

Ultrastrukturelle Lokalisation des Glykoproteins Ependymin im Mittelhirndach (Tectum opticum) von Goldfischen und der Einfluss von Dressurversuchen

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

an den naturwissenschaftlichen Fachbereichen

der

Justus-Liebig Universität

Gießen

vorgelegt von

Dipl. Biol.

Florian Jean-Pierre Kreul

aus Koblenz

2011

D26

Dekan: Prof. Dr. V. Wolters

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Schmidt

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Dorresteijn

Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2011

für Taylan.

The Ependymin family comprises an almost ubiquitous set of glycoproteins found in several animal taxa, including protozoa. Named after the first location in the ependymal zone of goldfish brain optic tectum after learning events, the function of these secreted proteins is still obscure. Ependymin synthesis is found limited to the inner meningeal layer of the midbrain optic tectum. However, due to the broad distribution pattern of the Ependymin members among several tissues such as liver, intestine, heart, gonads, bone marrow and blood serum, further sites of synthesis are suggested. After stressful environmental factors such as active avoidance conditioning, Ependymin synthesis was found to be enhanced in brain extracellular and cerebrospinal fluid.

In this thesis, goldfish were trained by three different training skills, namely an active avoidance conditioning, an operant conditioning and a vestibulomotor training task. For the first time, a comprehensive technical description of the novel shuttle boxes as used here completes the behaviour-related task of this PhD thesis.

After training, Ependymin localisation in the goldfish optic tectum, the major visual centre of the teleostean brain, is shown by means of electron microscopy and gold-conjugated antibodies via the postembedding technique. An atlas of ultra-structural pictures of several tectal areas helps to follow its functional organisation in concentric laminar layers. Proved by various control experiments, the optimal concentration of the primary antibody is found to be 1:1000.

According to ultra-structural observation, meningeal fibroblasts were shown to secrete Ependymin by a presumed apocrine or holocrine mechanism, respectively. Structural interactions suggest direct Ependymin secretion across the basement lamina and across the intermediate layer of the endomeninx. Collected in the perimeningeal and extracellular fluid, Ependymin is supposedly distributed to oxygenated sites proposed for regeneration and defence actions against pathogenic infections. As supported by statistical analyses, the observed association with membranes of glial cells or some neurons is accomplished by means of palmitoylated cysteins which were previously envisaged for forming disulfide bridges. Beside its extracellular localisation within the optic tectum, Ependymin was found also in extensions of radial glia cell, lysosomes as well as in the cytoplasm and nucleus of some pyramidal neurons.

Ependymin was shown to have no direct involvement in learning events, since it cannot be separated from stressful environmental states within the test subjects. In addition, successful active avoidance learning of goldfish in a shuttle box as primarily claimed for this thesis, failed for hitherto unknown reasons. An alternative set thresholds or criteria are proposed, in order to classify goldfishes as learners based on statistical valuations.

Zusammenfassung. Die Ependymin-Familie umfasst sekretorische Glykoproteine mit bislang unbekanntem molekularem Funktionen, deren Gene in zahlreichen Tierarten bis hin zum Einzeller nachgewiesen wurden. Ursprünglich in der namensgebenden Ependymalen Zone des Mittelhirndachs (Tectum opticum) nach Lernversuchen in Goldfischen entdeckt, wird es in den Fibroblasten der inneren Hirnhaut auch während Regenerationsprozessen synthetisiert, und unter anderem nach Stresseinflüssen vermehrt ausgeschüttet. Bei anderen Arten als dem Goldfisch wurde eine Expression des Ependymin-Gens auch außerhalb des Zentralen Nervensystems gezeigt. Daher sind weitere Synthesorte für die Ependymine wahrscheinlich.

In dieser Dissertation sollen Goldfische mit Hilfe eines aktiven Vermeidungstrainings, einer operanten Belohnungsdressur sowie einer vestibulomotorischen Dressur darauf trainiert werden, ein bestimmtes Verhalten zu erlernen. Eine umfassende technische Beschreibung der verwendeten neuartigen Wechselkammern hilft das Verhalten der Goldfische beim Vermeidungstraining nachzuvollziehen. Die Ependymin-Verteilung nach diesen Dressuren wird im Tectum opticum, dem visuellen Verarbeitungszentrum des Gehirns von Karpfenfischen, auf ultrastruktureller Ebene in zahlreichen Aufnahmen verfolgt.

Zur Betrachtung des Tectum opticum im Transmissionselektronenmikroskop wird das Gehirngewebe von trainierten bzw. untrainierten Goldfischen in ein flüssiges Harz (LR White) gebettet, in sehr dünne Scheiben geschnitten, mit Anti-Ependymin-Antikörpern markiert und schließlich über Gold-gekoppelte Antikörper im Elektronenmikroskop nachgewiesen (sog. *Post-embedding*). Die optimale Konzentration des hier verwendeten Primärantikörpers wurde in verschiedenen Kontrollexperimenten mit 1:1000 gefunden.

Ultrastrukturelle Aufnahmen zeugen von einem apokrinen bzw. holokrinen Sekretionsweg des Ependymins, das nach der massenhaften Freigabe aus den Fibroblasten direkt über die Basallamina in den extrazellulären Raum des Gehirns oder über die intermediäre Zellschicht der inneren Hirnhaut in den perimeningealen Raum sezerniert wird. Die beobachtete und statistisch überprüfte Anlagerung des hydrophilen Ependymins an die Zellmembranen von Gliazellen sowie einiger Neurone lässt eine Bindung über einen Membran-Anker, z. B. über eine Palmitoylierung, an solche Zellbereiche vermuten, die infolge regenerativer Mechanismen oder Pathogenabwehr durch erhöhten oxidativen Level gekennzeichnet sind. Abgesehen vom extrazellulären Vorkommen in den laminar aufgebauten Schichten des Tectum opticum, wurde Ependymin auch in den Fortsätzen der Radiärgliazellen und in Lysosomen markiert. Ebenso wurde im Zytoplasma und in den Kernen einiger pyramidaler Neurone Ependymin nachgewiesen.

Aus bisher unbekanntem Gründen konnte die aktive Vermeidungsdressur in der neuartigen Wechselkammer nicht erfolgreich angewendet werden. Daher werden vergleichend mit verhaltensrelevanten Studien mögliche Ursachen für das Ausbleiben einer Konditionierung beschrieben.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 8 |
| 1.1 | Glykobiologie | 8 |
| 1.2 | Ependymine | 9 |
| 1.3 | Funktionelle Betrachtung | 11 |
| 1.4 | Ziele der Dissertation | 12 |
| 2 | Material und Methoden | 14 |
| 2.1 | Material | 14 |
| 2.1.1 | Geräte | 14 |
| 2.1.2 | Software | 14 |
| 2.1.3 | Chemikalien | 15 |
| 2.1.4 | Seren | 15 |
| 2.1.5 | Verbrauchsmaterialien und sonstiges | 16 |
| 2.2 | Methoden | 17 |
| 2.2.1 | Der Goldfisch als Versuchstier | 17 |
| 2.2.2 | Beschreibung der Wechselkammer (<i>Shuttle-Box</i>) | 18 |
| 2.2.3 | Dressuren - Trainingsversuche | 19 |
| 2.2.4 | Präparation des Tectum opticum | 24 |
| 2.2.5 | Einbettung des Gehirngewebes | 27 |
| 2.2.6 | Schneiden der Probenblöcke | 29 |
| 2.2.7 | Immunogoldmarkierung des Ependymins | 31 |
| 2.2.8 | Kontrastierung der Gewebeschnitte | 33 |
| 2.2.9 | Betrachtung des Tectum opticum | 33 |
| 2.2.10 | Filmentwicklung | 34 |
| 2.2.11 | Bildbearbeitung und Auswertung der Daten | 34 |
| 3 | Ergebnisse | 35 |
| 3.1 | Untersuchungen an der Wechselkammer | 35 |
| 3.1.1 | Messungen der elektrischen Spannung | 35 |
| 3.1.2 | Berechnung des elektrischen Stroms | 36 |
| 3.1.3 | Spektralanalyse der Infrarot-Dioden | 37 |
| 3.2 | Dressuren - Trainingsversuche | 39 |
| 3.2.1 | Aktives aversives Meidetraining in der Wechselkammer (<i>Shuttle-Box</i>) | 39 |
| 3.2.2 | Operante appetitive Belohnungsdressur (Farbtraining) | 40 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.2.3 | Vestibulo-motorisches Training („Floßtraining“) | 41 |
| 3.3 | Markierung des Antigens Ependymin | 42 |
| 3.3.1 | Verdünnungsfaktoren der Antikörper | 42 |
| 3.3.2 | Bestimmung des Verdünnungsfaktors durch direkten Vergleich | 46 |
| 3.4 | Vergleich der Fixierungslösungen | 46 |
| 3.5 | Ultrastrukturelle Ependymin-Verteilung im Tectum opticum | 48 |
| 3.5.1 | Ependymale Zone | 49 |
| 3.5.2 | Stratum periventriculare (SPV) | 50 |
| 3.5.3 | Stratum album centrale (SAC) | 51 |
| 3.5.4 | Stratum griseum centrale (SGC) | 52 |
| 3.5.5 | Stratum fibrosum et griseum superficiale (SFGS) | 56 |
| 3.5.6 | Stratum opticum (SO) | 57 |
| 3.5.7 | Stratum marginale (SM) | 57 |
| 3.5.8 | Hirnhaut - Meninx (Mx) | 62 |
| 3.5.9 | Zusammenfassung der Ependymin-Markierung im Tectum opticum | 71 |
| 3.6 | Auswertung der Bilder mit Hilfe des Bildanalyse-Programms analySIS | 73 |
| 3.6.1 | Ependymin an Membranen im Stratum fibrosum et griseum superficiale | 78 |
| 3.6.2 | Ependymin an S1-Terminalien im Stratum marginale | 79 |
| 4 | Diskussion | 81 |
| 4.1 | Die Dressur von Goldfischen | 81 |
| 4.1.1 | Das Verhalten des Goldfisches in der Wechselkammer | 81 |
| 4.1.2 | Vergleichende Betrachtung der Dressuren | 82 |
| 4.1.3 | Ependymin-Synthese nach der Dressur | 84 |
| 4.1.4 | Wann sind Goldfische konditioniert? | 85 |
| 4.2 | Vorkommen des Ependymins im Tectum opticum | 85 |
| 4.2.1 | Ependymin in der inneren Endomeninx | 86 |
| 4.2.2 | Sekretion aus der inneren Endomeninx | 87 |
| 4.2.3 | Ependymin in der Extrazellulärflüssigkeit | 87 |
| 4.2.4 | Regenerationsbedingte Anlagerung | 88 |
| 4.2.5 | Markierungen des polyklonalen Antikörpers „Perseus“ | 89 |
| 4.3 | Ependymin als Stress-induziertes Onkogen? | 90 |
| 5 | Literaturverzeichnis | 93 |
| 6 | Anhang | 115 |

1 Einleitung

1.1 Glykobiologie

Allgemeines. Die Glykobiologie untersucht das Vorkommen und die Funktion von Zuckern im Organismus [CABEZAS 1994]. Kohlenhydrate bzw. Oligosaccharide kommen im Organismus meistens kovalent an Lipiden oder Proteinen gebunden vor [RADEMACHER *et al.* 1988]. Da sich einzelne Zucker untereinander an unterschiedlichen Stellen verknüpfen können und sich auch verzweigen, können Kohlenhydrate in nahezu unendlich vielen Variationen auftreten [GABIUS 2000]. Darüber hinaus hängt die Art der Glykosylierung einzelner Proteine ab von ihrem funktionellen Ort sowie dem jeweiligen Entwicklungsstand des Organismus' [HALTIWANGER & LOWE 2004]. Die Hauptfunktion der Kohlenhydrate wird als zellulärer Erkennungsmarker gesehen [DWEK 1996], übereinstimmend mit der Feststellung, dass fast alle Zellen Kohlenhydrate an ihrer Oberfläche tragen [COOK 1986]. Lektine können beispielsweise solche Interaktionen von Zelle zu Zelle vermitteln [LIS & SHARON 1998]. Mehrfach verzweigte Kohlenhydratketten können im Vergleich zu der gefalteten Aminosäurekette ein gewaltiges Volumen aufweisen, so dass große Bereiche der Proteinoberfläche von den Kohlenhydraten bedeckt werden [DWEK 1996].

Entstehung eines Glykoproteins. Wenn im Zytoplasma an einem Ribosom entstehende Proteine am Beginn, also an ihrem sog. aminoterminalen Ende, eine hydrophobe Abfolge an bestimmten Aminosäuren tragen, werden sie von einem Protein-Partikelkomplex erkannt [WALTER *et al.* 1981] und zusammen mit ihrem Ribosom an die Oberfläche des Endoplasmatischen Retikulums gebunden [STRUB *et al.* 1991]. Durch eine Translokationspore [ANDREWS & JOHNSON 1996] gelangt dann die entstehende Aminosäurekette ins Innere, ins Lumen, des Endoplasmatischen Retikulums. Dort wird zunächst die hydrophobe Signalsequenz enzymatisch abgespalten [DALBEY & VON HEIJNE 1992]. Im weiteren Verlauf dieser sog. Posttranslationalen Modifikationen können sich die Schwefelatome je zweier Cysteine aneinander binden [RICHARDSON *et al.* 1992]. Tritt die Sequenz Asparagin-x-Serin bzw. Threonin (x = beliebige Aminosäure außer Prolin) auf, so kann ein zuvor an Dolicholphosphat zusammengesetzter Komplex aus Mannose- und Glukose-Einheiten an das jeweilige Asparagin gebunden werden [STRUCK *et al.* 1978; SHARMA *et al.* 1981]. Nach Abspaltung der Glukose und einiger Mannose-Einheiten gelangt das entstehende Glykoprotein in den Golgi-Apparat [ZEUSCHNER *et al.* 2006]. Dort werden die Mannose-Einheiten durch eine Vielzahl an Enzymen weiter modifiziert: Mannose wird abgespalten und andere Zucker werden angehängt, z. B. N-Acetylglukosamin, Fukose, Galaktose oder N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) [DUNPHY

& ROTHMAN 1985]. Auch Glucuronsäure und ihre 3'-sulfatierte Form kann hier angelagert werden [SCHACHNER & MARTINI 1995]. Es werden je nach Verzweigung- und Verzuckerung meistens drei Grundtypen von Kohlenhydratketten unterschieden: der Oligomannose-Typus („*high-mannose*“), bei dem die Mannose-Einheiten erhalten bleiben, der komplexe Typus, bei dem die Mannose teils abgebaut und weitere, unterschiedliche Zucker gebunden werden, sowie eine Mischform aus den vorgenannten, den Hybrid-Typus [KORNFELD & KORNFELD 1985; ROYLE *et al.* 2006].

O-Glykosylierung. Neben der oben beschriebenen sog. *N*-Glykosylierung kann im Golgi-Komplex auch eine *O*-Glykosylierung stattfinden, bei der die Bindung am Sauerstoff der Seitenkette von hauptsächlich Serin oder Threonin erfolgt [LEHLE *et al.* 2006]. Eine bestimmte Erkennungssequenz gibt es bei der *O*-Glykosylierung nicht, aber ein Prolin vor bzw. drei Aminosäuren nach dem Serin/Threonin macht eine *O*-Glykosylierung wahrscheinlicher [DWEK 1996]. Im Gegensatz zur *N*-Glykosylierung sind die Kohlenhydratketten der *O*-glykosidischen Bindung in ihrer Länge und ihrer Zuckerzusammensetzung sehr variabel [DELL 2002].

