S. & KROMER, L.F. (2003): Ephrin-B2 and EphB2 regulation of astrocyte-meningeal fibroblast interactions in response to spinal cord lesions in adult rats. In: *J. Neurosci.*, **23** (21): 7789-7800.

BURY, N.R. & STURM, A. (2007): Evolution of the corticosteroid receptor signalling pathway in fish. In: *Gen. Comp. Endocrinol.*, **153** (1-3): 47-56.

CHAVIN, W. & SINGLEY, J.A. (1972): Adrenocorticoids of the goldfish, Carassius auratus L. In: *Comp. Biochem. Physiol. B*, **42** (4): 547-562.

CHOMCZYNSKI, P. & MACKEY, K. (1995): Substitution of chloroform by bromo-chloropropane in the single-step method of RNA isolation. In: *Anal. Biochem.*, **225** (1): 163-164.

CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Anal. Biochem.*, **162** (1): 156-159.

COOK, A.F., STACEY, N.E. & PETER, R.E. (1980): Periovulatory changes in serum cortisol levels in the goldfish, Carassius auratus. In: *Gen. Comp. Endocrinol.*, **40** (4): 507-510.

DE KLOET, E.R., OITZL, M.S. & JOELS, M. (1999): Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? In: *Trends Neurosci.*, **22** (10): 422-426.

DECIMO, I., FUMAGALLI, G., BERTON, V., KRAMPERA, M. & BIFARI, F. (2012): Meninges: from protective membrane to stem cell niche. In: *Am. J. Stem Cells*, **1** (2): 92-105.

DOMBROWSKI, C. (2015): Charakterisierung der Plasma-Cortisol- und Blutzucker-Konzentration bei Goldfischen nach einer Transportprozedur und Auswirkung auf das Gehirnproteom: Masterthesis (unveröffentlicht) im Fachbereich Biologie und Chemie. Gießen. *Justus-Liebig-Universität*.

FLEIGE, S., WALF, V., HUCH, S., PRGOMET, C., SEHM, J. & PFAFFL, M.W. (2006): Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. In: *Biotechnol. Lett.*, **28** (19): 1601-1613.

GALLAGHER, S.R. & DESJARDINS, P.R. (2006): Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. In: *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, **Appendix 3**: Appendix 3D.

GANSS, B. & HOFFMANN, W. (1993): Calcium binding to sialic acids and its effect on the conformation of ependymins. In: *Eur. J. Biochem.*, **217** (1): 275-280.

GANSS, B. & HOFFMANN, W. (2009): Calcium-induced conformational transition of trout ependymins monitored by tryptophan fluorescence. In: *Open. Biochem. J.*, **3**: 14-17.

GOLDBERG, D.A. (1980): Isolation and partial characterization of the Drosophila alcohol dehydrogenase gene. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77** (10): 5794-5798.

HAINFELLNER, J.A., VOIGTLANDER, T., STROBEL, T., MAZAL, P.R., MADDALENA, A.S., AGUZZI, A. & BUDKA, H. (2001): Fibroblasts can express glial fibrillary acidic protein (GFAP) in vivo. In: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **60** (5): 449-461.

HANKS, J.H. & WALLACE, R.E. (1949): Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. In: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **71** (2): 196-200.

HERRE, W. (1990): Betrachtungen an Schädeln von Goldfischen (Carassius gibelio f. auratus). In: *J. Zoolog. Syst. Evol. Res.*, **28** (2): 137-151.

HERRERO, L., RODRIGUEZ, F., SALAS, C. & TORRES, B. (1998): Tail and eye movements evoked by electrical microstimulation of the optic tectum in goldfish. In: *Exp. Brain. Res.*, **120** (3): 291-305.

HINCHLIFFE, D. (2013): MERPs im Gehirn der Hausmaus: Untersuchung ihrer möglichen Bedeutung für die Verhaltensplastizität durch in-situ Hybridisierung, reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion sowie immunhistochemischen Methoden: Dissertation im Fachbereich Biologie und Chemie. Gießen. *Justus-Liebig-Universität*.

KAISER, R. & GOTTSCHALK, G. (1972): Elementare Tests zur Beurteilung von Messdaten: Soforthilfe fuer statistische Tests mit wenigen Messdaten. Mannheim. *B.I.-Wissenschaftsverlag*, **Band 774**.

KANDEL, E.R. (2011): Zelluläre Grundlagen von Lernen und Gedächtnis. In: KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H. & JESSELL, T.M. (Hrsg.): Neurowissenschaften: Eine Einführung, übers. v. Benner, S., et al. (Orig.: Essentials of Neural Science and Behavior). 1. Aufl. (Nachdr.). Heidelberg. *Spektrum Akad. Verl.*: 685-714.

KANDEL, E.R. & KUPFERMANN, I. (2011): Emotionale Zustände. In: KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H. & JESSELL, T.M. (Hrsg.): Neurowissenschaften: Eine Einführung, übers. v. Benner, S., et al. (Orig.: Essentials of Neural Science and Behavior). 1. Aufl. (Nachdr.). Heidelberg. *Spektrum Akad. Verl.*: 607-625.

KAPUSCINSKI, J. (1995): DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. In: *Biotech. Histochem.*, **70** (5): 220-233.

KASSEL, O. & HERRLICH, P. (2007): Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: molecular aspects. In: *Mol. Cell. Endocrinol.*, **275** (1-2): 13-29.

KAWANO, H., KIMURA-KURODA, J., KOMUTA, Y., YOSHIOKA, N., LI, H.P., KAWAMURA, K., LI, Y. & RAISMAN, G. (2012): Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. In: *Cell Tissue Res.*, **349** (1): 169-180.

KINOSHITA, M., HOSOKAWA, T., URANO, A. & ITO, E. (2004): Long-term potentiation in the optic tectum of rainbow trout. In: *Neurosci. Lett.*, **370** (2-3): 146-150.

KÖNIGSTORFER, A., STERRER, S., ECKERSKORN, C., LOTTSPEICH, F., SCHMIDT, R. & HOFFMANN, W. (1989a): Molecular characterization of an ependymin precursor from goldfish brain. In: *J. Neurochem.*, **52** (1): 310-312.

KÖNIGSTORFER, A., STERRER, S. & HOFFMANN, W. (1989b): Biosynthesis of ependymins from goldfish brain. In: *J. Biol. Chem.*, **264** (23): 13689-13692.

KÖNIGSTORFER, A., STERRER, S. & HOFFMANN, W. (1990): Ependymins are expressed in the meninx of goldfish brain. In: *Cell Tissue Res.*, **261** (1): 59-64.

KRONES, D. (2014): Untersuchung der Sialylierung von Ependyminen im Vergleich zur Polysialylierung von NCAM: Bachelorthesis (unveröffentlicht) im Fachbereich Biologie und Chemie. Gießen. *Justus-Liebig-Universität*.

LAEMMLI, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature*, **227** (5259): 680-685.

LAKOS, S.F., THORMODSSON, F.R. & GRAFSTEIN, B. (1994): Immunolocalization of exoglycoproteins ("ependymins") in the goldfish brain. In: *Neurochem. Res.*, **19** (11): 1401-1412.

LEHRACH, H., DIAMOND, D., WOZNEY, J.M. & BOEDTKER, H. (1977): RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. In: *Biochemistry*, **16** (21): 4743-4751.

LEWIS, D. & TEYLER, T.J. (1986): Long-term potentiation in the goldfish optic tectum. In: *Brain Res.*, **375** (2): 246-250.