1.2 Ependymine

Entdeckung im Goldfisch. Angeregt durch die Ergebnisse von HYDÉN & EGYHÁZI 1962 an Ratten, stellte SHASHOUA 1968 nach Verhaltensexperimenten an Goldfischen im Gehirn ebenfalls eine Erhöhung der *messenger*-RNA fest, das auf eine vermehrte Proteinsynthese hinweist. 1976 konnte er diese Erhöhung durch radioaktive Doppelmarkierung drei Proteinbereichen zuordnen, die er α , β und γ benannte [SHASHOUA 1976A]. Nach Produktion von Antiseren gegen die Proteine β und γ [SHASHOUA 1977A] wurde diesen gemäß ihrem erstmaligen Fundort in der Ependymalen Zone des Tectum opticum im Gehirn der Goldfische [BENOWITZ & SHASHOUA 1977] der Name „Ependymin“ gegeben [SHASHOUA 1977C].

Molekulare Eigenschaften. Nach Feststellung einer Markierung der Hirnhaut durch Antiseren [SCHMIDT 1983] konnte durch an Ependymin-*m*RNA bindende Nukleotidsequenzen [KÖNIGSTORFER *et al.* 1990] die Synthese der Ependymine in den Fibroblasten der Hirnhaut [SCHMIDT *et al.* 1992] gezeigt werden. Das Ependymin-Gen wird nur in der Hirnhaut abgelesen [RINDER *et al.* 1992]. Aus den Genen des Goldfisches [ADAMS & SHASHOUA 1994] können fünf verschiedene Transkripte aus zunächst 216 Aminosäuren gebildet werden: prependymin-I [KÖNIGSTORFER *et al.* 1989B] und preprepro-ependymin-II [KÖNIGSTORFER *et al.* 1989A], sowie Transkripte in denen verschiedene Aminosäuren ausgetauscht wurden [KÖNIGSTORFER *et al.* 1989A; THORMODSSON *et al.* 1992A]. Die Diversität liegt zum Teil an einer Genomduplikation bei verschiedenen Arten von Fischen [TAYLOR *et al.* 2003], die beim Goldfisch vor ca. 50 Millionen Jahren stattfand [UYENO & SMITH 1972], so dass zwei Kopien auf einem Chromosom liegen [ORTÍ & MEYER 1996]. Die Aminosäurekette der Ependymine bildet ein β -Faltblatt [GANSS & HOFFMANN 1993]. Ependymine tragen eine hydrophobe aminoterminale Signalsequenz aus 21 Aminosäuren [KÖNIGSTORFER *et al.* 1989B], die sie als

| MW [kDa] | Ependymin α | Ependymin β | Ependymin γ | Ependymin $\gamma\rho$ |
|----------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------|
| 40-45 | THORMODSSON <i>et al.</i> 1992A | | | |
| 38 | | THORMODSSON <i>et al.</i> 1992B | | |
| 37 | SHASHOUA 1976A, 1988 | SHASHOUA 1985 | | |
| 35 | | GANSS & HOFFMANN 1993 | | |
| 33 | | | THORMODSSON <i>et al.</i> 1992B | |
| 32 | | SHASHOUA 1976A | | |
| 31 | | SHASHOUA <i>et al.</i> 1990 | SHASHOUA 1985 | SHASHOUA 1988 |
| 30 | | | GANSS & HOFFMANN 1993 | |
| 26 | | | SHASHOUA 1976A, 1991 | |

Tabelle 1.1: Beispielhafte Benennung der verzuckerten Goldfisch-Ependymine nach unterschiedlichen gelelektrophoretischen Trennungsverfahren.

sekretorische Proteine klassifiziert [VON HEIJNE 1983]. Im Endoplasmatischen Retikulum wird diese Signalsequenz abgespalten, und das Protein ist bereit für weitere Modifikationen wie das Hinzufügen funktioneller Gruppen und Bindungen [KRISHNA & WOLD 1993].

Posttranslationale Modifikationen. Ependymine sind Glykoproteine [SHASHOUA 1982]. Als Glykoproteine tragen die Aminosäureketten Erkennungssequenzen für Glykosylierungen. Im Goldfisch können bis zu zwei Kohlenhydratketten N-glykosidisch gebunden und weiter umgeformt werden [MOREMEN *et al.* 1994]. Je nach Anzahl der Kohlenhydratketten haben die Ependymine ein bestimmtes Molekulargewicht. Die Benennung nach griechischen Buchstaben für jedes modifizierte Ependymin im Goldfischgehirn folgt der von SHASHOUA [1976A] nach den Verhaltenexperimenten entdeckten veränderten Bereichen; die Zuordnung hat in der Vergangenheit jedoch mehrfach gewechselt (Tab. 1.1). Das nach MALDI-MS [STAHL *et al.* 1991] ermittelte Molekulargewicht der Ependymine (ohne Signalsequenz) mit einer Kohlenhydratkette beträgt 24,4 kDa und mit zwei Kohlenhydratketten 26,6 kDa [HOFFMANN 1994].

Die Ependymine der Goldfische tragen Kohlenhydratketten des sog. komplexen Typs [GANSS & HOFFMANN 1993], die am terminalen Ende Sialinsäuren haben können [SHASHOUA *et al.* 1986]. Durch enzymatische Spaltung konnte gezeigt werden, dass das biglykosilierte Ependymin zwei unterschiedliche Kohlenhydratseitenketten trägt [MARKTSCHIEFFEL 1989; THORMODSSON *et al.* 1992B]. Saure Aminosäurereste an bestimmten Positionen [KÖNIGSTORFER *et al.* 1989B] tragen zur Fähigkeit bei zweiwertige Kationen zu binden [SCHMIDT 1986; SCHMIDT & MAKIOLA 1991]. Insgesamt fünf Cysteine in den Goldfisch-Ependyminen können Schwefelbrücken ausbilden [KÖNIGSTORFER *et al.* 1989A]. Ependymine können sich untereinander zusammenlagern und höhermolekulare Aggregate bilden [SCHMIDT & SHASHOUA 1981; THORMODSSON *et al.* 1992B]. Nach dem Modell von KAYA [2010] gelten die frühen Thesen über das Auftreten von Mikroheterogenitäten in Bezug auf die unterschiedlichen Isoelektrischen Punkte nach einer 2D-Gelelektrophorese [SHASHOUA 1985; THORMODSSON *et al.* 1992B; HOFFMANN & SCHWARZ 1996] als überholt.

Ependymine in anderen Organismen. Nachdem das Genom des Zebrafisches durch Pionierarbeiten von STREISINGER *et al.* [1981] zur Verfügung stand, wurden Ependymine als nächstes

im Gehirn von Zebrafischen nachgewiesen [STERRER *et al.* 1990]. Es folgten weitere Fischarten mehrerer Familien [MÜLLER-SCHMID *et al.* 1992, 1993; ADAMS & SHASHOUA 1994; ADAMS *et al.* 1996]. Im Jahre 1999 verweist ein Patent auf die Entdeckung Ependymins im menschlichen Embryonalgewebe [RUBEN & EBNER 1999]. Bald darauf folgte der Nachweis in vielen anderen Genera im Tierreich, so dass schließlich ein komplexer phylogenetischer Stammbaum der Ependymine dargestellt werden konnte [SUÁREZ-CASTILLO & GARCÍA-ARRARÁS 2007]. Überraschenderweise zeigte sich, dass das Vorkommen der Ependymine nicht auf das Gehirn beschränkt ist, sondern dass sie auch im Blutserum [SCHMIDT & LAPP 1987; RUBEN & EBNER 1999] und in verschiedenen Geweben zu finden sind [NIMMRICH *et al.* 2001]. Gemeinsames Merkmal aller Ependymine ist das Vorhandensein von vier Cysteinen, eine Asparaginsäure, ein Prolin und Glycin an definierten Positionen der Aminosäurekette [SUÁREZ-CASTILLO & GARCÍA-ARRARÁS 2007], sowie die ähnliche Abfolge von Aminosäuren gleicher Affinität zum wässrigen Medium [ORTÍ & MEYER 1996], das sog. hydrophatische Profil [KYTE & DOOLITTLE 1982].

Ependymin-verwandte Proteine? Durch Computer-gestützten Sequenzvergleich konnten keine dem Ependymin verwandten Gene gefunden werden [SUÁREZ-CASTILLO & GARCÍA-ARRARÁS 2007]. Eine Ausnahme stellt vermutlich das Gen *Has-Som* der Weichtiere dar, dessen Genprodukt vier konservierte Cysteine und zwei potentielle *N*-Glykosilierungsstellen aufweist und an der Pigmentierung der Schneckengehäuse beteiligt sein soll [JACKSON *et al.* 2007].

1.3 Funktionelle Betrachtung

Die eigentliche Funktion der Ependymine im Kontext molekularer Abläufe ist bis heute nicht eingehend geklärt [GANSS & HOFFMANN 2009]. Da weder die Aminosäurekette mit der Anzahl an Cysteinen [MÜLLER-SCHMID *et al.* 1992] zur potentiellen Ausbildung stabilisierender Schwefel-Brücken [VULLO & FRASCONI 2004], noch die Anzahl [MÜLLER-SCHMID *et al.* 1992] bzw. Zusammensetzung [STERRER *et al.* 1990] der Kohlenhydratseitenketten, das Vorhandensein der 3'-sulfatierten Glucuronsäure [GANSS & HOFFMANN 1993], sowie das Vermögen bzw. Ausmaß Kalzium an Sialinsäuren zu binden [GANSS & HOFFMANN 1993] unter den Ependyminen einzelner Arten evolutiv konserviert ist, scheinen diese Merkmale einen untergeordneten Einfluss auf die Funktion zu haben [ORTÍ & MEYER 1996]. Das Vorkommen der Ependymine in Geweben außerhalb des Gehirns [SUÁREZ-CASTILLO & GARCÍA-ARRARÁS 2007] weist auf ein globales Funktionsspektrum hin [APOSTOLOPOULOS *et al.* 2001].

HNK-1 Epitop. Das so genannte „HNK-1 Epitop“ wurde 1986 für Ependymin nachgewiesen [SHASHOUA *et al.* 1986]. 1981 wurde von ABO & BALCH [1981] ein monoklonaler Antikörper isoliert, der ein Antigen auf der Membran humaner natürlicher Killerzellen erkennt. Dieses Antigen stellte sich als 3'-sulfatierte Glukuronsäure, gebunden an N-Acetyllaktosamin, heraus [CHOU *et al.* 1986]. Dieses Oligosaccharid kann mit diversen Antikörpern an unterschiedlichen Stellen gebunden werden [KRUSE *et al.* 1984; SCHWARTING *et al.* 1987; SCHMITZ *et al.* 1994];

nicht alle benötigen zur Bindung die Sulfatgruppe an der letzten Glucuronsäure-Einheit. Dieses Oligosaccharid wurde bislang in Zelladhäsionsmolekülen, an Oberflächenproteinen der Glia, sowie an Komponenten der Extrazellulären Matrix, Glykolipiden und einigen Enzymen gefunden [SCHACHNER & MARTINI 1995]. Das Epitop ist entwicklungsabhängig, kommt also meist nur im jungen [CHOU *et al.* 1986; NORDLANDER 1993] oder sich reorganisierenden Organismus [HOPKINS *et al.* 1985] vor und nicht jedes Molekül trägt ein solches Epitop [KRUSE *et al.* 1984]. Durch den Nachweis dieses Oligosaccharids beim Goldfisch-Ependymin [SHASHOUA *et al.* 1986; GANSS & HOFFMANN 1993] wird die Ependymin-Familie in funktionelle Beziehung zu den Zelladhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Superfamilie gesetzt, obwohl nicht jedes Molekül mit einem HNK-1 Epitop zur Kalzium-unabhängigen Immunglobulin-Superfamilie gezählt wird [BÄCHLE 2004; DALVA *et al.* 2007].

Lektine und hormonelle Regulation. Die Bindung Ependymins an Laminin [MOHAN *et al.* 1990] und Selektin [ASA *et al.* 1992; GREEN *et al.* 1992] durch das HNK-1 Epitop, das als immunogen eingestuft wird [JUNGALWALA 1994], die Bindung an Kollagen [SCHWARZ *et al.* 1993] und das reiche Vorkommen in der Extrazellulärflüssigkeit [SCHMIDT & SHASHOUA 1981] in Verbindung mit Regenerationsvorgängen [SCHMIDT & SHASHOUA 1988; SUÁREZ-CASTILLO *et al.* 2004] und Zelldifferenzierung [GREGORIO-KING *et al.* 2002] zeigen die funktionelle Verwandtschaft der Ependymine zu den Lektinen (für Review, siehe SHARON & LIS 1989). Das Vorkommen Ependymins in weißen Blutkörperchen [LAKOS *et al.* 1994] und Lysosomen [DELLA VALLE *et al.* 2006] weist auf eine Funktion in der generellen Immunabwehr hin. Rezeptoren für Ependymine wurden postuliert [RUBEN & EBNER 1999].

Lernen und Gedächtnis. Die Erhöhung der Ependymin-Konzentrationen nach Verhaltensexperimenten [SHASHOUA 1976A] wurde in Beziehung zu Lernvorgängen gesetzt [SCHMIDT 1987; SCHMIDT *et al.* 1995]. Ependymin zeigt wie einige andere Proteine (z. B. S100; HYDÉN & LANGE 1970) eine erhöhte Syntheserate nach verschiedenen Verhaltensexperimenten [NELSON & ALKON 1989], so dass diese Proteine im Zusammenhang mit Langzeitpotenzierung, neuronaler Plastizität und Gedächtnisbildung gesehen werden [SHASHOUA 1982; SCHMIDT 2004]. Vergleiche mit Lernvorgängen, die im Hippocampus der Nagetiere stattfinden, wurden häufig gezogen [DUFFY *et al.* 1981; HESSE *et al.* 1984; SCHMIDT *et al.* 1986; SHASHOUA 1988-89; SCHMIDT 1989].

1.4 Ziele der Dissertation

Shashoua stellte 1989 eine Theorie auf, in der Ependymin am Langzeitgedächtnis beteiligt sein soll und entwickelte sein Modell basierend auf dem theoretischen Lernmodell von HEBB [1949], bei dem eine „schwache“ Synapse durch gleichzeitige Aktivierung mehrerer Axone in eine „starke“ umgeformt werden kann. Dabei soll Ependymin unter Aktivierung der zunächst schwachen Synapse durch spezielle Ependymin-Rezeptoren in die Postsynapse gelangen und dort nach Kalzium-Entzug im synaptischen Spalt durch Aggregation eine Art Zytoskelett für

den entstehenden postsynaptischen Dorn bilden, so dass dort eine starke Synapse entstehen kann [SHASHOUA 1988-89]. Es heisst dort: „*Direct proof for this, however, would require immunocytochemical evidence at the electron microscope level which is not available.*“ Im Hinblick auf die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation konnte dieser Theorie nicht entsprochen werden (siehe Kapitel 4.2.3).