LOUVEAU, A., SMIRNOV, I., KEYES, T.J., ECCLES, J.D., ROUHANI, S.J., PESKE, J.D., DERECKI, N.C., CASTLE, D., MANDELL, J.W., LEE, K.S., HARRIS, T.H. & KIPNIS, J. (2015): Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. In: *Nature*, **523** (7560): 337-341.

MAGGIO, N. & SEGAL, M. (2010): Corticosteroid regulation of synaptic plasticity in the hippocampus. In: *ScientificWorldJournal*, **10**: 462-469.

MAJOCHA, R.E., SCHMIDT, R. & SHASHOUA, V.E. (1982): Cultures of zona ependyma cells of goldfish brain: an immunological study of the synthesis and release of ependymins. In: *J. Neurosci. Res.*, **8** (2-3): 331-342.

MALENKA, R.C. & BEAR, M.F. (2004): LTP and LTD: an embarrassment of riches. In: *Neuron*, **44** (1): 5-21.

MARX, M., RIVERA-MILLA, E., STUMMEYER, K., GERARDY-SCHAHN, R. & BASTMEYER, M. (2007): Divergent evolution of the vertebrate polysialyltransferase Stx and Pst genes revealed by fish-to-mammal comparison. In: *Dev. Biol.*, **306** (2): 560-571.

MAXIMINO, C., LIMA, M.G., OLIVEIRA, K.R., BATISTA, E.J. & Am Herculano (2013): "Limbic associative" and "autonomic" amygdala in teleosts: a review of the evidence. In: *J. Chem. Neuroanat.*, **48-49**: 1-13.

MCEWEN, B. (2002): Estrogen actions throughout the brain. In: *Recent Prog. Horm. Res.*, **57**: 357-384.

MCEWEN, B.S. & SAPOLSKY, R.M. (1995): Stress and cognitive function. In: *Curr. Opin. Neurobiol.*, **5** (2): 205-216.

MERCIER, F., KITASAKO, J.T. & HATTON, G.I. (2002): Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. In: *J. Comp. Neurol.*, **451** (2): 170-188.

MILLIGAN, C.L. (1997): The role of cortisol in amino acid mobilization and metabolism following exhaustive exercise in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum). In: *Fish Physiol. Biochem.*, **16** (2): 119-128.

MINEKA, S. & HENDERSEN, R.W. (1985): Controllability and predictability in acquired motivation. In: *Annu. Rev. Psychol.*, **36**: 495-529.

MOMMSEN, T.P., VIJAYAN, M.M. & MOON, T.W. (1999): Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. In: *Rev. Fish Biol. Fish.*, **9** (3): 211-268.

MOMOSE, Y., KOHNO, K. & ITO, R. (1988): Ultrastructural study on the meninx of the goldfish brain. In: *J. Comp. Neurol.*, **270** (3): 327-336.

MORRIS, M.E., ROPERT, N. & SHASHOUA, V.E. (1986): Stimulus-Evoked Changes in Extracellular Calcium in Optic Tectum of the Goldfish: Possible Role in Neuroplasticity. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **481** (1): 375-377.

NAM, R.H., KIM, W. & LEE, C.J. (2004): NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the telencephalon of the zebrafish. In: *Neurosci. Lett.*, **370** (2-3): 248-251.

NEUHOFF, V., STAMM, R. & EIBL, H. (1985): Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels. In: *Electrophoresis*, **6** (9): 427-448.

PAXTON, R., GIST, D.H. & UMMINGER, B.L. (1984): Serum cortisol levels in thermally-acclimated goldfish (Carassius auratus) and killifish (Fundulus heteroclitus): Implications in control of hepatic glycogen metabolism. In: *Comp. Biochem. Physiol. B*, **78** (4): 813-816.

PENNINELLA, D. (2009): Untersuchung der Isoformen des Gehirnproteins Ependymin mit Hilfe der 2D-PAGE: Diplomarbeit (unveröffentlicht) im Fachbereich Biologie und Chemie. Gießen. *Justus-Liebig-Universität*.

PFAFFL, M.W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic Acids Res.*, **29** (9): e45.

PFAFFL, M.W., HORGAN, G.W. & DEMPFLE, L. (2002): Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. In: *Nucleic Acids Res.*, **30** (9): e36.

PHAN, S.H. (2008): Biology of fibroblasts and myofibroblasts. In: *Proc. Am. Thorac. Soc.*, **5** (3): 334-337.

PILZ, J. (2014): Anpassung eines Radioimmunoassays und Messung der tageszeit- und stressabhängigen Cortisolkonzentration im Goldfischserum: Bachelorthesis (unveröffentlicht) im Fachbereich Biologie und Chemie. Gießen. *Justus-Liebig-Universität*.

PIRONT, M.L. & SCHMIDT, R. (1988): Inhibition of long-term memory formation by anti-ependymin antisera after active shock-avoidance learning in goldfish. In: *Brain Res.*, **442** (1): 53-62.

POPESKU, J.T., MARTYNIUK, C.J., MENNIGEN, J., XIONG, H., ZHANG, D., XIA, X., COSSINS, A.R. & TRUDEAU, V.L. (2008): The goldfish (Carassius auratus) as a model for neuroendocrine signaling. In: *Mol. Cell. Endocrinol.*, **293** (1-2): 43-56.

PORRMANN, R. (1998): In vitro-Untersuchungen zur Expression und Syntheseregulation des Plastizitäts-assoziierten Glykoproteins Ependymin an Zellen der Leptomeninx des Goldfisches (Carassius auratus): Dissertation im Fachbereich Biologie. Frankfurt am Main. *Johann Wolfgang-Goethe-Universität*.

PRADEL, G., SCHACHNER, M. & SCHMIDT, R. (1999): Inhibition of memory consolidation by antibodies against cell adhesion molecules after active avoidance conditioning in zebrafish. In: *J. Neurobiol.*, **39** (2): 197-206.

RONE, M.B., FAN, J. & PAPADOPOULOS, V. (2009): Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. In: *Biochim. Biophys. Acta.*, **1791** (7): 646-658.

ROTHER, S. (1992): Expression und ultrastrukturelle Verteilung eines verhaltensassoziierten Glykoproteins (Ependymin) im Goldfischgehirn: Dissertation (unveröffentlicht) im Fachbereich Biologie. Frankfurt am Main. *Johann Wolfgang-Goethe-Universität*.

ROTHER, S., SCHMIDT, R., BRYSCH, W. & SCHLINGENSIEPEN, K.H. (1995): Learning-induced expression of meningeal ependymin mRNA and demonstration of ependymin in neurons and glial cells. In: *J. Neurochem.*, **65** (4): 1456-1464.

SAJIKUMAR, S. & FREY, J.U. (2003): Anisomycin inhibits the late maintenance of long-term depression in rat hippocampal slices in vitro. In: *Neurosci. Lett.*, **338** (2): 147-150.

SANDI, C. & LOSCERTALES, M. (1999): Opposite effects on NCAM expression in the rat frontal cortex induced by acute vs. chronic corticosterone treatments. In: *Brain Res.*, **828** (1-2): 127-134.

SANDI, C. & PINELO-NAVA, M.T. (2007): Stress and memory: behavioral effects and neurobiological mechanisms. In: *Neural Plast.*, **2007**: 78970.

SCHMIDT, J.T. & SCHACHNER, M. (1998): Role for cell adhesion and glycosyl (HNK-1 and oligomannoside) recognition in the sharpening of the regenerating retinotectal projection in goldfish. In: *J. Neurobiol.*, **37** (4): 659-671.

SCHMIDT, J.T., SCHMIDT, R., LIN, W.C., JIAN, X.Y. & STUERMER, C.A. (1991): Ependymin as a substrate for outgrowth of axons from cultured explants of goldfish retina. In: *J. Neurobiol.*, **22** (1): 40-54.

SCHMIDT, J.T. & SHASHOUA, V.E. (1988): Antibodies to ependymin block the sharpening of the regenerating retinotectal projection in goldfish. In: *Brain Res.*, **446** (2): 269-284.

SCHMIDT, R. (1987): Changes in subcellular distribution of ependymins in goldfish brain induced by learning. In: *J. Neurochem.*, **48** (6): 1870-1878.

SCHMIDT, R. (1995): Cell-adhesion molecules in memory formation. In: *Behav. Brain. Res.*, **66** (1-2): 65-72.

SCHMIDT, R., BRYSCH, W., ROTHER, S. & SCHLINGENSIEPEN, K.H. (1995): Inhibition of memory consolidation after active avoidance conditioning by antisense intervention with ependymin gene expression. In: *J. Neurochem.*, **65** (4): 1465-1471.

SCHMIDT, R. & LAPP, H. (1987): Regional distribution of ependymins in goldfish brain measured by radioimmunoassay. In: *Neurochem. Int.*, **10** (3): 383-390.

SCHMIDT, R. & MAKIOLA, E. (1991): Calcium and zinc ion binding properties of goldfish brain ependymin. In: *Life Sci. Adv.*, **10**: 161-171.

SCHMIDT, R., ROTHER, S., SCHLINGENSIEPEN, K.H. & BRYSCH, W. (1992): Neuronal plasticity depending on a glycoprotein synthesized in goldfish leptomeninx. In: *Prog. Brain Res.*, **91**: 7-12.

SCHMIDT, R. & SHASHOUA, V.E. (1981): A radioimmunoassay for ependymins beta and gamma: two goldfish brain proteins involved in behavioral plasticity. In: *J. Neurochem.*, **36** (4): 1368-1377.

SCHNAAR, R.L., GERARDY-SCHAHN, R. & HILDEBRANDT, H. (2014): Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. In: *Physiol. Rev.*, **94** (2): 461-518.

SCHWARZ, H., MÜLLER-SCHMID, A. & HOFFMANN, W. (1993): Ultrastructural localization of ependymins in the endomeninx of the brain of the rainbow trout: possible association with collagen fibrils of the extracellular matrix. In: *Cell Tissue Res.*, **273** (3): 417-425.

SECOMBES, C.J. (1985): The in vitro formation of teleost multinucleate giant cells. In: *J. Fish Dis.*, **8** (5): 461-464.

SENKOV, O., SUN, M., WEINHOLD, B., GERARDY-SCHAHN, R., SCHACHNER, M. & DITYATEV, A. (2006): Polysialylated neural cell adhesion molecule is involved in induction of long-term potentiation and memory acquisition and consolidation in a fear-conditioning paradigm. In: *J. Neurosci.*, **26** (42): 10888-109898.

SHASHOUA, V.E. (1976): Brain metabolism and the acquisition of new behaviors. I. Evidence for specific changes in the pattern of protein synthesis. In: *Brain Res.*, **111** (2): 347-364.

SHASHOUA, V.E. (1985): The role of brain extracellular proteins in neuroplasticity and learning. In: *Cell. Mol. Neurobiol.*, **5** (1-2): 183-207.

SHASHOUA, V.E. (1988): Monomeric and polymeric forms of ependymin: a brain extracellular glycoprotein implicated in memory consolidation processes. In: *Neurochem. Res.*, **13** (7): 649-655.

SHASHOUA, V.E. (1991): Ependymin, a brain extracellular glycoprotein, and CNS plasticity. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **627**: 94-114.

SHASHOUA, V.E., DANIEL, P.F., MOORE, M.E. & JUNGALWALA, F.B. (1986): Demonstration of glucuronic acid on brain glycoproteins which react with HNK-1 antibody. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **138** (2): 902-909.

SHASHOUA, V.E., HESSE, G.W. & MILINAZZO, B. (1990): Evidence for the in vivo polymerization of ependymin: a brain extracellular glycoprotein. In: *Brain Res.*, **522** (2): 181-190.

SINGLEY, J.A. & CHAVIN, W. (1975a): Serum cortisol in normal goldfish (Carassius auratus L.). In: *Comp. Biochem. Physiol. A*, **50** (1A): 77-82.

SINGLEY, J.A. & CHAVIN, W. (1975b): The adrenocortical-hypophyseal response to saline stress in the goldfish, Carassius auratus L. In: *Comp. Biochem. Physiol. A*, **51** (4): 749-756.

SPINDLER, K.-D. (1997): Vergleichende Endokrinologie: Regulation und Mechanismen. Stuttgart, New York. *Thieme*.

STOLTE, E.H., MAZON, A.F. de, LEON-KOOSTERZIEL, K.M., JESIAK, M., BURY, N.R., STURM, A., SAVELKOUL, H.F., VAN KEMENADE, B.M. & FLIK, G. (2008): Corticosteroid receptors involved in stress regulation in common carp, Cyprinus carpio. In: *J. Endocrinol.*, **198** (2): 403-417.

SUAREZ-CASTILLO, E.C. & GARCIA-ARRARAS, J.E. (2007): Molecular evolution of the ependymin protein family: a necessary update. In: *BMC Evol. Biol.*, **7**: 23.

TAKAHASHI, H. & SAKAMOTO, T. (2013): The role of 'mineralocorticoids' in teleost fish: relative importance of glucocorticoid signaling in the osmoregulation and 'central' actions of mineralocorticoid receptor. In: *Gen. Comp. Endocrinol.*, **181**: 223-228.

TAKASHIMA, A. (2012): GSK-3β and memory formation. In: *Front. Mol. Neurosci.*, **5**: 47.

TAKEUCHI, T., DUSZKIEWICZ, A.J. & MORRIS, R.G. (2014): The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **369** (1633).

THOMPSON, R.F. (2001): Das Gehirn: Von der Nervenzelle zur Verhaltenssteuerung, übers. v. Held, A. (Orig.: The Brain: A Neuroscience Primer). 3. Aufl. Heidelberg. *Spektrum Akad. Verl.*

UMLAND, S.P., SCHLEIMER, R.P. & JOHNSTON, S.L. (2002): Review of the molecular and cellular mechanisms of action of glucocorticoids for use in asthma. In: *Pulm. Pharmacol. Ther.*, **15** (1): 35-50.

VERMA, I.M. (1975): Studies on reverse transcriptase of RNA tumor viruses III. Properties of purified Moloney murine leukemia virus DNA polymerase and associated RNase H. In: *J. Virol.*, **15** (4): 843-854.

VERMEULEN, J., PRETER, K. de, LEFEVER, S., NUYTENS, J., VLOED, F. de, DERVEAUX, S., HELLEMANS, J., SPELEMAN, F. & VANDESOMPELE, J. (2011): Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. In: *Nucleic Acids Res.*, **39** (9): e63.

VIERBUCHEN, T., OSTERMEIER, A., PANG, Z.P., KOKUBU, Y., SUDHOF, T.C. & WERNIG, M. (2010): Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. In: *Nature*, **463** (7284): 1035-1041.

WANG, J., MURRAY, M. & GRAFSTEIN, B. (1995): Cranial meninges of goldfish: age-related changes in morphology of meningeal cells and accumulation of surfactant-like multilamellar bodies. In: *Cell Tissue Res.*, **281** (2): 349-358.