Nach Darstellung ultrastruktureller Aufnahmen aus verschiedenen Schichten des Mittelhirndachs (Tectum opticum) vom Goldfisch (siehe Kapitel 3.5) wird an Hand von elektronenmikroskopischen Bildern systematisch das Vorkommen des Ependymins vom Syntheseort über den möglichen funktionellen Bestimmungsort bis hin zum Abbauweg begleitet (siehe Kapitel 4.2).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

| | |
|---------------------------------------|---|
| Aquariumpumpen Typ 2215 | EHEIM GmbH & Co. KG (Deizisau, D) |
| Destille | Heraeus Quarzschmelze GmbH (Hanau, D) |
| Eismaschine | ZIEGRA Eismaschinen GmbH (Isernhagen, D) |
| Heizplatte Typ 12801 | Medax GmbH & Co. KG (Rendsburg, D) |
| Laborofen Typ FT 420 | W. C. Heraeus (Hanau, D) |
| Leitfähigkeitsmessgerät DiST 3 | HANNA Instruments (Kehl am Rhein, D) |
| Messerbrecher EM KMR2 | Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, D) |
| Oszillograph 5031 Dual Beam Storage | TEKTRONIX, Inc. (Beaverton, OR, USA) |
| Personal Computer 386SXE, 16 MHz | LASER Video Technology Computers Ltd. (Hong Kong) |
| Probenrotator | PSI Service (Hemsbach, D) |
| Scanner Perfection 4990 Photo | Epson GmbH (Meerbusch, D) |
| Spektrometer | Eigenbau I. Physik. Institut (Gießen, D) |
| Steckkarte (Interface) | Lothar Bockstaller Hard- u. Software GmbH (Wehr, D) |
| Tischzentrifuge Microliter | Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, D) |
| Transmissionselektronenmikroskop: | |
| LEO 912 AB Omega | Carl ZEISS AG (Oberkochen, D) |
| EM 300 | Philips (Eindhoven, NL) |
| Trockner RC 30 | Kindermann GmbH (Ochsenfurt, D) |
| Ultramikrotom Ultracut R | Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, D) |
| Vergrößerungsgerät Focomat IIc | Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, D) |
| Wasseraufbereitungssystem Typ 05.8220 | TKA GmbH (Niederelbert, D) |

2.1.2 Software

| | |
|---|--|
| analySIS (cell [^] P 2.6) | Olympus Soft Imaging Solutions GmbH (Hamburg, D) |
| L ^A T _E X mit Textsatzprogramm T _E X | L ^A T _E X Project Public License (USA) |
| Photoshop CS 8.0 | Adobe Systems, Inc. (San Jose, CA, USA) |
| SciDAVis 0.2.3 | Free Software Foundation (Boston, MA, USA) |
| Turbo-Pascal (Steuerung Wechselkammer) | nassau@math.uni-frankfurt.de |
| Windows XP | Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA) |

2.1.3 Chemikalien

| | |
|---------------------------------|--|
| Aceton | Merck KGaA (Darmstadt, D) |
| Blei(II)nitrat | Merck KGaA (Darmstadt, D) |
| Chloroform | Merck KGaA (Darmstadt, D) |
| E-64 | Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA) |
| EGTA | Serva GmbH (Heidelberg, D) |
| Essigsäure | Merck KGaA (Darmstadt, D) |
| Ethanol | Merck KGaA (Darmstadt, D) |
| para-Formaldehyd | Serva GmbH (Heidelberg, D) |
| Glutardialdehyd | Agar Scientific Ltd. (Stansted, UK) |
| Glycin | Serva GmbH (Heidelberg, D) |
| Kaliumchlorid | Serva GmbH (Heidelberg, D) |
| Kaliumhydroxid | Serva GmbH (Heidelberg, D) |
| LR White, medium grade | London Resin Company (Woking, UK) |
| Magnesiumchlorid | Merck KGaA (Darmstadt, D) |
| Natriumdihydrogenphosphat | Merck KGaA (Darmstadt, D) |
| Natriumcacodylat | Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA) |
| Natriumchlorid | Merck KGaA (Darmstadt, D) |
| tri-Natriumcitrat | Merck KGaA (Darmstadt, D) |
| di-Natriumhydrogenphosphat | Merck KGaA (Darmstadt, D) |
| Natriummetaperjodat | Merck KGaA (Darmstadt, D) |
| di-Natriumtetraborat (Borax) | Merck KGaA (Darmstadt, D) |
| Osmiumtetroxid | Plano GmbH (Wetzlar, D) |
| Uranylacetat | Agar Scientific Ltd. (Stansted, UK) |
| Salzsäure | Merck KGaA (Darmstadt, D) |
| Toluidinblau O | Merck KGaA (Darmstadt, D) |
| poly-Vinylformaldehyd (Formvar) | Plano GmbH (Wetzlar, D) |
| Wasser | Wasseraufbereitung u. Destille (s. Kap. 2.1.1) |

2.1.4 Seren

| | |
|---|---------------------------------|
| Antiserum „Perseus“ vom 15.11.1988 | SCHMIDT 1989; s. Kap. 2.2.7 |
| Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V | Serva GmbH (Heidelberg, D) |
| Ziege-anti-Kaninchen IgG, konjugiert an Gold: | |
| \varnothing 15,0 \pm 0,87 nm; c = 18,5 μ g/ml | BBInternational (Cardiff, UK) |
| \varnothing 20,0 \pm 1,08 nm; c = 18,4 μ g/ml | BBInternational (Cardiff, UK) |
| Ziegenserum, normal; c = 83 mg/ml | DAKO Denmark A/S (Glostrup, DK) |

2.1.5 Verbrauchsmaterialien und sonstiges

| | |
|--|--|
| ACLAR-Folie, hart/dünn | Honeywell International Inc. (Morristown, NJ, USA) |
| Aquarienschlauch, grün, \varnothing 4/6 mm | JBL GmbH & Co. KG (Neuhofen, D) |
| Ausströmer 30 x 15 x 15 mm | Dohse Aquaristik KG (Grafschaft-Gelsdorf, D) |
| Blattgelatine, rot | Dr. August Oetker Nahrungsmittel KG (Bielefeld, D) |
| Diamantmesser, Schneide 45 °, 3 mm | Drukker/Element 6 (Cuijk, NL) |
| Dioden: | |
| Emitter LD 271(L) | Siemens AG (München, D) |
| Empfänger BP 103 BF | Siemens AG (München, D) |
| LED, Duo, \varnothing 5 mm, 565/625 nm | Kingbright Elec. Co., Ltd. (Taipei Hsien, RC) |
| Einbettungsgießformen Silikon- | |
| kautschuk, 12,5 x 4,5 x 3 mm | Plano (Wetzlar, D) |
| Filter, rund | Schleicher & Schuell (Dassel, D) |
| Film Macophot Orth25, unperforiert | Hans O. Mahn Co. (Hamburg, D) |
| Film-Entwickler: | |
| Ultrafin Plus | Tetenal Photowerk GmbH & Co.(Norderstedt, D) |
| Eukobrom | Tetenal Photowerk GmbH & Co.(Norderstedt, D) |
| Film-Fixierer Acidofix | Agfa-Gevaert AG (Leverkusen, D) |
| Fotopapier Grade 3/4 | Agfa-Gevaert AG (Leverkusen, D) |
| Garn M 303 | Gütermann SE (Gutach im Breisgau, D) |
| Gelatine-Kapseln, \varnothing 5/5,5 mm | Plano GmbH (Wetzlar, D) |
| Glasstreifen, 406 x 25 x 6 mm | Agar Scientific Ltd. (Stansted, UK) |
| Goldfischfutter Tetra AniMin | TETRA GmbH (Melle, D) |
| Handschuhe Nitra-Tex | Ansell Ltd. (Red Bank, NJ, USA) |
| Klebeband (Scotch pressure | |
| sensitive tape) | 3M (Maplewood, MN, USA) |
| Leuchtstoffröhren Solar Color, 30 W | JBL (Neuhofen/Pfalz, D) |
| Molekularsieb (Al-Silikat), 300 pm | Merck KGaA (Darmstadt, D) |
| Nickelnetzchen, Dünnsteg, 200 mesh | Agar Scientific Ltd. (Stansted, UK) |
| Objektträger | MAGV GmbH (Rabenau, D) |
| Präparierbesteck | MAGV GmbH (Rabenau, D) |
| Quarzkies, \varnothing 5-8 mm | REDSUN Garden Products B. V. (Heijen, NL) |
| Rasierklingen | ASR Industrial (Verona, VA, USA) |
| Schnappdeckelgläser | MAGV GmbH (Rabenau, D) |
| Sekundenkleber | UHU GmbH & Co. KG (Bühl (Baden), D) |
| Soffittenlampen 3 W/12 V, 38 x 10 mm | Osram GmbH (München, D) |
| Spritzen, 2ml | MAGV GmbH (Rabenau, D) |
| Spritzenfilter Rotilabo, Poren 220 nm | Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D) |
| Tierversuchsanträge Training u. Injektion | Az II 25.3 – 19c 20 – 15 (1) (bis 2003) |
| | Az 17a – 19c 20 – 15 (1) (ab 1997) |
| Zahnmodellierwachs, verstärkt | Associated Dental Products Ltd. (Purton, UK) |

2.2 Methoden

2.2.1 Der Goldfisch als Versuchstier

Als Versuchstiere dienten Goldfische *Carassius auratus auratus* (LINNÉ 1758) [BERG 1932; PELZ 1987] aus der Familie der Karpfenfische (Cyprinidae). Die Züchtung von zufällig orange-farbigen Wildformen („chi“) begann 1163 in einem Tümpel der chinesischen Stadt Hangchow [CHEN 1956]. Die Goldfische (7 ± 2 cm) wurden als Zuchtform „normal“ [HERRE 1990] von folgenden Zwischenhändlern bezogen:

- Tierfischzucht und Großhandel Matthias Huber (Cölbe-Schönstadt, D)
- NEMO Aquaristik (Langgöns, D)
- aqua natura Zoologischer Groß- & Einzelhandel (Leun, D)

Die Fa. in Coelbe-Schönstadt wurde ihrerseits über den Kurierdienst UPS mit Fischen beliefert; Fische der Fa. NEMO Aquaristik und aqua natura wurden in Großaquarien bzw. offenen Tonnen mit reichlicher Bepflanzung bis zum Verkauf gehalten. Die Fische der Fa. aqua natura wurden aus China und Israel importiert. Über Alter und Haltungsbedingungen bei den Züchtern ist nichts bekannt. Die Transferzeit der Goldfische ab Zwischenhändler wurde so kurz wie möglich kalkuliert. Die Fische wurden ohne das Transportwasser direkt in die vorbereiteten Aquarien überführt. Eine Besatzungsdichte von 2,5 g/l wurde nicht überschritten. Nach einem Tag zeigten die Goldfische normales Verhalten.

„Aquarienwasser“ ist wie folgt definiert:

- Leitungswasser (Zusammensetzung siehe N. N. 2005) + 0,01 mol/l NaCl
- pH-Wert: $7,54 \pm 0,11$ (SD; n = 5)
- Temperatur: 19 °C
- Volumen: 90 l
- Durchlauf des Aquarienwassers (Außenpumpen): 620 l/h
- Vorinkubation des Aquarienwassers vor Bestückung: 28 d

Die Fütterungsfrequenz betrug 5 d/Woche. 30 W-Leuchtstoffröhren wurden zusätzlich zum Tageslicht 12 h am Tag angeschaltet. Als Untergrund diente Quarzkies. Zusätzlich wurden einzelne Kunststoffröhren und/oder Schwimmpflanzen (*Microsorium pteropus*, *Anubias barteri nana*) ins Aquarium gesetzt. 50 % des Aquarienwassers wurde alle 14 d durch frisches Leitungswasser/NaCl ersetzt; die Pumpen wurden alle 28 d gereinigt. Unter diesen Bedingungen blieben die Fische gesund und lebhaft. Nach einer Eingewöhnungszeit von 35 d standen die Tiere für Versuche bereit.

2.2.2 Beschreibung der Wechselkammer (Shuttle-Box)

Die Wechselkammern wurden nach HORNER *et al.* [1961] entworfen. Die Abmessungen der Wechselkammern mit Steuereinheiten sind wie folgt (Außenmaße – Maße des Trainingsbeckens):

- 1 Prototyp aus Holz: 565 x 158 x 200 mm – 266 x 138 x 171 mm
- 1 Apparatur der ersten Generation
- 3 Nachbauten – Wechselkammern 1-3: 465 x 276 x 227 mm – 248 x 126 x 174 mm

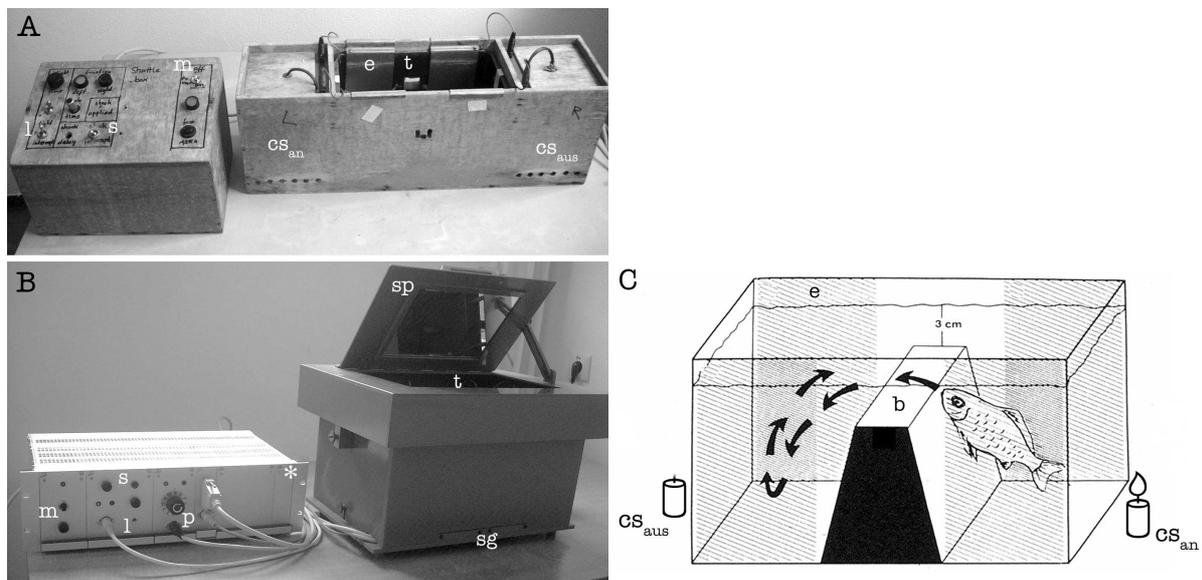


Abbildung 2.1: **A:** Prototyp; **B:** Nachbau; **C:** Verhaltensschema. Von den Steuergeräten (jeweils linkes Gerät in A und B) wird das Licht (l, cs) und der Stromreiz (s), regelbar über ein Potentiometer (p), über 4 Plattenelektroden (e; Fläche = 116 cm²) auf das mit Aquarienwasser gefüllte Trainingsbecken (t) übertragen. Nach dem Lichtsignal (l) als konditionierenden Stimulus (cs_{an}) soll der Fisch über eine Barriere (b) in den unbeleuchteten Bereich (cs_{aus}) des Beckens schwimmen (s. Kap. 2.2.3). m = Hauptschalter; sg = Signal zur Fischposition; sp = Spiegelaufbau; * = Nummer des Nachbaus.

Der Stromkreis für die Plattenelektroden aus rostfreiem Stahl ist in Abbildung 2.2 A dargestellt. Die Plattenelektroden des **Prototyps** werden über ein Steuerungssystem (Abb. 2.1 A) mit integriertem Transformator und Gleichrichter mit einer konstanten Rechteckwechselspannung (6 V_{SS} = von Signalspitze zu Signalspitze; 40 Hz) versorgt. Im Gegensatz zum Prototyp ist die konstante Rechteckwechselspannung (12 V_{SS}; 20 Hz) bei den **Nachbauten** über ein Potentiometer regelbar. Die Höhe des Signals (Abb. 2.2 B) lässt sich dadurch stufenlos regeln und steigt proportional an (Abb. 2.2 C). Das externe Netzteil ist mit einem Personal Computer über eine Steckkarte mit einem DOS-Steuerungsprogramm verbunden. Unterschiede im Spannungsverlauf bei den einzelnen Nachbauten untereinander sind vorhanden, aber vernachlässigbar (Daten nicht gezeigt). Für die Trainingsversuche wurden bis auf wenige Testversuche die drei Nachbauten, im Folgenden einfach „Wechselkammer“ genannt, verwendet. Als

Lichtsignal in den Wechselkammern dienen Soffittenlampen, die mit rotem Pergamentpapier (subtraktive Farbmischung: magenta und gelb wird absorbiert) abgedeckt wurden. Die Bewegung des Fisches über die Barriere wird durch zwei Infrarot-Dioden (Emitter und Empfänger) von der Steuereinheit registriert. Zur Spannungsmessung wurde ein Oszillograph verwendet; die Messung der Leitfähigkeit wurde mit einem Handmessgerät mit automatischer Temperaturkompensation durchgeführt.

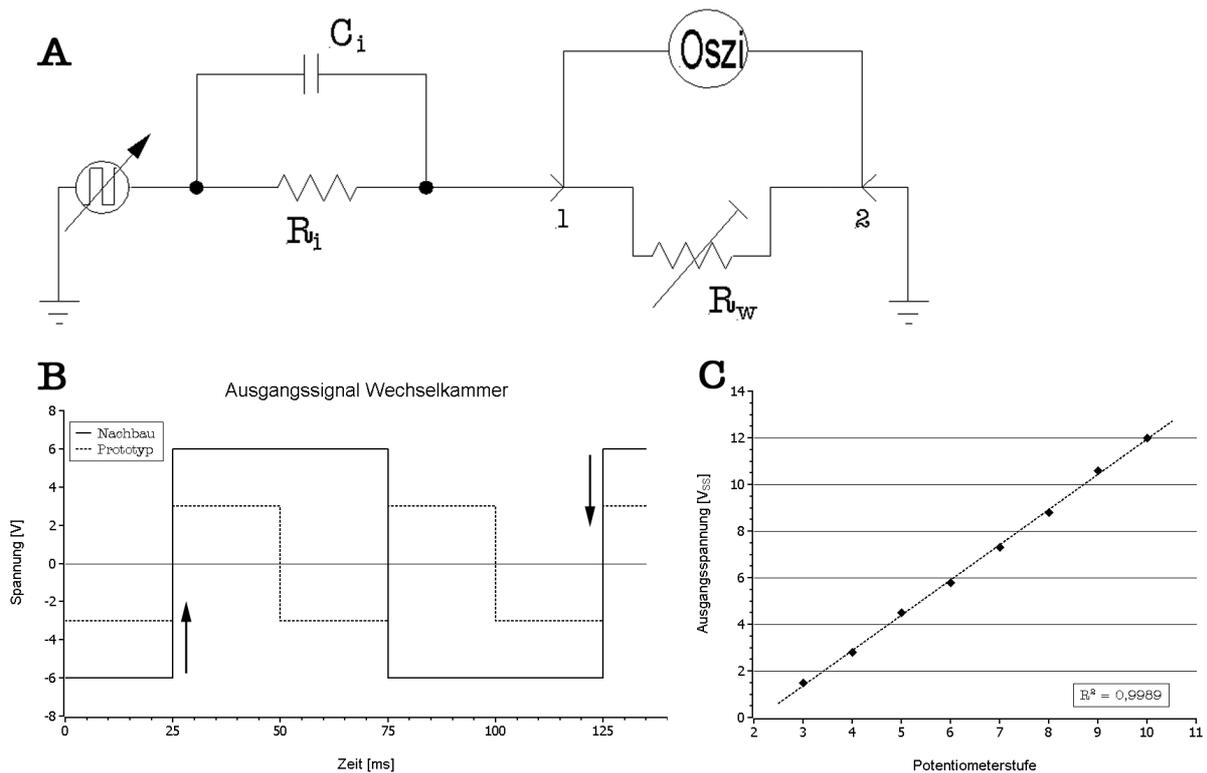


Abbildung 2.2: **A:** Stromkreis in Wechselkammer (Box 2+3) für jeweils eine Seite. C_i = Interne Kapazität des Kondensators; R_i = Innenwiderstand des Transformators. Der elektr. Widerstand des Aquarienvassers (R_w) ist variabel (s. Kap. 3.1.1). Oszillograph (Oszi) zum Messen der angelegten Spannung zwischen den Plattenelektroden. Stecker: 1 = rot; 2 = blau. **B:** Zeitlicher Spannungsverlauf des Rechtecksignals der Wechselkammern, reproduziert von der Anzeige des Oszillographen. Das einzelne Rechtecksignal des Prototyps hat die Dauer von 25 ms bei einer Höhe von 3 V bzw. bei den Nachbauten (Wechselkammer 1–3) 50 ms bei einer Höhe von 6 V. Das Folgesignal hat die gleiche Dauer, aber entgegengesetzte Polarität. Messung ohne Wasser; Pfeile deuten die Möglichkeit der Anpassung über ein Potentiometer an. **C:** Ausgangsspannung der Wechselkammern 1–3 bei unterschiedlichen Potentiometerstufen.

2.2.3 Dressuren - Trainingsversuche

Aktives aversives Meidetraining in der Wechselkammer (Shuttle-Box)

Kurzbeschreibung. Goldfische werden nach einer Eingewöhnungszeit in einem kleinen Aquarium trainiert, in dem sie lernen sollen, einen dargebotenen Schock zu meiden. Dazu werden schwache elektrische Impulse mit einem Lichtsignal gekoppelt, so dass nach dem Prinzip einer

klassischen Konditionierung schließlich das Lichtsignal alleine ausreicht, die Fische zu einer Reaktion zu bewegen. Wird im Laufe des Trainings ein bestimmtes Kriterium erreicht, werden die Fische in Gruppen klassifiziert.

Trainingsvorbereitung. Naive Goldfische wurden dem Haltungs-Aquarium entnommen und jeweils einzeln in ein Trainingsbecken überführt, das zuvor mit Aquarienwasser befüllt wurde. Dieses wurde in die Wechselkammer eingesetzt und mit Hilfe der Barriere in zwei Bereiche geteilt. Dreimal wurde der Fisch über die Barriere bewegt, bis er anschließend für die Dauer von 15 min ungestört sich selbst überlassen wurde. Innerhalb dieser Zeit erkundet ein gesunder Goldfisch seine neue Umgebung. Die Beleuchtungsstärke in der Wechselkammer ist unabhängig von der Raumbeleuchtung sowie des einfallenden Tageslichts und beträgt 4 cm von der Lichtquelle der Kammer entfernt ca. 500-600 lx.

Durchführung. Nach dieser Eingewöhnungszeit erfolgte die Konditionierung des Goldfisches mit Hilfe eines Computerprogramms: An jedem Zeitpunkt ist immer der eine Teilbereich des Trainingsbeckens **aktiv**, währenddessen der andere **inaktiv** ist. Es wird automatisch nach 60 s gewechselt. Insgesamt gibt es 40 dieser Zyklen, d. h. 20 aktive Zyklen im linken Teilbereich und 20 aktive Zyklen im rechten Teilbereich des Beckens. Der aktive Zyklus ist für die gesamte Dauer beleuchtet (Rotlicht = konditionierter Reiz, CS). Befindet sich dort der Fisch, so beginnt nach 21 s der unkonditionierter Reiz (US) und verbleibt bis zum Ende des Zyklus' in konstanter Höhe. Die daraufhin folgenden Reaktionen des Versuchstieres werden vom Programm unterschiedlich beantwortet: Schwimmt der Fisch nach Beginn des US in den unbeleuchteten Teilbereichs des Trainingsbeckens, so wird der Reiz vorzeitig beendet und das Verhalten als gültiger Fehler mit einem Wechsel aufgezeichnet (entspricht „Flucht“ vor dem Reiz). Schwimmt der Fisch dagegen vor Beginn des US in den inaktiven Teilbereich, so wird sein Verhalten als gültiges Vermeiden gewertet. Vermeidet ein Fisch innerhalb von 10 Zyklen 8 mal den Stromreiz, so beendet das Programm automatisch den laufenden Versuch, und der Fisch wird als „Lerner“ klassifiziert [PIRONT & SCHMIDT 1988]. Da ein Fisch nicht immer diese klassischen Reaktionen zeigt, wird in Tabelle 2.1 auf alle Möglichkeiten hingewiesen. Die Einstellungen der verwendeten Parameter des Programms zeigt Tabelle 2.2. Nach erfolgtem Training wurde ein Ausdruck generiert, der nach Zyklen gliedert die Verhaltensantworten auflistet. Während des Versuchs wurden die Fische beobachtet und ihr Verhalten auf Millimeterpapier aufgetragen (Abszisse: Zyklenanzahl; Ordinate: Lernerfolg). An dieser sog. **Lernkurve** lässt sich der Lernerfolg im Gegensatz zum Computerausdruck auf einem Blick erkennen.

Klassifizierung. Je nach den Verhaltensantworten während des vorausgegangenen Trainingsversuchs wurden die Goldfische in drei Klassen unterschieden: (1) Fische, die die Endbedingung innerhalb der 40 Zyklen verfehlten, wurden als „passive Nichtlerner“ klassifiziert. (2) Diejenigen, die die Endbedingung innerhalb von 11-40 Zyklen erfüllten, wurden als „Lerner“ behandelt. (3) Erreichten Fische die Endbedingung allerdings innerhalb der ersten 10 Zyklen, wurden diese als „aktive Nichtlerner“ klassifiziert. Da sie schon von Anfang an den Stromreiz mieden,

| Zyklusstatus | Der Fisch schwimmt | Wertung des Programms | Auftragung | Benennung |
|---------------|--|---|--|------------|
| aktiv | nach Beginn des US in inaktiven Teilbereich | gültiger Fehler, 1 Wechsel | neutral | Flucht |
| aktiv | vor Beginn des US in inaktiven Teilbereich | gültig, 1 Wechsel | positiv | Vermeiden |
| aktiv | nicht in inaktiven Bereich | gültiger Fehler, kein Wechsel | negativ | Erdulden |
| aktiv | in inaktiven Bereich und wieder zurück | gültiger Fehler, mehrere Wechsel | negativ | Ignorieren |
| aktiv/inaktiv | auf die Barriere und verbleibt dort | keine Wertung, wenn länger als 5 s | (wird als „Überqueren der Barriere“ gewertet) | |
| inaktiv | nicht in aktiven Bereich | ungültig, kein Fehler | neutral | Warten |
| inaktiv | in aktiven Bereich | gültiger Fehler, 1 Wechsel oder mehr | negativ | Ignorieren |

Tabelle 2.1: Verhaltensantworten des Versuchstieres in der Wechselkammer

| | |
|--------------------------------|---|
| Dauer eines Zyklus: | 60 s |
| Dauer des Lichtsignals: | 60 s |
| Beginn des Reizsignals (US): | 20 s |
| max. Verweilzeit in der Mitte: | 5 s (vgl. Tabelle 2.1) |
| Reizverzögerung: | 1 s |
| Toleranz für gültig/ungültig: | 1 s (Zyklusstatus wird nach 1 s Verzögerung festgelegt) |
| Anzahl der Zyklen: | 40 |
| Endbedingung: | 8 von 10 |

Tabelle 2.2: verwendete Programm-Parameter

haben sie keinen Lernerfolg aufzuweisen. Diese Fische wurden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Nach dem Training wurden die Versuchstiere zurück in die Haltungs-Aquarien überführt. Isolationshaltung wurde vermieden [LAUDIEN *et al.* 1986]. Ein Test nach PIRONT & SCHMIDT [1988], ob sich die einmalig konditionierten Fische das neu erlernte Verhalten erinnern können, wurde i. d. R. nicht durchgeführt; daher werden diese Fische wie folgt in Anführungszeichen („Lerner“) gesetzt.

Operante appetitive Belohnungsdressur

Neben der aktiven Vermeidungskonditionierung in der Wechselkammer wurden Fische darauf trainiert, auf bestimmte Farbreize gezielt eine Futterbox anzuschwimmen. Im Gegensatz zur aversiven Vermeidungskonditionierung ist der unkonditionierte Stimulus bei der operanten Belohnungsdressur ein appetitiver Reiz, das Futter. Der konditionierte Stimulus bleibt wie beim Training in der Wechselkammer ein visueller. Das Training erfolgte in zwei Etappen. Zunächst wurden die Goldfische darauf trainiert, Futter aus einem Schlauch zu fressen. Fische, die dies erlernten, wurden anschließend darauf trainiert das Futter an einer bestimmten, farblich markierten Futterstation abzuholen.

Für das **Vortraining** wurden jeweils 10 hungrige (1 Woche ohne Futter), naive Goldfische zusammen in ein Trainingsaquarium (500 x 405 x 300 mm) überführt und an zwei Futterstationen (Öffnung: 40 x 40 x 45 mm) über einen Schlauch mit einer roten Futterpaste (1 % (w/v) Tetra AniMin; 1,67 % (w/v) rote Blattgelatine) versorgt. Die rote Farbe hilft den Fischen im Vortraining die Futterpaste schneller wahrzunehmen und dient auch als *Shaping* für das eigentliche Training. Näherte sich ein Fisch zufällig der Futterstation, wurde ca. 1 cm der Futterpaste manuell aus dem Schlauch heraus gedrückt, so dass sie sichtbar an der Schlauchöffnung hervortrat. Das Vortraining zum Umlernen der Nahrungsaufnahme aus einem Schlauch dauerte jeweils 40 min und wurde 7 mal im Abstand von 2-3 Tagen wiederholt. Nach Abschluss des Vortrainings beherrschte die Hälfte der Fische das Fressen aus dem Schlauch. Diese Fische wurden weiterhin mindestens 5 mal im Abstand von 2-3 Tagen 10 min lang an den Futterstationen gefüttert.