WENDELAAR BONGA, S.E. (1997): The stress response in fish. In: *Physiol. Rev.*, **77** (3): 591-625.

WHITLOCK, J.R., HEYNEN, A.J., SHULER, M.G. & BEAR, M.F. (2006): Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. In: *Science*, **313** (5790): 1093-1097.

WILEY, E.O. & JOHNSON, G.D. (2010): A teleost classification based on monophyletic groups. In: Nelson, Joseph S., Schultze, Hans-Peter & WILSON, M.V. (Hrsg.). München. *Verlag Dr. Friedrich Pfeil*: 123-128.

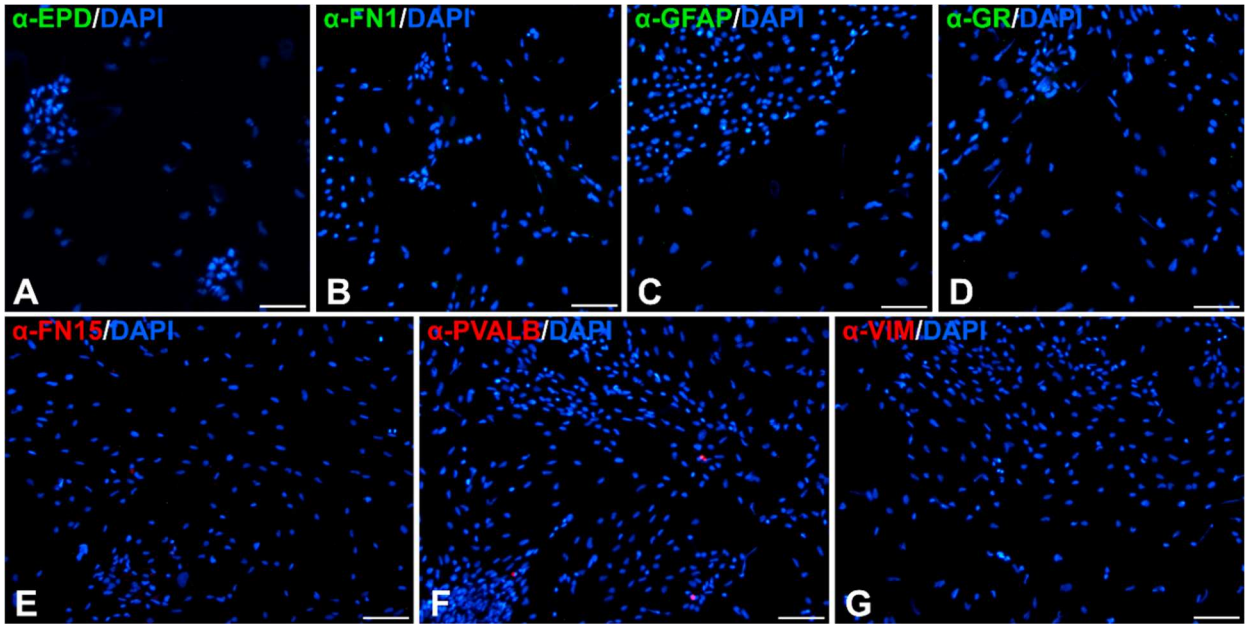
YASUDA, H., BARTH, A.L., STELLWAGEN, D. & MALENKA, R.C. (2003): A developmental switch in the signaling cascades for LTP induction. In: *Nat. Neurosci.*, **6** (1): 15-16.

Elektronische Verweise

http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi *(Stand: 04.06.2016)*

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast *(Stand: 04.06.2016)*

7 ANHANG



Anhang Abb. 7.1: Negative Kontrollen (ohne Primärantikörper/-serum) der IF-Markierungen. Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen meningealer Primärkulturen (acht Tage nach der Präparation) von Goldfischen nach IF-Markierung ohne Primärantikörper/-serum mittels Alexa Fluor 488 (grün) bzw. Alexa Fluor 568 (rot). Es wurde die gleiche Behandlung, Belichtungszeit und Tonwertkorrektur wie in Tab. 2.12 angegeben angewendet, um die verwendeten Sekundärantikörper auf unspezifische Signale zu untersuchen. Die Nuclei wurden mittels DAPI-Färbung (blau) markiert. Kontrollen für IF-Markierungen mit (**A**) α-EPD, (**B**) α-FN1, (**C**) α-GFAP, (**D**) α-GR, (**E**) α-FN15, (**F**) α-PVALB und (**G**) α-VIM. Messbalken = 100 µm.

Anhang Tab. 7.1: Berechnete qPCR-Effizienzen aus den Standardkurven der cDNA-Verdünnungsreihen. Es wurden Standardkurven durch qPCR amplifizierte cDNA-Verdünnungsreihen erstellt (Abb. 2.4) und mit Hilfe der Steigungen (b) linearer Regressionsgeraden die qPCR-Effizienzen (E) der verwendeten Primerpaare nach Formel 3 bestimmt. Weiterhin sind Bestimmtheitsmaß (B) und dynamischer Bereich, in der sich die Standardkurve linear verhält, angegeben.

Gen/Primer	Bestimmtheitsmaß (B)	Steigung (b)	qPCR-Effizienz (E)	dynamischer Bereich [x-fache Verdünnung]
epd1	0,99104	-3,38394	1,9748	256
epd2	0,99565	-3,10545	2,0990	256
l1-e587	0,99300	-3,32493	1,9987	1024
gapdh	0,99762	-3,24442	2,0334	256
actb	0,99657	-3,16303	2,0709	256

Anhang Tab. 7.2: Zeitverlauf der normalisierten mRNA-Verhältnisse von *epd1*, *epd2* und *l1-e587* in meningealen Primärkulturen von Goldfischen bis zwei Wochen nach der Präparation. Die mRNA-Verhältnisse der Gene *epd1*, *epd2* und *l1-e587* wurden mittels RT-qPCR relativ zu einem externen Standard (Kalibrator-cDNA) quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM).

epd1					
Zeit nach Erstellung der Zellkultur [Tage]	mRNA-Verhältnis (auf Kalibrator normalisiert)			Mittelwert	SEM
0	48193,84	97641,65	85287,05	77040,85	14857,90
2	647,43	1902,23	4454,81	2334,82	1120,18
4	32,58	29,60	79,76	47,31	16,25
6	6,95	4,90	8,22	6,69	0,97
8	2,05	1,50	2,59	2,05	0,32
10	0,80	2,03	0,92	1,25	0,39
12	0,46	0,25	0,41	0,37	0,06
14	---	0,13	0,93	0,53	0,40
epd2					
Zeit nach Erstellung der Zellkultur [Tage]	mRNA-Verhältnis (auf Kalibrator normalisiert)			Mittelwert	SEM
0	213907,71	392613,59	451231,41	352584,24	71373,19
2	1148,84	3864,58	15848,27	6953,89	4515,76
4	42,35	45,92	158,42	82,23	38,11
6	8,17	6,05	10,94	8,38	1,42
8	2,35	1,43	2,84	2,21	0,41
10	0,61	5,17	0,98	2,25	1,46
12	1,20	0,23	0,41	0,62	0,30
14	---	0,12	0,95	0,54	0,41
l1-e587					
Zeit nach Erstellung der Zellkultur [Tage]	mRNA-Verhältnis (auf Kalibrator normalisiert)			Mittelwert	SEM
0	1,92	1,59	1,21	1,57	0,20
2	3,66	3,58	3,34	3,53	0,10
4	1,12	0,86	1,01	1,00	0,07
6	1,11	0,41	0,49	0,67	0,22
8	1,73	1,03	0,81	1,19	0,28
10	2,18	1,21	1,11	1,50	0,34
12	2,37	1,73	1,48	1,86	0,27
14	---	1,38	1,53	1,46	0,08

Anhang Tab. 7.3: Zeitverlauf der normalisierten mRNA-Verhältnisse von *gapdh* und *actb* in meningealen Primärkulturen von Goldfischen bis zwei Wochen nach der Präparation. Die mRNA-Verhältnisse der Gene *gapdh* und *actb* wurden mittels RT-qPCR relativ zu einem externen Standard (Kalibrator-cDNA) quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM).

gapdh					
Zeit nach Erstellung der Zellkultur [Tage]	mRNA-Verhältnis (auf Kalibrator normalisiert)			Mittelwert	SEM
0	0,190	0,158	0,172	0,173	0,009
2	0,492	0,273	0,433	0,399	0,065
4	0,958	0,912	1,246	1,039	0,105
6	1,520	1,553	1,620	1,564	0,030
8	1,177	1,273	1,273	1,241	0,032
10	0,965	1,000	1,044	1,003	0,023
12	0,786	0,855	0,880	0,840	0,028
14	---	0,965	0,880	0,923	0,043
actb					
Zeit nach Erstellung der Zellkultur [Tage]	mRNA-Verhältnis (auf Kalibrator normalisiert)			Mittelwert	SEM
0	0,152	0,112	0,113	0,125	0,013
2	0,466	0,274	0,345	0,362	0,056
4	1,083	0,971	1,037	1,031	0,033
6	0,884	1,083	1,200	1,056	0,092
8	0,675	0,747	0,852	0,758	0,051
10	0,646	0,618	0,715	0,660	0,029
12	0,575	0,614	0,665	0,618	0,026
14	---	0,614	0,628	0,621	0,007

Anhang Tab. 7.4: Verlauf der Sekretion von Ependymin im Zellkulturmedium von meningealen Primärkulturen des Goldfisches bis 16 Tage nach der Präparation. Nach der Präparation der Primärkulturen wurden die Zellen wie in Kap. 2.7.6 beschrieben ausgesät. An jedem zweiten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Ependymin-Konzentration des entnommenen Mediums mittels RIA bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM).

Zeit nach Erstellung der Zellkultur [Tage]	Ependymin-Konzentration [ng/ml]			Mittelwert	SEM
2	1171,02	6500,15	2546,66	3405,94	1597,26
4	42,12	211,42	80,3	111,28	51,27
6	11,17	36,69	35,06	27,64	8,25
8	7,96	14,8	32,61	18,45	7,35
10	8,21	12,64	---	10,43	2,22
12	3,69	---	---	3,69	---
14	2,66	---	---	2,66	---
16	2,16	---	---	2,16	---

Anhang Tab. 7.5: Zeitverlauf der normalisierten mRNA-Verhältnisse der Gene *epd1*, *epd2* und *l1-e587* nach Cortisol-Zugabe in meningealen Primärkulturen von Goldfischen. Am Versuchstag (8. Tag) wurden die Zellen mit Cortisol-haltigem Medium (6250 µg/l Cortisol) versetzt und die mRNA-Menge von *epd1*, *epd2* und *l1-e587* nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mittels RT-qPCR bestimmt. Die bestimmten mRNA-Mengen wurden auf die Mittelwerte der jeweiligen Kontrollen normalisiert, die weiterhin Cortisol-freies Medium bekommen haben (mRNA-Verhältnis). Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM).

epd1							
Zeit nach Cortisol-Zugabe [min]	20	40	60	90	120	180	300
mRNA-Verhältnis (auf Kontrollen normalisiert)	0,976 0,673 0,840 1,338	1,468 1,791 1,107 1,250	0,758 0,979 0,989 0,325 0,991 0,503 2,132	1,055 0,778 1,338 1,221	1,134 1,056 1,418	1,074 0,917 0,541	1,013
Mittelwert	0,957	1,404	0,954	1,098	1,203	0,844	1,013
SEM	0,141	0,149	0,220	0,122	0,110	0,158	---
epd2							
Zeit nach Cortisol-Zugabe [min]	20	40	60	90	120	180	300
mRNA-Verhältnis (auf Kontrollen normalisiert)	0,994 0,524 0,856 1,499	1,186 1,178 1,394 1,947	0,629 0,954 0,977 0,108 1,012 0,393 2,875	1,136 0,797 1,404 1,317	1,464 1,017 1,566	0,964 0,708 0,575	1,100
Mittelwert	0,968	1,426	0,992	1,164	1,349	0,749	1,100
SEM	0,203	0,181	0,339	0,134	0,169	0,114	---
l1-e587							
Zeit nach Cortisol-Zugabe [min]	20	40	60	90	120	180	300
mRNA-Verhältnis (auf Kontrollen normalisiert)	0,838 1,046 0,970 1,181	1,070 0,985 0,948 0,936	1,088 0,970 1,016 1,174 1,018 1,099 0,743	0,940 0,932 1,153 1,052	0,971 0,954 1,091	1,241 0,865 1,101	0,955
Mittelwert	1,008	0,985	1,015	1,019	1,005	1,069	0,955
SEM	0,072	0,030	0,052	0,052	0,043	0,110	---

Anhang Tab. 7.6: Zeitverlauf der normalisierten mRNA-Verhältnisse der Referenzgene *gapdh* und *actb* nach Cortisol-Zugabe in meningealen Primärkulturen von Goldfischen. Am Versuchstag (8. Tag) wurden die Zellen mit Cortisol-haltigem Medium (6250 µg/l Cortisol) versetzt und die mRNA-Menge von *gapdh* und *actb* nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mittels RT-qPCR bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM).

gapdh							
Zeit nach Cortisol-Zugabe [min]	20	40	60	90	120	180	300
mRNA-Verhältnis (auf Kontrollen normalisiert)	0,965 0,981 0,814 1,040	0,974 1,009 0,876 0,915	0,980 1,121 0,974 0,846 0,990 1,005 0,769	1,084 1,119 1,152 0,924	0,639 0,947 1,137	1,158 0,884 1,193	1,170
Mittelwert	0,950	0,943	0,955	1,070	0,908	1,078	1,170
SEM	0,048	0,030	0,043	0,051	0,145	0,098	---
actb							
Zeit nach Cortisol-Zugabe [min]	20	40	60	90	120	180	300
mRNA-Verhältnis (auf Kontrollen normalisiert)	0,969 0,990 0,976 0,827	0,991 0,994 0,934 0,928	0,989 0,994 0,960 0,908 0,983 0,751 1,201	1,038 1,044 0,982 1,082	0,615 0,927 1,027	1,051 1,048 0,947	1,038
Mittelwert	0,941	0,962	0,969	1,037	0,856	1,015	1,038
SEM	0,038	0,018	0,050	0,021	0,124	0,034	---

Anhang Tab. 7.7: Zeitverlauf der normalisierten mRNA-Verhältnisse der Gene *epd1*, *epd2* und *l1-e587* nach Corticosteron-Zugabe in meningealen Primärkulturen von Goldfischen. Am Versuchstag (8. Tag) wurden die Zellen mit Corticosteron-haltigem Medium (6250 µg/l Corticosteron) versetzt und die mRNA-Menge von *epd1*, *epd2* und *l1-e587* nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mittels RT-qPCR bestimmt. Die bestimmten mRNA-Mengen wurden auf die Mittelwerte der jeweiligen Kontrollen normalisiert, die weiterhin Corticosteron-freies Medium bekommen haben (mRNA-Verhältnis). Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM).