Für die **Dressur** wurden bei jenen Fischen, die das Fressen aus dem Schlauch beherrschen, vier Futterstationen mit Lichtsignalen gekoppelt: Eine ungefärbte Futterpaste (1 % (w/v) Tetra AniMin; 1,67 % (w/v) weiße Blattgelatine) wurde jedoch nur an einer Futterstation zur Verfügung gestellt. Eine Trainingseinheit bestand aus 15 Zyklen von jeweils 3 Minuten Länge. Jede Futterstation wurde nun mit einer Duo-LED bestückt, die wahlweise grün oder rot leuchtete. In jedem Zyklus war jeweils eine Diode an den Stationen auf rot gestellt, während die anderen drei grün leuchteten. Der Wechsel erfolgte nach jedem Zyklus zufällig; allerdings erhielt immer eine andere Station das rote Licht. Nur die Fische wurden mit Futter belohnt, welche die Station mit der roten Diode anschwammen. Um eine **Lernkurve** zu erhalten, wurden jeweils die Versuche der Fische gezählt, an den jeweiligen Stationen Futter zu erhalten. Jedes Anschwimmen und Schnappen am Futterschlauch innerhalb eines Zyklus wurde als positiv gewertet, wenn die Diode der Futterstation rot leuchtete und negativ, wenn sie grün leuch-

| Vertikalneigung des Fisches | Horizontalneigung (um die Körperlängsachse) | Bewertung |
|--|--|-----------|
| Auftauchen bzw. mit dem Bauch an die Oberfläche | 180-120 ° | 0 % |
| Schwimmen 90-60 ° | 120-45 ° | 15 % |
| Schwimmen 60-45 ° | 10-45 ° | 30 % |
| Schwimmen konstant 45 ° | bis zu 10 ° | 50 % |
| Schwimmen konstant 45-30 ° | keine | 65 % |
| Schwimmen konstant 30-15 ° | keine | 85 % |
| Schwimmen konstant 15-0 ° | keine | 100 % |

Tabelle 2.3: Bewertungsschema vestibulo-motorisches Training

tete. Für eine **Klassifizierung** war jedoch nur der erstmalige Fressversuch relevant: Wenn beispielsweise ein Fisch innerhalb eines Zyklus 4 mal eine Futterstation anschwamm, zuerst eine grün beleuchtete, anschließend 3 mal die rote beleuchtet, wurde der Zyklus als „negativ“ gezählt [HOLTMANN 2002]. Als Lerner wurden solche Fische klassifiziert, die innerhalb von 6 Zyklen 5 mal die rot beleuchtete Futterstation als erste innerhalb eines Zyklus anschwammen.

Vestibulo-motorisches Training

Eine weitere Trainingsmethode, die es erlaubt, Goldfische je nach ihrem Verhalten in Gruppen einzuteilen, ist das so genannte vestibulo-motorische Training [SHASHOUA 1968]. Die Fische erhielten ein Blöckchen aus Polystyrol angenäht, welches ein normales Schwimmen zunächst verhinderte. Während des Trainings sollten die Fische lernen, trotz des durch das Polystyrol verursachten Auftriebes wieder normal zu schwimmen. Nach SHASHOUA & MOORE [1978] wurde folgende Formel für die Wahl der entsprechenden Polystyrol-Zylinder (\varnothing 10 mm) angewendet:

$$\text{Zylinder-Länge } x \text{ [mm]} = \text{Fischgewicht } x \text{ [g]}$$

Als Trainingsbecken diente ein Aquarium (600 x 300 x 300 mm) dessen Stirn- und Rückwand mit dunkler Folie abgeklebt wurde. Das Training erfolgte über einen Zeitraum von 4 Stunden in Gruppen zu jeweils 4 Fischen. Der jeweils passende Polystyrol-Zylinder wurde den Goldfischen ventral mit Garn etwa 2 mm kaudal der Brustflossenbasis angenäht [SCHMIDT 1987]. Das Schwimmverhalten der Fische wurde alle 30 min und zusätzlich nach 10 min dokumentiert, weil sie unmittelbar zum Versuchsbeginn unspezifisches Schwimmverhalten zeigen [SCHMIDT 1987]. Die Beobachtungsdauer je Fisch betrug 30 s. Je nach dem beobachteten Verhalten erhielten die Fische unterschiedliche prozentuale Bewertungen (Tabelle 2.3; in Anlehnung an SHASHOUA & MOORE 1978).

Zur Bewertung während des Beobachtungszeitraums wurde die jeweils höhere Neigung gewertet. Am Ende des Trainings wurden die Fische **klassifiziert**: Ausgehend vom zweiten Beob-

achtungszeitpunkt (nach 10 min) wurden als Lerner solche Goldfische bezeichnet, die während des Trainings eine Verbesserung von mindestens 50 % erzielten und ab diesen Zeitpunkt nicht mehr als einmal eine Bewertung von 30 % oder niedriger erhielten. Im Gegensatz dazu waren die Nichtlerner jene Fische, die bei einem Startlevel (nach 10 min) von höchstens 15 % nicht mehr als 15 % Verbesserung zeigten. Zu keinem Zeitpunkt war die Bewertung der Nichtlerner höher als 50 %. Übrige Fische wurden als aktive Nichtlerner (Startlevel mindestens 50 % und höchstens 15 % Verbesserung) bezeichnet bzw. nicht klassifiziert.

2.2.4 Präparation des Tectum opticum

Nach dem Training und der Klassifizierung des Fisches wurde dieser zu einem festgelegten Zeitpunkt ohne Einsatz von pharmakologischen Betäubungsmitteln in Eiswasser für die Dauer von 10 min betäubt. Durch den plötzlichen Temperaturwechsel sind die biochemischen Gehirnfunktionen verzögert. Die Präparation wurde in der Regel 3 Stunden nach dem Training der Fische in der Wechselkammer durchgeführt, wenn die Konzentration an neu synthetisiertem Ependymin nach der vestibulo-motorischer Dressur in der zytoplasmatischen Fraktion nahe dem Maximum ist und in der extrazellulären Fraktion erhöht vorkommt, aber das Maximum noch nicht erreicht wurde [SCHMIDT 1987]. Wurden andere Zeitpunkte zu Vergleichszwecken verwendet, so wird gesondert darauf hingewiesen.

Nach der Auskühlung des Goldfisches wurde der Kopf mit einer großen Schere in dorso-ventraler Schnittführung zügig vom Körper abgetrennt. Mit Hilfe einer kleineren Schere, die horizontal jeweils lateral rostralwärts geführt wird, wurde die Schädeldecke abgehoben. Das freigelegte Gehirn (Abb. 2.3) wurde von den Hirnnerven getrennt und das umliegende Gewebe entfernt. Das so präparierte Gehirn wurde zügig als Ganzes in die Fixierungslösung A überführt und für die Dauer von 30 min bei 1 °C vorfixiert, damit sich die Hirnhaut nicht artifiziell vom Neuropil ablöst und eine Diffusion von kleinen Molekülen vermieden wird [BULLOCK 1984].

Um das Tectum opticum des Gehirns in allen Schichten ultrastrukturell betrachten zu können, waren nach der Vorfixierung zwei getrennte Aufarbeitungsschritte notwendig: Für die Betrachtung der Hirnhaut und des äußeren Neuropils waren keine weiteren Schritte erforderlich; das Gehirn verblieb als Ganzes für weitere 5-6 Stunden bei 4 °C in der Fixierungslösung A. Sehr große Gehirne wurden allerdings in zwei Hemisphären geteilt. Eine Verlängerung der Inkubationsdauer in der Fixierungslösung zur besseren Durchdringung der Gewebe erbrachte schlechtere Resultate (Daten nicht gezeigt). Daher wurde für die Betrachtung des inneren Neuropils das Tectum opticum herauspräpariert und in Spalten mit einer Stärke von 0,5-1 mm geschnitten (Abb. 2.4 A, B). Diese wurden analog der ungeteilten Gehirne für die Dauer von 5-6 Stunden bei 4 °C auf einem Probenrotator weiter fixiert.

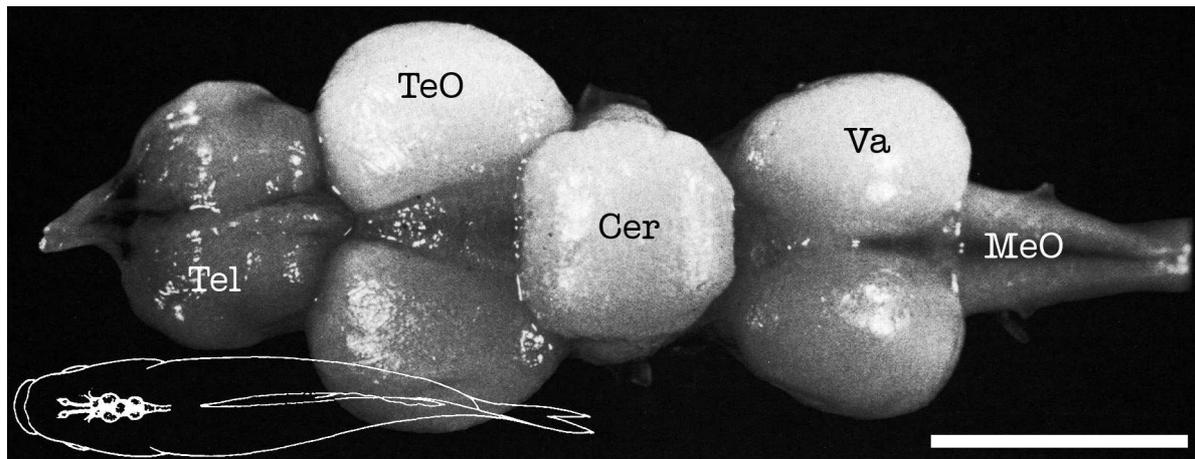


Abbildung 2.3: Gehirn eines großen Goldfisches, Silhouette und Aufsicht. Bulbus olfactorius im präparierten Gehirn fehlend. Abkürzungen: Cer = Kleinhirn; MeO = Verlängertes Mark; Tel = Vorderhirn; TeO = Tectum opticum; Va = Vagus-Kerne. Maßstab 3 mm. Abbildung übernommen und leicht überarbeitet aus MEEK [1983] bzw. RAYMOND & EASTER [1983].

Fixierlösung A:

| | |
|--------------|--|
| 100 mM | Natriumcacodylat; auf pH 7,2 mit HCl eingestellt |
| 2 mM | Magnesiumchlorid |
| 2 mM | EGTA |
| 0,02 mM | E-64 |
| 3 % (v/v) | para-Formaldehyd |
| 0,05 % (v/v) | Glutardialdehyd |

Zu Vorversuchen wurden ebenfalls folgende alternative Fixierungen unter den o. a. Bedingungen durchgeführt:

Fixierlösung B (10x GA):

| | |
|-------------|---|
| 100 mM | Natriumcacodylat; auf pH 7,2 mit HCl eingestellt |
| 2 mM | Magnesiumchlorid |
| 2 mM | EGTA |
| 0,02 mM | E-64 |
| 3 % (v/v) | para-Formaldehyd |
| 0,5 % (v/v) | Glutardialdehyd |

Fixierlösung C (ohne E-64):

| | |
|--------------|---|
| 100 mM | Natriumcacodylat; auf pH 7,2 mit HCl eingestellt |
| 2 mM | Magnesiumchlorid |
| 2 mM | EGTA |
| 3 % (v/v) | para-Formaldehyd |
| 0,05 % (v/v) | Glutardialdehyd |

| | | |
|--|--------------|---|
| Fixierungslösung D (ohne EGTA): | 100 mM | Natriumcacodylat; auf pH 7,2 mit HCl eingestellt |
| | 2 mM | Magnesiumchlorid |
| | 0,02 mM | E-64 |
| | 3 % (v/v) | para-Formaldehyd |
| | 0,05 % (v/v) | Glutardialdehyd |

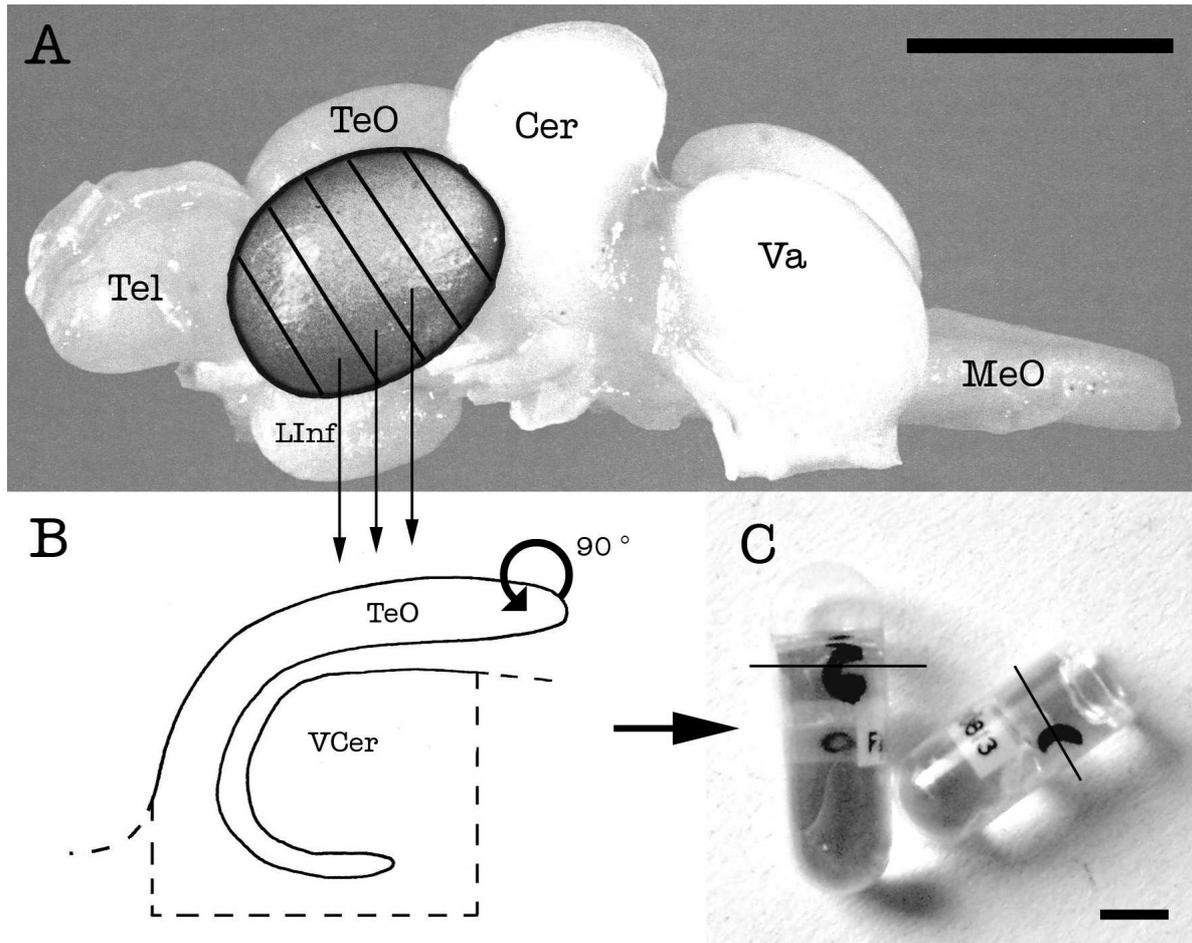


Abbildung 2.4: Schematische Übersicht zur Orientierung des Tectum opticum im Präparat. **A:** Gehirn (Seitenansicht), Tectum opticum hervorgehoben, Schnittführung angedeutet; **B:** Einzelnes Schnittsegment aus A, Querschnitt, „flach hingelegt“; **C:** In LR White eingebettetes Segment nach Drehung um 90° des Segments aus B, Schnittführung angedeutet. LInf = Lobus inferior; VCer = Valvula cerebelli; sonstige Abkürzungen wie in Abb. 2.3. Maßstab 5 mm. Abbildungen übernommen und überarbeitet aus RAYMOND & EASTER [1983]; HERRERO *et al.* [1998].