epd1						
Zeit nach Corticosteron-Zugabe [min]	20	40	60	90	120	180
mRNA-Verhältnis (auf Kontrollen normalisiert)	0,929	1,028 1,034 1,142 0,606	0,856 1,055 0,757 0,798 0,828	1,139	0,828 1,065	0,836
Mittelwert	0,929	0,953	0,859	1,139	0,946	0,836
SEM	---	0,119	0,052	---	0,118	---
epd2						
Zeit nach Corticosteron-Zugabe [min]	20	40	60	90	120	180
mRNA-Verhältnis (auf Kontrollen normalisiert)	1,054	1,357 1,273 0,951 0,865	0,819 0,852 0,961 0,793 0,909	1,104	0,717 1,026	0,880
Mittelwert	1,054	1,112	0,867	1,104	0,871	0,880
SEM	---	0,120	0,030	---	0,155	---
l1-e587						
Zeit nach Corticosteron-Zugabe [min]	20	40	60	90	120	180
mRNA-Verhältnis (auf Kontrollen normalisiert)	1,006	1,092 1,075 0,884 1,381	1,070 0,932 1,060 0,966	1,139	0,873 1,051	1,047
Mittelwert	1,006	1,108	1,007	1,139	0,962	1,047
SEM	---	0,103	0,034	---	0,089	---

Anhang Tab. 7.8: Zeitverlauf der normalisierten mRNA-Verhältnisse der Referenzgene *gapdh* und *actb* nach Corticosteron-Zugabe in meningealen Primärkulturen von Goldfischen. Am Versuchstag (8. Tag) wurden die Zellen mit Corticosteron-haltigem Medium (6250 µg/l Corticosteron) versetzt und die mRNA-Menge von *gapdh* und *actb* nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mittels RT-qPCR bestimmt. Die bestimmten mRNA-Mengen wurden auf die Mittelwerte der jeweiligen Kontrollen normalisiert, die weiterhin Corticosteron-freies Medium bekommen haben (mRNA-Verhältnis). Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM).

gapdh						
Zeit nach Corticosteron-Zugabe [min]	20	40	60	90	120	180
mRNA-Verhältnis (auf Kontrollen normalisiert)	0,944	0,930 0,949 0,985 0,775	0,947 1,159 1,012 1,052 1,047	0,890	0,980 0,995	1,156
Mittelwert	0,944	0,910	1,043	0,890	0,987	1,156
SEM	---	0,046	0,034	---	0,007	---
actb						
Zeit nach Corticosteron-Zugabe [min]	20	40	60	90	120	180
mRNA-Verhältnis (auf Kontrollen normalisiert)	1,046	0,957 0,972 0,811 1,265	0,885 0,989 0,950 0,966 1,087	0,919	0,943 0,921	1,038
Mittelwert	1,046	1,001	0,975	0,919	0,932	1,038
SEM	---	0,095	0,033	---	0,011	---

Anhang Tab. 7.9: Zeitverlauf der normalisierten mRNA-Verhältnisse der Gene *epd1*, *epd2* und *l1-e587* nach Cortisol-Entzug in meningealen Primärkulturen von Goldfischen. Die Zellen wurden drei Tage vor dem Versuch mit 6250 µg/l Cortisol im Kulturmedium behandelt (Kap. 2.8.1). Am Versuchstag (8. Tag) wurde das Cortisol-haltige mit Cortisol-freiem Medium ersetzt (Cortisol-Entzug) und die mRNA-Menge von *epd1*, *epd2* und *l1-e587* nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mittels RT-qPCR bestimmt. Die bestimmten mRNA-Mengen wurden auf die Mittelwerte der jeweiligen Kontrollen normalisiert, die weiterhin Cortisol-freies Medium bekommen haben (mRNA-Verhältnis). Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM).

epd1								
Zeit [min]	20	40	60	75	90	120	180	300
mRNA-Verhältnisse (auf Kontrollen normalisiert)	0,889	0,899 0,578 1,277	1,370 1,537 1,928 1,565 1,867 1,529 2,348 5,058	2,936 3,766 0,937 1,962 1,316	0,977 0,519 0,706 1,157	1,091 0,903 1,308	1,037	1,115
Mittelwert	0,889	0,918	2,150	2,184	0,840	1,101	1,037	1,115
SEM	---	0,202	0,430	0,521	0,141	0,117	---	---
epd2								
Zeit [min]	20	40	60	75	90	120	180	300
mRNA-Verhältnisse (auf Kontrollen normalisiert)	0,678	0,787 0,567 1,483	2,139 1,996 3,455 3,307 2,454 1,273 2,114 7,114	7,303 5,498 0,771 2,292 2,538	1,154 0,369 0,745 1,068	1,192 0,694 1,095	1,050	1,280
Mittelwert	0,678	0,945	2,981	3,681	0,834	0,994	1,050	1,280
SEM	---	0,276	0,641	1,186	0,178	0,152	---	---
l1-e587								
Zeit [min]	20	40	60	75	90	120	180	300
mRNA-Verhältnisse (auf Kontrollen normalisiert)	1,034	0,859 0,805 1,071	1,199 0,943 0,910 0,865 1,004 1,125 1,112 1,045	0,816 1,010 1,154 0,902 1,008	0,872 0,846 0,833 2,053	1,008 1,202 1,255	1,146	0,867
Mittelwert	1,034	0,912	1,025	0,978	1,151	1,155	1,146	0,867
SEM	---	0,081	0,041	0,057	0,301	0,075	---	---

Anhang Tab. 7.10: Zeitverlauf der normalisierten mRNA-Verhältnisse der Referenzgene *gapdh* und *actb* nach Cortisol-Entzug in meningealen Primärkulturen von Goldfischen. Die Zellen wurden drei Tage vor dem Versuch mit 6250 µg/l Cortisol im Kulturmedium behandelt (Kap. 2.8.1). Am Versuchstag (8. Tag) wurde das Cortisol-haltige mit Cortisol-freiem Medium ersetzt (Cortisol-Entzug) und die mRNA-Menge von *gapdh* und *actb* nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mittels RT-qPCR bestimmt. Die bestimmten mRNA-Mengen wurden auf die Mittelwerte der jeweiligen Kontrollen normalisiert, die weiterhin cortisolhaltiges Medium bekommen haben (mRNA-Verhältnis). Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM).

Referenzgen	*gapdh*							
Zeit nach Cortisol-Entzug [min]	20	40	60	75	90	120	180	300
mRNA-Verhältnis (auf Kontrollen normalisiert)	1,259	1,195 0,971 0,933	1,041 0,893 0,882 0,908 0,956 0,940 0,975 1,320	0,991 1,014 0,981 0,968 1,081	0,827 1,171 0,973 0,990	0,933 0,939 1,010	1,073	0,892
Mittelwert	1,259	1,033	0,989	1,007	0,991	0,961	1,073	0,892
SEM	---	0,081	0,051	0,020	0,070	0,025	---	---
Referenzgen	*actb*							
Zeit nach Cortisol-Entzug [min]	20	40	60	75	90	120	180	300
mRNA-Verhältnis (auf Kontrollen normalisiert)	1,043	1,284 0,934 0,879	1,005 0,948 0,941 0,924 0,961 0,952 0,925 1,109	0,966 0,954 1,021 0,806 0,799	1,005 1,163 0,983 1,092	0,998 0,791 0,923	1,042	1,060
Mittelwert	1,043	1,032	0,971	0,909	1,061	0,904	1,042	1,060
SEM	---	0,127	0,022	0,045	0,041	0,060	---	---

Anhang Tab. 7.11: Normalisierte mRNA-Verhältnisse 1 h nach Cortisol-Entzug in meningealen Primärkulturen von Goldfischen. Die Zellen wurden drei Tage vor dem Versuch mit 250, 1250 µg/l Cortisol im Kulturmedium behandelt (Kap. 2.8.1). Am Versuchstag (8. Tag) wurde das Cortisol-haltige mit Cortisol-freiem Medium ersetzt. Nach 1 h Inkubation wurde mittels RT-qPCR die mRNA-Menge von *epd1*, *epd2* und *l1-e587* bestimmt und auf die Mittelwerte der jeweiligen Kontrollen normalisiert, die weiterhin Cortisol-haltiges Medium (in gleicher Konzentration wie zuvor) bekommen haben (mRNA-Verhältnis). Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM).

Zielgen	*epd1*			*epd2*			*L1*		
Cortisol-Entzug [µg/l]	250	1250	6250	250	1250	6250	250	1250	6250
mRNA-Verhältnis (auf Kontrollen normalisiert)	1,571	1,308	1,370	1,805	1,549	2,139	0,951	0,979	1,199
	1,086	1,054	1,537	0,866	1,478	1,996	1,169	0,970	0,943
			1,928			3,455			0,910
			5,058			7,114			0,865
			1,867			2,454			1,004
			1,529			1,273			1,125
			2,348			2,114			1,112
			1,565			3,307			1,045
Mittelwert	1,328	1,181	2,150	1,336	1,514	2,981	1,060	0,975	1,025
SEM	0,243	0,127	0,430	0,470	0,036	0,641	0,109	0,005	0,041

Anhang Tab. 7.12: Zeitverlauf der normalisierten Ependymin-Konzentration nach Cortisol-Entzug in meningealen lysierten Zellen und Medium. Die Zellen wurden drei Tage vor dem Versuch mit 6250 µg/l Cortisol im Kulturmedium behandelt (Kap. 2.8.1). Am Versuchstag (8. Tag) wurde das Cortisol-haltige mit Cortisol-freiem Medium ersetzt (Cortisol-Entzug) und die Ependymin-Konzentration nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mittels Ependymin-RIA (Kap. 2.11.1) in den lysierten Zellen und Medium bestimmt. Die bestimmten Konzentrationen wurden auf die Mittelwerte der jeweiligen Kontrollen normalisiert, die weiterhin Cortisol-haltiges Medium bekommen haben. Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM).

	Zellen			Medium		
Zeit nach Cortisol-Entzug [min]	60	120	180	60	120	180
Ependymin-Konzentration (auf Kontrollen normalisiert)	1,154	0,924	0,671	1,988	1,366	1,383
	1,671	1,130	0,770	0,724	1,443	1,093
	0,877	0,752	1,228	1,410	1,136	0,843
	1,108	0,967	1,241	0,673	4,680	0,839
Mittelwert	1,202	0,943	0,977	1,199	2,156	1,040
SEM	0,168	0,078	0,150	0,312	0,844	0,129

Anhang Tab. 7.13: Normalisierte mRNA-Verhältnisse von *epd1*, *epd2* und *l1-e587* 1 h nach Cortisol-Entzug bzw. Zugabe eines GR-Antagonisten (RU486) in meningealen Primärkulturen von Goldfischen. Die Zellen wurden drei Tage vor dem Versuch mit 6250 µg/l Cortisol im Kulturmedium behandelt (Kap. 2.8.1). Am Versuchstag (8. Tag) wurde das Cortisol-haltige mit Cortisol-freiem Medium ersetzt, bzw. mit 1 mM RU486 (GR-Antagonist) im Kulturmedium behandelt (Kap. 2.8.1). Nach 1 h Inkubation wurde mittels RT-qPCR das mRNA-Verhältnis von *epd1*, *epd2* und *l1-e587* bestimmt und auf die Mittelwerte der jeweiligen Kontrollen normalisiert, die weiterhin Cortisol-freies Medium bekommen haben. Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM).

Zielgen	*epd1*			*epd2*			*l1-e587*		
Behandlung	Cortisol-Entzug	RU486-Zugabe	RU486-Zugabe & Cortisol-Entzug	Cortisol-Entzug	RU486-Zugabe	RU486-Zugabe & Cortisol-Entzug	Cortisol-Entzug	RU486-Zugabe	RU486-Zugabe & Cortisol-Entzug
mRNA-Verhältnis (auf Kontrollen normalisiert)	1,370	3,318	3,705	2,139	6,034	7,290	1,199	0,926	0,991
	1,537	4,836	1,376	1,996	3,240	1,349	0,943	1,021	0,964
	1,928	1,549	0,761	3,455	2,806	0,857	0,910	0,669	0,985
	1,867			2,454			0,865		
	1,529			1,273			1,004		
	2,348			2,114			1,125		
	1,565			3,307			1,112		
	5,058			7,114			1,044		
Mittelwert	2,150	3,234	1,947	2,981	4,027	3,165	1,025	0,872	0,980
SEM	0,430	0,950	0,897	0,641	1,011	2,067	0,041	0,105	0,008

Anhang Tab. 7.14: Normalisierte mRNA-Verhältnisse von *epd1*, *epd2* und *l1-e587* 1 h nach Cortisol- bzw. Zugabe eines GR-Antagonisten (RU486) in meningealen Primärkulturen von Goldfischen. Die Zellen wurden am Versuchstag (8. Tag) mit 6250 µg/l Cortisol (Cortisol-Zugabe) bzw. mit 1 mM RU486 (GR-Antagonist) im Kulturmedium behandelt (Kap. 2.8.1). Nach 1 h Inkubation wurde mittels RT-qPCR das mRNA-Verhältnis von *epd1*, *epd2* und *l1-e587* bestimmt und auf die Mittelwerte der jeweiligen Kontrollen normalisiert, die weiterhin Cortisol-freies Medium bekommen haben. Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM).

Zielgen	*epd1*			*epd2*			*l1-e587*		
Behandlung	Cortisol-Zugabe	Cortisol & RU486-Zugabe	RU486-Zugabe	Cortisol-Zugabe	Cortisol & RU486-Zugabe	RU486-Zugabe	Cortisol-Zugabe	Cortisol & RU486-Zugabe	RU486-Zugabe
mRNA-Verhältnis (auf Kontrollen normalisiert)	0,758	1,055	1,117	0,629	1,054	1,010	1,088	0,691	0,700
	0,979	0,831	0,491	0,954	0,698	0,447	0,970	1,053	1,019
	0,989	0,874	1,881	0,977	0,394	0,976	1,016	0,792	0,825
	0,325			0,108			1,174		
	0,991			1,012			1,018		
	0,503			0,393			1,099		
	2,132			2,875			0,743		
Mittelwert	0,954	0,920	1,163	0,992	0,715	0,811	1,015	0,845	0,848
SEM	0,220	0,069	0,402	0,339	0,191	0,182	0,052	0,108	0,093

Anhang Tab. 7.15: Cortisol-Konzentrationen nach bis zu sieben Tagen Inkubation im Kulturmedium. Zur Untersuchung der Stabilität von Cortisol unter Kulturbedingungen wurde den Kulturen 250, 1250 und 6250 µg/l Cortisol (Kap. 2.8.1) zugegeben und nach 5 h, ein Tag und sieben Tagen bzw. sofort die Konzentrationen mittels Cortisol-RIA-Kit (Demeditec Diagnostics; Kap. 2.8.2) bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM).