Funktionsweise der Lösungen. Lösungen aus Natriumcacodylat, einem Salz der Dimethylarsinsäure, werden gegenüber den üblichen Puffersystemen, die auf Phosphat-Verbindungen basieren, bevorzugt gewählt, wenn eine gute Löslichkeit von Kalzium- und Magnesiumionen aufrechterhalten werden soll. Dies wird durch die geringere Reaktivität des Arsens gegenüber dem Phosphor bedingt [BULLOCK 1984]. Die Zugabe von Magnesium erhöht die Erhaltung

von Membranen [STIRLING 1990]. EGTA dient als spezifischer Kalziumchelator [RAAFLAUB 1956], der im Gegensatz zu BAPTA sensitiv gegenüber pH-Sprüngen ist [TSIEN 1980]. E-64 deaktiviert spezifisch die Cystein-Proteinasen [BARRETT *et al.* 1982]. para-Formaldehyd [KARNOVSKY 1965] vernetzt über Formaldehyd-Einheiten das native Gewebe (Lysin-Reste) mit Methyl-Brücken. para-Formaldehyd wird gegenüber monomerem Formaldehyd bevorzugt, da das Formalin, die wässrige Lösung von Formaldehyd, durch längere Lagerung, zu Ameisensäure und Methanol disproportioniert (Cannizzaro-Reaktion) [KIERNAN 2000]. Auch Peroxysäuren oder unerwünschte Polymere [BULLOCK 1984] können entstehen. Besonders die Peroxysäuren zerstören durch ihre Reaktivität das Gewebe. Da der para-Formaldehyd den Formaldehyd erst dann freigibt, wenn er benötigt wird, werden diese unerwünschten Effekte ausgeschaltet. Glutaraldehyd, zuerst von SABATINI *et al.* 1963 eingeführt, vernetzt durch seine zwei Aldehydgruppen und seine flexiblen Methyl-Einheiten die Proteine wesentlich stärker als para-Formaldehyd [KIERNAN 2000]. Zu hohe Konzentrationen bewirken jedoch eine artifizielle Schrumpfung des Gewebes [BONE & DENTON 1971]. Der Grad der Vernetzung und Modifikation an den freien Aminosäurenresten ist temperatur- und pH-abhängig [MOLIN *et al.* 1978] und der Grad der Schrumpfung korreliert auch mit dem Puffermedium [LEE *et al.* 1982]. Bei Immunmarkierungen (s. Kap. 2.2.7) muss eine sehr niedrige Konzentration gewählt werden, damit die Antigenbindungsstellen durch die Quervernetzungen möglichst nicht maskiert werden [RIEDERER 1989].

2.2.5 Einbettung des Gehirngewebes

Nach der Fixierung der Gehirnhemisphäre bzw. der Segmente des Tectum opticum in Aldehydlösung wurden diese Proben für die Betrachtung am Transmissions-Elektronenmikroskop folgendermaßen vorbereitet:

Übersicht Probenbereitung. Quervernetzung → Kontrastierung → Entwässerung → 1. Einbettung → 1. Aushärten (→ Ausrichten → 2. Einbettung → 2. Aushärten)

Einfache Einbettung. Alle Arbeitsschritte wurden in Schnappdeckelgläsern auf dem Probenrotator bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt. Zunächst wurde die Fixierungslösung durch zweimaliges Waschen in 100 mM Natriumcacodylat (pH 7,2) ersetzt. Um die Zellstrukturen zu erhalten, erfolgte anschließend eine **Vernetzung** der Probe mit Hilfe einer 0,5 %igen bzw. 1 %igen (w/v) Osmiumtetroxid-Lösung in 100 mM Natriumcacodylat (pH 7,2) für die Dauer von 30 min. Nach erneutem Waschen in Natriumcacodylat (pH 7,2) und Wasser erfolgte die Inkubation in 2 %iger (w/v) Lösung von Uranylacetat. Nach folgendem Waschen in Wasser erfolgte die **Entwässerung** der Proben mit Hilfe von Ethanol: Stufenweise wurde die vorherige Ethanol-Lösung durch eine höher konzentrierte Lösung ersetzt, bis sich die Proben zweimal in reinem Ethanol befanden. Letztere wurde mit Hilfe von kugelförmigen Molekularsieben vom Restwasser befreit. Die jeweiligen Inkubationszeiten betragen zunächst 20 min, gegen Ende der Dehydrierung 30 min. Hierauf erfolgte die **Einbettung** im Harz LR White,

welches schrittweise das Ethanol ersetzte: Zunächst wurden die Proben in eine 25 %ige (v/v), dann in eine 50 %ige (v/v) Lösung von LR White in Ethanol für die Dauer von je 2 h überführt. Anschließend erfolgte die Inkubation für ca. 15 h in 75 %iger (v/v) LR White/Ethanol-Lösung und schließlich für mindestens 26 h in reinem LR White mit zweimaligem Lösungswechsel. Die Gehirnhemisphären wurden in mit LR White gefüllte, zuvor für die Dauer von 24 h getrocknete Gelatine-Kapseln überführt, entsprechend beschriftet und luftblasenfrei mit einer weiteren Kapsel verschlossen. Die Polymerisierung des Harzes erfolgte während der Dauer von 48 h bei 57 °C im Laborofen.

Doppelte Einbettung. Um eine Orientierung der Segmente des Tectum opticum auch nach dem Aushärten zu gewährleisten, war bei der Einbettung ein zusätzlicher Arbeitsschritt notwendig: Bei der doppelten Einbettung wurden die Segmente zunächst in den Vertiefungen flexibler Einbettungsgießformen mit LR White überschichtet, mit ACLAR-Folie luftdicht versiegelt und für die Dauer von 48 h bei 57 °C inkubiert. Anschließend wurde der nicht komplett ausgehärtete Block mit Ethanol (70 %) gereinigt und in solcher Weise geteilt, dass die einzelnen Segmente in kleinen Harzquadern vorlagen. Diese Segmentquader wurden an geeigneter Stelle plan geschliffen, mit Aceton gereinigt und an einem zuvor ausgehärteten und quer geteilten Harzblock so aufgeklebt, dass das Fragment des Tectum opticum wie ein geschriebenes Komma aufrecht positioniert im Harzkonstrukt liegt (Abb. 2.4 C). Nach dem kompletten Austrocknen des Klebers (ca. 24 h) wurden diese geklebten Probenblöcke erneut in Gelatine-Kapseln für 48 h eingebettet, so wie oben für die Gehirnhemisphären beschrieben. Nach Aushärtung des Harzes wurde der Probenblock noch 48 h ruhen gelassen, bevor davon Probenschnitte gemacht wurden.

Alternative Protokolle. Neben der o. a. Inkubationszeit in 2 %iger (w/v) Uranylacetat-Lösung wurden Gehirne (als Ganzes), die zuvor 18 h anstelle der üblichen 5-6 h in der Fixierungslösung inkubiert wurden, für die Dauer von 2 h in 4 %iger (w/v) Uranylacetat-Lösung inkubiert. Die Erhaltung des Gewebes dieser Proben war jedoch vergleichsweise weniger gut (Daten nicht gezeigt). Eine Ausweitung der Aldehydfixierung auf 20 h und die der Osmiumtetroxid-Vernetzung folgende Kontrastierung mit 0,5 %iger (w/v) Uranylacetat-Lösung für die Dauer von 70 h, ergab ein unspezifisch wirkendes Verteilungsmuster in der Ependymin-Markierung (Daten nicht gezeigt). Daher wurde eine Fixierung nach diesem Protokoll nicht mehr weiter durchgeführt.

Funktionsweise der Lösungen. Eine Quervernetzung des Gewebes bewirkt eine zusätzliche Stabilisierung zellulärer Strukturen, so dass ihre ursprüngliche Form während der Fixierung bestmöglich erhalten werden kann. Dazu werden im Allgemeinen Schwermetalllösungen verwendet, die Proteine sowie ungesättigte Fettsäuren durch Einlagerung an Kohlenstoffdoppelbindungen vernetzen und daher dauerhaft fixieren; eine Schrumpfung des Gewebes wird weitgehend vermieden. Bei elektronenmikroskopischen Arbeiten ist Osmiumtetroxid daher ein

Mittel der Wahl. Es stabilisiert vor allem Fette [BULLOCK 1984], aber denaturiert und vernetzt auch Proteine [NIELSON & GRIFFITH 1979]. Optisch ist diese Anlagerung durch eine Schwärzung der Proben zu erkennen. Uranylacetat wurde 1958 erstmals für die elektronenmikroskopische Anwendung beschrieben [KELLENBERGER *et al.* 1958] und bewirkt sowohl eine Erhöhung des Kontrastes als auch eine bessere Erhaltung von Membranen [TERZAKIS 1968]. Zur Entwässerung werden Lösungsmittel mit hoher Wasseraufnahmekapazität verwendet, die eine sehr gute Löslichkeit für wässrige Lösungen aufweisen. Wird dem zu untersuchenden Gewebe das Lösungsmittel in einer aufsteigenden Konzentration dargereicht, so wird diesem allmählich nahezu alles Wasser entzogen. In dieser Arbeit wurde als Lösungsmittel Ethanol verwendet, da das sonst ebenfalls gebräuchliche Aceton mit seinen Eigenschaften als Radikalfänger den Reaktionsstart des hier verwendeten Harzes verhindern würde [STIRLING 1990]. LR White, ein hydrophiles Gemisch von Acryl-Monomeren, hat eine niedrige Viskosität, so dass es das Gewebe schnell zu durchdringen vermag. Als Reaktionsstarter für das Harz genügt entweder eine Temperaturerhöhung oder der Einsatz eines speziellen Kaltbeschleunigers. Da die Polymerisation mit dem Kaltbeschleuniger eine exotherme Reaktion verursacht, würde die durch Osmiumtetroxid verursachte Schwärze des Gewebes, zu einem Hitzestau führen, der das Gewebe schädigt [NEWMAN 1987]. Da in dieser Arbeit Osmiumtetroxid verwendet wurde, musste auf den Einsatz eines Polymerisationsbeschleunigers verzichtet werden. Eine Temperatur von mindestens 50 °C lässt das Harz nach 24 Stunden zu einer schneidbaren Konsistenz aushärten. Zunächst noch weich, bewirken längere Inkubationszeiten eine weitere Härtung des Harzes. Da Sauerstoff als Radikalfänger eine Polymerisation verhindert [NEWMAN & HOBOT 1987], muss die Inkubation des Harzes ohne Sauerstoff erfolgen. Dazu verwendet man idealerweise Gelatine-Kapseln, weil diese im Gegensatz zu anderen, z. B. Kapseln aus Polyethylen, undurchlässig für Harz und Sauerstoff sind. Die hohe Hydrophilie von LR White im polymerisierten Zustand [NEWMAN 1987] und dessen Toleranz gegenüber Resten von hydrophilen Lösungsmitteln bewirkt eine gute Durchdringung von Lösungen in das eingebettete Gewebe sowie eine höhere Anzahl funktionell erhalten gebliebener Antigene [NEWMAN *et al.* 1983]. Des Weiteren wird durch die Hydrophilie eine Hintergrundmarkierung vermieden [NEWMAN & HOBOT 1987].

2.2.6 Schneiden der Probenblöcke

Aus dem zuvor fixierten Gehirngewebe wurden nun ausgewählte Bereiche geschnitten und auf Nickelnetzchen aufgefangen. Zunächst wurden die Gewebeblöcke durch Einweichen in Wasser (5 min) von der Gelatine-Kapsel befreit. Nach der Entfernung des überstehenden Harzes mit Hilfe einer Rasierklinge wurden an einem Ultramikrotom (Abb. 2.5) Gewebeschnitte von 500 nm angefertigt, die eine Übersicht über das Gewebe erlauben. Sie wurden zur besseren lichtmikroskopischen Darstellung mit 0,5 % (w/w) Toluidinblau O in 0,5 % Borax bei 50-60 °C für die Dauer von 7 min gefärbt. Der negativ geladene Farbstoff zeigt eine charakteristische Spektralverschiebung [D'ILARIO & MARTINELLI 2006], wenn er mit den vielen positiv geladenen Gruppen der Proteoglycane aus der Extrazellulären Matrix reagiert [SHEPARD &

MITCHELL 1976]. An Hand dieser Schnitte wurde der gewünschte Bereich für die elektronenmikroskopischen Betrachtungen ausgewählt. Diese wurden als Schnitte mit einer Stärke von 50-70 nm bei einer Schnittgeschwindigkeit von 1 mm/s angefertigt (Ultradünnschnitte; Abb. 2.5). Eine Stauchung der Ultradünnschnitte beim Schneiden wird verhindert, wenn diese als Trapez vorliegend mit der breiten Seite das Messer zuerst berühren, so dass die Reibungsenergie während des Schneidevorgangs kontinuierlich abnimmt. Als Messer zur Anfertigung der Schnitte dienten Glasstreifen, die mit Hilfe eines Messerbrechers in Form gebrochen wurden. Ein Klebeband, um das Glasmesser gewickelt und mit verstärktem Zahnmodellierwachs abgedichtet, schuf einen Trog mit einer reflektierenden Wasseroberfläche, die zum Auffangen der Schnitte geeignet war. Zusätzlich zu den beschriebenen Glasmessern wurde für die Ultradünnschnitte ein Diamantmesser verwendet. Durch die Oberflächenspannung des Wassers schwimmend, wurden die Schnitte von oben auf die beschichtete Seite eines Nickelnetzchens aufgefangen („Batsch-Verfahren“). Die Beschichtung der Netzchen auf der matten Seite zur Stabilisierung der Schnitte erfolgte mit einer Folie aus poly-Vinylformaldehyd in einer Stärke von ca. 20 nm, die aus 1,25 % Formvar/Chloroform hergestellt wurde [SCHAEFER & HARKER 1942]. Anschließend wurden die Netzchen getrocknet.

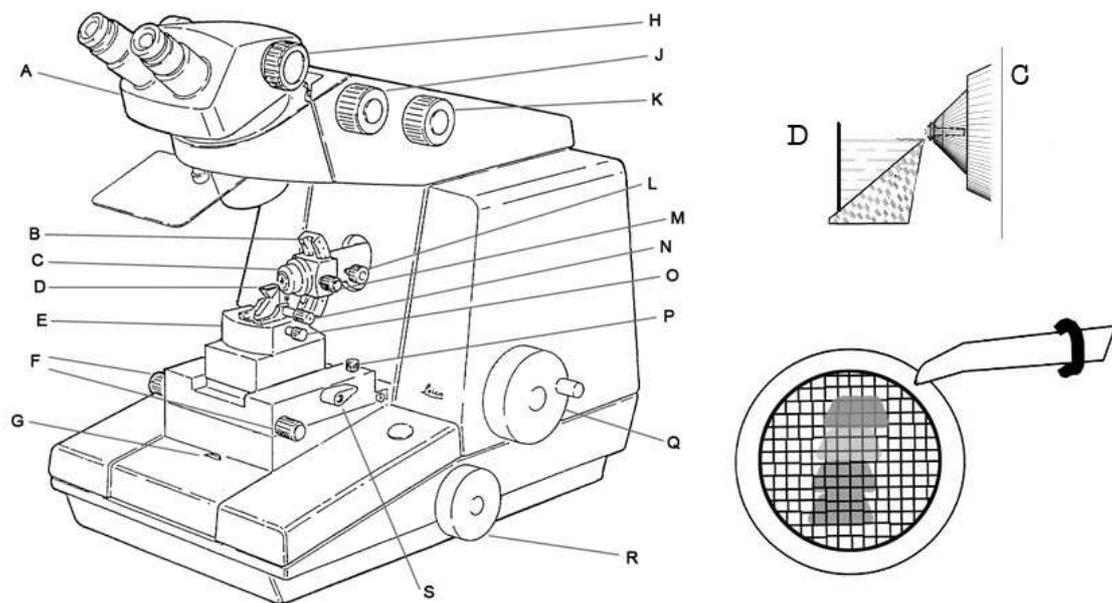


Abbildung 2.5: Aufbau des Ultramikrotoms (links), Schneidevorgang (rechts oben) und Auffangen der Schnitte (rechts unten). A: Stereomikroskop; B: Segmentbogen; C: Präparathalter; D: Messer; E: Messerblock; F: Mechanischer Tisch; G: Vorschubmarker; H: Vergrößerungswechsler; J: Fokussierknopf; K: Nord-Süd Bewegungsknöpfe; L: Präparatträgerarm; M: Drehknopf; N, O: Klemmschrauben; P: Vierkant-schlüssel; Q: Handrad; R: Reflexomat. Abbildung aus Gebrauchsanweisung „Leica Ultracut R-GA-D/E-9/97“; modifiziert und ergänzt.

2.2.7 Immunogoldmarkierung des Ependymins

Allgemeine Methodik einer Antikörperreaktion. Um ein bestimmtes Protein von zahlreichen anderen in einem Gewebe hervorzuheben, das heißt zu markieren, werden spezifische Antikörper verwendet, die sich gegen eine antigene Determinante (Epitop) des zu untersuchenden Proteins richten, indem das Gewebe mit einer Lösung dieser Antikörper benetzt wird [CUELLO *et al.* 1983]. Diese primären Antikörper werden u. a. aus dem Serum von Tieren gewonnen, denen zuvor entsprechende Antigene injiziert wurden [LEENAARS & HENDRIKSEN 2005]. In einem zweiten Schritt wird an die so gebundenen primären Antikörper ein weiterer (sekundärer) Antikörper gebunden, der sich gegen ein Epitop des ersten Antikörpers richtet. Dazu müssen die beiden Antikörper aus verschiedenen Tieren stammen. Der sekundäre Antikörper kann mit anwendungsbezogenen Markierungen, z. B. Fluoreszenzfarbstoffe oder – wie hier – Metallpartikel [FAULK & TAYLOR 1971], gekoppelt werden, so dass deren visuelle Darstellung letztendlich ein Stellvertreter für die Abbildung des gesuchten Proteins ist. Eine Signalverstärkung findet ebenfalls statt [WELLER & COONS 1954]. Viele dieser Antikörper sind frei käuflich, die Einsatzkonzentration muss jedoch an den jeweiligen Versuchsaufbau angepasst durch Vorversuche ermittelt werden [BENDAYAN & ZOLLINGER 1983]. Die optimale Markierung eines Proteins (Antigens) ist abhängig von der Affinität und der Konzentration des jeweiligen Antikörpers. Antikörper höherer Affinität binden mehr Antigene mit höherer Stabilität in kürzerer Zeit als Antikörper geringerer Affinität [LIPMAN *et al.* 2005]. Auch die Temperatur, bei der der Versuch stattfindet, hat Einfluss auf die Bindungsfähigkeit: Ein Antikörper benötigt zur Besetzung der Bindungsstellen umso länger, je niedriger die Temperatur ist. Im Hinblick dieser Fragestellungen wurde an Hand von Testreihen eine optimierte Konzentration der jeweiligen Antikörper ermittelt. Die Antigene des Gehirngewebes, das sich in Form ultradünner Schnitte auf den Nickelnetzchen befindet, wurden immunologisch nach dem *Post-embedding* Verfahren markiert, bei dem die Markierung der Antikörper im Gegensatz zum *Pre-embedding* nach der Einbettung erfolgt [STIRLING 1990].

Durchführung. Die Markierung des Ependymins im Tectum opticum wurde unter wasserdampfgesättigter Luft bei **Raumtemperatur** direkt auf dem auf Nickelnetzchen liegenden fixierten Gewebe durchgeführt. Durch Transfer der Netzchen auf Tropfen mit der jeweiligen Lösung erfolgte eine durchgängige Benetzung des Gewebes für die entsprechende Inkubationszeit. Vor allen Inkubationsschritten wurde die verbleibende Restlösung abgesaugt. Waschlösungen wurden als Tropfen jeweils 10- bis 20-mal auf das Netzchen transferiert und ohne Inkubationszeit direkt verworfen. Es wurden Vorkehrungen getroffen, die Kontamination mit Bakterien zu minimieren (Spritzenfilter, Nitril-Handschuhe). Zunächst wurden die Netzchen mit Wasser benetzt, anschließend wurden sie für die Dauer von 5 min in eine 3 %ige (w/v) Natriummetaperjodat-Lösung überführt. Nach Waschschritten mit Wasser, einer 200 mM Glycin-Lösung in PBS, sowie mit 10 mM PBS allein, wurden die Schnitte für 30 min in normalem Ziegen Serum (3 % (v/v) in 1 % (w/v) BSA/PBS) equilibriert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper („Perseus“ - s. u.; Verdünnung 1:1000 mit 1

%iger (w/v) BSA-Lösung/PBS) für die Dauer von 2 h. Diese Konzentration hat sich aus einer Reihe von Vorversuchen als optimal für die Aufgabenstellung in dieser Arbeit ergeben (s. Kap. 3.3). Nach gründlichem Waschen mit 1 %iger (w/v) BSA-Lösung in PBS wurden die Netzchen auf den Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen-IgG; Verdünnung 1:50 mit 1 %iger (w/v) BSA-Lösung/PBS) transferiert und für die Dauer von 1 h inkubiert. Durch hintereinander folgendes Waschen in 1 %iger BSA-Lösung/PBS, 10 mM PBS und Wasser wurden die Schnitte für die nachfolgende Kontrastierung vorbereitet.

| | | |
|--|--------|-----------------|
| | 10 mM | Natriumphosphat |
| Verwendeter PBS-Puffer (10 mM; pH 7,4): | 120 mM | Natriumchlorid |
| | 2,5 mM | Kaliumchlorid |

Funktionsweise der Lösungen und Kontrollen. Natriummetaperjodat [DYER 1956] ätzt im Rahmen des *Post-embeddings* die glatten Oberflächen der Schnitte, so dass die Antigene vom Harz freigestellt sind und dadurch für die Antikörper leichter zugänglich werden [BEN-DAYAN & ZOLLINGER 1983]. Rinderserumalbumin sowie das neutrale Ziegenserum werden dazu verwendet potentielle Proteinbindungsstellen zu besetzen; das Glycin blockiert die freien Aldehydgruppen. Alle tragen dazu bei, unspezifische Bindungen zu minimieren [STIRLING 1990]. Durch diese Absättigung der für den Antikörper potentiell möglichen, aber unspezifischen Bindungsstellen wird ein besserer Kontrast erzielt. Das Antiserum, das dem Kaninchen „Perseus“ am 15. Nov. 1988 entnommen wurde, nachdem es mehrmals mit unverzuckertem, denaturiertem Ependymin-Monomer injiziert worden war, dient als primärer Antikörper, der freundlicherweise von R. Schmidt zur Verfügung gestellt wurde.

Anmerkung. Wir sind bisher stillschweigend davon ausgegangen, dass der Sekundärantikörper aus der Ziege gegen Proteine des Kaninchens gerichtet ist - und zwar ausschließlich! Theoretisch ist es jedoch durchaus möglich, dass dieser Antikörper ebenfalls zum Beispiel Fisch-Proteine erkennen könnte. Wäre dies der Fall, so wäre eine spezifische Markierung des Ependymins auf den Schnitten nicht möglich. Um zu überprüfen, ob der Sekundärantikörper auch wirklich nur den Primärantikörper erkennt, wurden ebenfalls Kontrollversuche durchgeführt, die dem o. a. Versuchsprotokoll exakt entsprechen mit der Ausnahme, dass anstelle des primären Antikörpers 1 %ige (w/v) BSA-Lösung/PBS verwendet wurde. Die Bestimmung der optimalen Konzentration des Primärantikörpers (s. Kap. 3.3) bedeutet nicht automatisch, dass bei dieser Konzentration auch alle Antigenbindungsstellen auf dem Schnitt besetzt werden. Um zu überprüfen, ob der Primärantikörper im Überschuss zugegeben wurde, wurden als Kontrolle zwei Nickelnetzchen jeweils auf Tropfen mit einer Primärantikörper-Lösung (1:1000) überführt, auf denen bereits zuvor Nickelnetzchen für 2 h nach dem oben aufgeführten Protokoll inkubiert wurden. Die resultierende Markierung nach der Wiederverwendung der Primärantikörper-Lösung war nicht geringer (Daten nicht gezeigt).

2.2.8 Kontrastierung der Gewebeschnitte

Als Kontrastierung bezeichnet man im Bezug auf die Elektronenmikroskopie die Einlagerung von schweren Ionen in das Gewebe. Während die bei der Fixierung zugesetzten Schwermetall-Ionen (Osmium, Uran) primär dazu dienen, das Gewebe zu vernetzen (s. Kap. 2.2.5), sollen hier die Ionen von Uran [ERICKSON *et al.* 1987] und Blei eine größere Ablenkung der emittierten Elektronen aus der Glühkathode des Elektronenmikroskops bewirken. Dadurch, dass die Einlagerung unterschiedlich bei den verschiedenen Zellbestandteilen erfolgt, können letztendlich überhaupt Strukturen sichtbar werden. Die Kontrastwirkung ist ebenfalls abhängig vom pH-Wert [REYNOLDS 1963].

Die Kontrastierung des Gewebes auf den Nickelnetzchen erfolgte i. d. R. unmittelbar im Anschluss an die Immunogoldmarkierung, so dass ein vorheriges Benetzen mit Wasser entfiel. 4 %iges (w/v) Uranylacetat wurde zuvor kurz bei 3 *g* zentrifugiert, um eventuell ausgefallene Kristalle als Bodensatz zu verwerfen. Die Netzchen wurden mit dem Überstand im Dunkeln bei wasserdampfgesättigter Luft für die Dauer von 30 min kontrastiert. Nach dem Waschen der Netzchen mit Wasser wurden die Schnitte mit einer Bleicitrat-Lösung nach REYNOLDS [1963] bei normaler Luftfeuchtigkeit für die Dauer von 7 min benetzt. Zugegebene Plätzchen aus Kaliumhydroxid binden das Kohlendioxid der Luft, so dass ein Ausfallen von Bleicarbonat verhindert wurde. Nach gründlichem Waschen wurden die Netzchen in die Vorratsbox gelegt und standen für die Betrachtung und fotografische Auswertung am Elektronenmikroskop zur Verfügung.

2.2.9 Betrachtung des Tectum opticum

Nachdem die Schnitte auf den Nickelnetzchen kontrastiert worden waren, wurden sie unter einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) betrachtet. Das Gewebe bleibt unter einer Glühkathodenspannung von 120 kV stabil. Eine anfängliche Entspannung des Gewebes ist zu beobachten, wenn vorhandene Restfeuchtigkeit auf dem Netzchen ins Vakuum der Säule entweicht. Die Dicke der Schnitte hat einen Einfluss auf die elektronenmikroskopische Abbildung. Je dünner die Schnitte sind, desto kontrastärmer sind sie, dicke Schnitte hingegen erscheinen auf dem Leuchtschirm des Elektronenmikroskops sehr dunkel und die notwendigen hohen Beleuchtungsstärken können das Präparat irreversibel schädigen. Eine Schnittdicke der Präparate von 60 nm hat sich zur elektronenmikroskopischen Abbildung als ideal erwiesen.

Für Voruntersuchungen stand ein Philips EM 300 zur Verfügung, das mit einer Glühkathodenspannung von 80 kV betrieben wurde. Geeignete Ausschnitte wurden auf Film festgehalten (s. Kap. 2.2.10). Als weiteres Transmissionselektronenmikroskop stand ein LEO 912 AB Omega zur Verfügung, das über ein Omega Spektrometer verfügt und mit einer Glühkathodenspannung von 120 kV betrieben wurde. Aufnahmen von gewünschten Abbildungen wurden digital mit einer integrierten CCD-Kamera als Schwarz-Weiß-Bilder mit einer Grauwerttiefe von 16 bit im TIFF-Format gespeichert. Die Beleuchtungsstärke und die Belichtungszeit wurden zur Aufnahme optimiert, indem die Grauwerte im Histogramm möglichst weit aufgespreizt wurden.

2.2.10 Filmentwicklung

Das Transmissionselektronenmikroskop Philips EM 300 ist zur Dokumentation der Schnittpräparate mit einer integrierten, analogen 35mm-Kamera zur Aufnahme von vakuumgetrockneten Kleinbildfilmen bestückt. Als Kleinbildfilm fand ein niedrig empfindlicher orthochromatischer Dokumentenfilm mit hohem Auflösungsvermögen und Schärfe Verwendung. Die **Entwicklung** des Kleinbildfilms erfolgte in einer 25 %igen (v/v) Lösung von Ultrafin Plus für die Dauer von 4 min in einem Kipprhythmus von 3 s. Nach kurzem Waschen in 2 mM Essigsäure (pH 5) wurde der Film in einer 8,5 %igen (w/v) Lösung von Acidofix für die Dauer von 10 min in einem Kipprhythmus von 5-10 s fixiert. Anschließend wurden die Filme gründlich in Wasser gewaschen und über Nacht an der Luft getrocknet. Alle Bearbeitungsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Von dem so entwickelten Film („Negative“) wurden **Filmabzüge** („Positive“) mit Hilfe des Vergrößerungsgerätes mit Kondensorbeleuchtung auf Fotopapiere unterschiedlichen Formats übertragen. Die Entwicklung der Papiere erfolgte über Oberflächeninkubation jeweils folgender Lösungen: 10 % (v/v) Eukobrom für die Dauer von ca. 5 min, dann 2 mM Essigsäure (pH 5) für 30 s und schließlich 8,5 % (w/v) Acidofix für 10 min. Anschließend wurden die Lösungsreste durch 30-minütiges Waschen in Leitungswasser entfernt. Nach kurzem Abspülen mit Wasser und dem Trocknen waren die Bilder auf den Filmabzügen für das Betrachten und Auswerten bereit.

2.2.11 Bildbearbeitung und Auswertung der Daten

Das Software-Paket analySIS (Olympus GmbH, Hamburg, 2006) ist ein umfassendes Bildanalyseprogramm und wurde sowohl zur digitalen Bildaufnahme als auch zur Bildbearbeitung, nachfolgender Analyse und der Dokumentation von Ergebnissen herangezogen. Während die Fotopapier-Abzüge der analogen Kamera des EM 300 zur digitalen Weiterbearbeitung in analySIS erst mit Hilfe eines hochauflösenden Scanners digitalisiert werden mussten, wurde der überwiegende Teil der Bilder mit Hilfe von der im LEO 912 eingebauten CCD-Kamera erfasst und direkt im 16-bit TIFF-Format gespeichert.