Inkubationszeit in Zellkultur	Cortisol-Konzentration [µg/l] ohne Zugabe von Cortisol		Mittelwert	SEM
keine	0,02	0,26	0,14	0,12
5 h	0,01	0,00	0,01	0,01
1 Tag	0,36	7,98	4,17	3,81
7 Tage	2,29	0,00	1,15	1,14
Inkubationszeit in Zellkultur	Cortisol-Konzentration [µg/l] nach Zugabe von 250 µg/l Cortisol		Mittelwert	SEM
keine	181,52	170,45	175,98	5,54
5 h	144,23	222,34	183,29	39,06
1 Tag	183,62	115,80	149,71	33,91
7 Tage	216,26	173,47	194,86	21,39
Inkubationszeit in Zellkultur	Cortisol-Konzentration [µg/l] nach Zugabe von 1250 µg/l Cortisol		Mittelwert	SEM
keine	987,56	1094,87	1041,22	53,65
5 h	1031,19	1405,08	1218,13	186,95
1 Tag	1019,62	717,19	868,41	151,22
7 Tage	1009,58	1227,18	1118,38	108,80
Inkubationszeit in Zellkultur	Cortisol-Konzentration [µg/l] nach Zugabe von 6250 µg/l Cortisol		Mittelwert	SEM
keine	5624,10	5346,13	5485,11	138,98
5 h	6049,06	5947,40	5998,23	50,83
1 Tag	5349,07	5950,92	5650,00	300,92
7 Tage	5751,63	4848,73	5300,18	451,45

Anhang Tab. 7.16: Normalisierte mRNA-Verhältnisse 1 h nach Zugabe von Antiseren gegen EPD in meningealen Primärkulturen von Goldfischen. Den Zellen wurde am Versuchstag (8. Tag) α-EPD (gegen deglycosyliertes EPD) bzw. α-EPDβ (gegen bi-N-glycosyliertes EPD) Antiserum (1:50) zugesetzt (Kap. 2.8.2). Nach 1 h Inkubation wurde mittels RT-qPCR die mRNA-Menge von *epd1*, *epd2* und *l1-e587* bestimmt und auf die Mittelwerte der Kontrollen normalisiert, die mit neutralem Kaninchenserum (NRS) behandelt wurden (mRNA-Verhältnis). Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM).

Zielgen	*epd1*			*epd2*			*l1-e587*		
Art der Antiserum-Behandlung	α-EPD	α-EPDβ	keine Zugabe	α-EPD	α-EPDβ	keine Zugabe	α-EPD	α-EPDβ	keine Zugabe
mRNA-Verhältnis	1,337	2,459	1,334	1,273	2,793	1,222	1,043	1,028	1,063
(auf NRS-Kontrollen	1,362	2,850	1,108	1,919	3,561	1,036	0,923	0,966	1,072
normalisiert)	1,350	1,121	2,220	1,342	1,383	1,014	0,878	0,289	0,949
Mittelwert	1,350	2,143	1,554	1,511	2,579	1,090	0,948	0,761	1,028
SEM	0,007	0,641	0,339	0,205	0,781	0,066	0,049	0,290	0,040

Anhang Tab. 7.17: Normalisierte mRNA-Verhältnisse 1 h bzw. 24 h nach Zugabe von ECF-Extrakt in meningealen Primärkulturen von Goldfischen. Den Zellen wurde am Versuchstag (8. Tag) 54 µg/ml ECF-Extrakt (Extrazellulärflüssigkeit aus Goldfischgehirnen in TBS; Kap. 2.6.1) im Medium zugesetzt (Kap. 2.8.2). Nach 1 h bzw. 24 h Inkubation wurde mittels RT-qPCR die mRNA-Menge von *epd1*, *epd2* und *l1-e587* bestimmt und auf die Mittelwerte der Kontrollen normalisiert, die mit der gleichen Volumenzugabe (10 % v/v) an TBS (*tris buffered saline*) behandelt wurden (mRNA-Verhältnis). Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM).

	epd1		*epd2*		*l1-e587*	
Behandlung	ECF-Extrakt	unbehandelt	ECF-Extrakt	unbehandelt	ECF-Extrakt	unbehandelt
mRNA-Verhältnis (auf	0,793	0,572	0,993	0,581	0,998	1,056
TBS-Kontrollen normalisiert)	0,872	0,552	1,006	0,396	1,059	0,950
nach 1 h Inkubation	1,110	1,051	1,321	1,141	1,289	1,026
Mittelwert	0,925	0,725	1,107	0,706	1,115	1,011
SEM	0,095	0,163	0,107	0,224	0,089	0,032
	epd1		*epd2*		*l1-e587*	
Behandlung	ECF-Extrakt	unbehandelt	ECF-Extrakt	unbehandelt	ECF-Extrakt	unbehandelt
mRNA-Verhältnis (auf	1,432	1,693	1,512	1,570	1,169	1,114
TBS-Kontrollen normalisiert)	1,540	1,026	2,539	0,979	0,954	1,435
nach 24 h Inkubation		0,746		0,925		1,193
Mittelwert	1,486	1,155	2,026	1,158	1,061	1,247
SEM	0,054	0,281	0,513	0,206	0,108	0,097

DANKSAGUNG

Zu besonderem Dank bin ich meinen Professoren verpflichtet. Zunächst danke ich Prof. Dr. Rupert Schmidt für die Überlassung des Themas, des Arbeitsplatzes und die zahlreichen hilfreichen Diskussionen sowohl zu theoretischen als auch zu praktischen Fragestellungen. Ich danke außerdem Prof. Dr. Reinhard Lakes-Harlan und Prof. Dr. Michael Martin, die mich nach dem unerwarteten Ableben von Prof. Dr. Rupert Schmidt in den letzten Schritten meiner Arbeit so bereitwillig unterstützt haben. Prof. Dr. Reinhard Lakes-Harlan danke ich zudem für die Erstellung des Erstgutachtens, die wissenschaftliche Betreuung, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die vielen konstruktiven Ratschläge. Prof. Dr. Michael Martin danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens und für die hilfreiche fachliche Beratung.

Des Weiteren möchte ich meine Dankbarkeit allen Mitarbeitern der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit (ZBB) für das freundliche und familiäre Arbeitsklima ausdrücken. Petra Bepler-Kranert und Christiane Happel bin ich für die kompetente Beratung und die hervorragende technische Assistenz während der gesamten Laborarbeit zu großem Dank verpflichtet. Gabi Scheller danke ich für Ihre stets schnelle Hilfe zur Bewältigung bürokratischer Hürden und Verwaltungsangelegenheiten. Außerdem bin ich Roman Göthe und Dr. David Hinchliffe für die gute Zusammenarbeit und für die immer vorhandene Diskussionsbereitschaft zu methodischen und theoretischen Fragestellungen dankbar.

Ich danke weiterhin Johannes Strauß, Nanina Tron und Joscha Alt aus der Arbeitsgruppe der Integrativen Sinnesphysiologie für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die vielen fachkundigen Diskussionen.

Ein besonderer Dank geht an meine Lebensgefährtin Julia Renz für ihre Geduld, Motivation und die anregenden Diskussionen zu thematischen Problemstellungen.

Ich bin schließlich meiner Familie, besonders meinen Eltern, Antonio und Maria Penninella zu großer Dankbarkeit verpflichtet. Ihre langjährige finanzielle und persönliche Unterstützung während der Schulzeit, dem Studium und der Promotion hat die Fertigstellung dieser Arbeit erst ermöglicht.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, 29.07.2016 Donato Penninella