Die Bedienoberfläche von analySIS ist dreigeteilt. Oben befindet sich die Kopfleiste mit ihrer Ansammlung von Menüpunkten und Schaltflächen in standardisiertem Windows-Format. Linker Hand befindet sich der sog. Bildmanager, der als eine Art Bildkatalog dient, aus dem die Bilder schnell auf das Bildfenster rechter Hand, das den größten Raum der Bedienoberfläche ausmacht, geladen werden kann. Die Menüleiste mit ihren Arbeitsbefehlen ist variabel: Das Software-Paket besteht aus mehreren Modulen, die je nach Arbeitsschwerpunkten jeweils separat käuflich erworben, aktiviert und umgeschrieben werden können. Die meisten Auswertungen wurden mit Hilfe von selbst geschriebenen Makros (s. Kap. 6) ausgeführt, die eine bestimmte Befehlsabfolge in einer Datei speichern. Zur Auswertung wurde diese Datei aufgerufen und das jeweilige Bild im Bildfenster nach den Vorgaben im Makro automatisch bearbeitet.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen an der Wechselkammer

Lernversuche mit Tieren können sowohl untereinander als auch zu denen anderer Forschungsarbeiten nur dann vergleichbar werden, wenn die Funktionsweise und Beschreibung der Trainingsapparatur hinreichend dargelegt wird. Aus diesem Grund wird eine Beschreibung der elektrischen Funktionsweise der hier verwendeten Wechselkammern dargestellt.

Messfehlerabschätzung. Zur besseren Beurteilung der nachstehenden Messergebnisse wurde die Ablesegenauigkeit der Anzeige am Oszillograph überprüft: In zehn aufeinander folgenden Messungen wurde das Potentiometer der Wechselkammer jeweils auf die Stellung „5.5“ gedreht. Die Messung der elektrischen Spannung erfolgte unter identischen Bedingungen in Aquarienwasser; die Werte wurden am Oszillograph mit entsprechender Verstärkerstufe abgelesen. Das Ergebnis ist: $2,915 \pm 0,053$ V (SD; $n = 10$). Mit dieser Standardabweichung wird der Ablesefehler bei allen Versuchen mit dem Oszillograph rund ± 4 % (Vertrauensbereich 95 %) betragen.

3.1.1 Messungen der elektrischen Spannung

Die elektrische Spannung zwischen den Plattenelektroden der Wechselkammer ist nicht nur über das Potentiometer regelbar, sondern auch über die Ionenkonzentration des Aquarienwassers. Es ist chemisch betrachtet eine verunreinigte 0,01 M Natriumchloridlösung, deren Konzentration durch den wiederkehrende Abfolge des Wasserwechsels (s. Kap. 2.2.1) bedingt über eine gewisse Streubreite schwankt. Der Spannungsverlauf in der Wechselkammer ändert sich demnach in Abhängigkeit der Ionenstärke (= Leitfähigkeit) des Wassers. Bei jeder Ionenstärke hat die Spannung bei jeder Potentiometerstufe einen unterschiedlichen Wert (Abb. 3.1). Die Leitfähigkeit ist im gemessenen Bereich proportional zur Natriumchlorid-Konzentration der Lösung.

Die Form des Ausgangssignals ist unveränderlich (vgl. Abb. 2.2 B). Tauchen die Plattenelektroden allerdings ins Wasser ein, ändert sich das Spannungssignal in Abhängigkeit der Ionenkonzentration (Abb. 3.2). In diesem geschlossenen Stromkreis werden die Ladungsträger abgeführt. Das Signal im Wasser verändert sich mit zunehmender Leitfähigkeit dergestalt, dass das Signal-Plateau zunächst immer steiler abfällt, dann exponentiell sinkt, bis ab ca. $800 \mu\text{S}/\text{cm}$ nur noch der Signal-Aufstrich in Form von Nadelpulsen bleibt. Durch die bau-

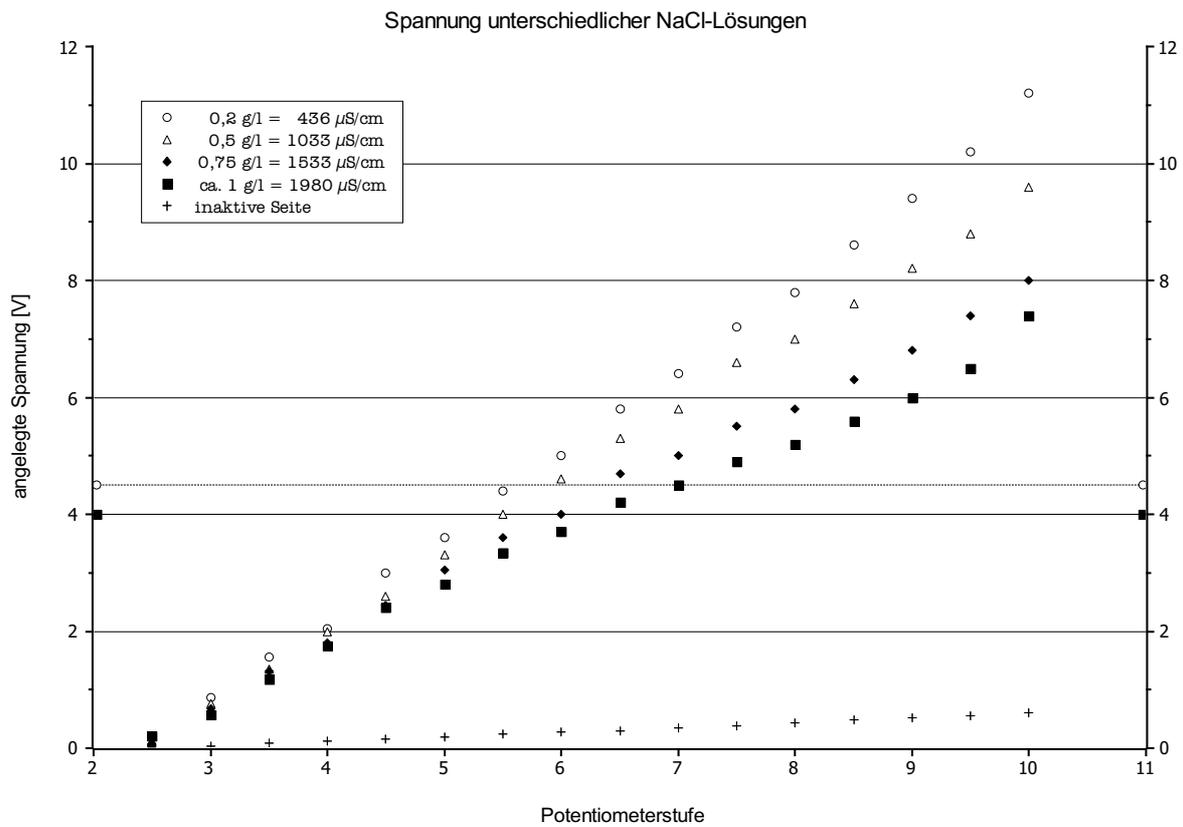


Abbildung 3.1: Angelegte Spannung zwischen zwei Plattenelektroden in der Wechselkammer, gefüllt mit Natriumchlorid-Lösungen unterschiedlicher Konzentration bei der jeweiligen Potentiometerstufe. Die beiden Symbole auf der Ordinate zeigen die gemessene Spannung (4,5 V bzw. 4 V) der entsprechenden NaCl-Lösung zwischen den Plattenelektroden des Prototyps. Die Spannung auf der inaktiven Seite der Wechselkammer hat auf das Training keinen Einfluss, da der Reiz unterbrochen wird, sobald der Fisch auf die inaktive Seite gewechselt ist.

bedingte Unterdrückung des Signals einer Polarität *halbiert sich die Frequenz des Signals im Aquarienwasser dadurch auf 10 Hz (Prototyp 20 Hz)*.

3.1.2 Berechnung des elektrischen Stroms

Im August 2005 wurde in der hiesigen Elektronik-Werkstatt die Wechselkammer 1 umgebaut, so dass an dieser Wechselkammer ebenfalls der elektrische Strom und elektrische Widerstände gemessen werden können (Abb 3.3). Im geschlossenen Stromkreis ist das Aquarienwasser, in das die Elektroden eintauchen, als Widerstand mit variablen Werten (entsprechend der Leitfähigkeit des Aquarienwassers) zu verstehen. Mit Hilfe der Leitfähigkeit, der gemessenen Spannung und den Abmessungen des Trainingsaquariums lässt sich sowohl der Widerstand als auch der Stromfluss näherungsweise berechnen. Bei den nachfolgenden Berechnungen wird vernachlässigt, dass der Stromfluss nicht ausschließlich den direkten Weg zwischen beiden Plattenelektroden nimmt. Ein gleichmäßiger Spannungsabfall zwischen den Elektroden wird

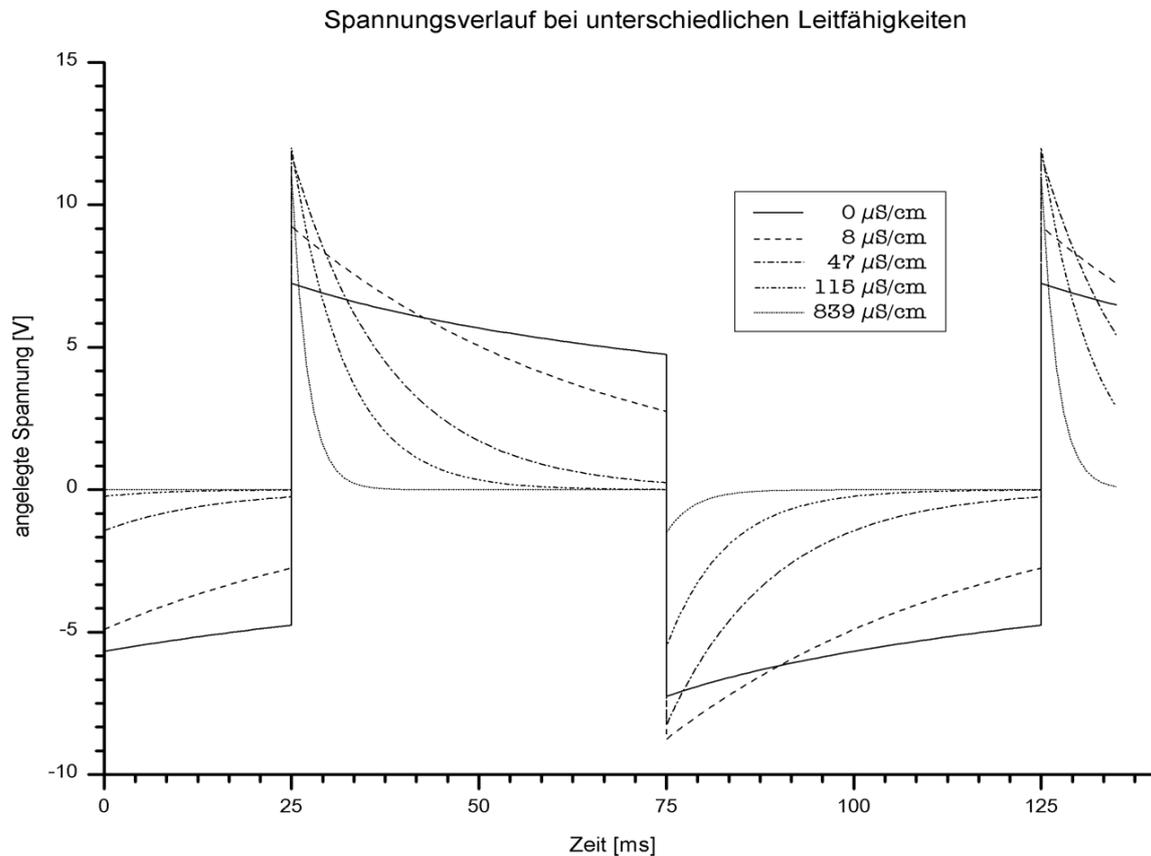


Abbildung 3.2: Änderung des Rechtecksignals der Wechselkammern 1–3 unter Einfluss verschiedener Leitfähigkeiten des Wassers bei maximaler Potentiometerstufe. Die angelegte Spannung wurde gemessen zwischen den Plattenelektroden, ohne Versuchstier. Durch die Unterdrückung des negativen Signals bei höheren Leitfähigkeiten wird die ursprüngliche Signalfrequenz der Ausgangsspannung halbiert. Zu beachten ist, dass bereits bei reinem Wasser ($0 \mu\text{S}/\text{cm}$) das Signal einen geringen Versatz aufweist. Kurvenverläufe reproduziert von der Anzeige des Oszillographen.

vorausgesetzt. Der Widerstand R des Aquarienwassers ist unabhängig von der Spannung bzw. der eingestellten Potentiometerstufe.

Formel:

$$R = \frac{d}{A * \kappa_i}$$

R : elektr. Widerstand [Ω] A : Elektrodenfläche [m^2]
 d : Abstand der Elektroden [m] κ_i : Leitfähigkeit [S/m]

3.1.3 Spektralanalyse der Infrarot-Dioden

Die Wechselkammer überträgt das Signal „Überquerung des Fisches“ über je zwei emittierende Dioden sowie deren Empfänger an die Steckkarte (Interface), welche das Signal an das

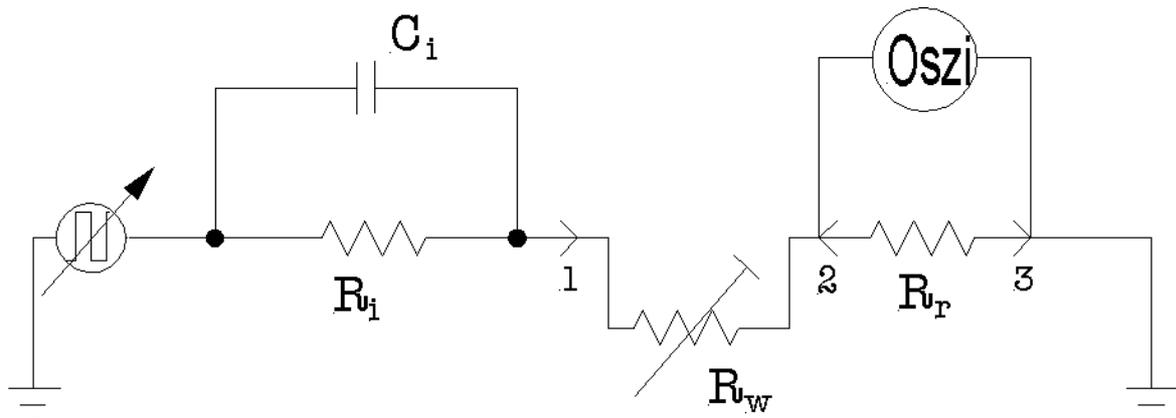


Abbildung 3.3: Stromkreis auf der rechten Seite der umgebauten Wechselkammer 1. Ein Widerstand ($R_r = 100 \Omega$) ist im Stromkreis in Reihe geschaltet. Oszillograph (Oszi) zum Messen des Stromflusses angeschlossen. Stecker: 1 = rot; 2 = gelb; 3 = blau. Der Stromkreis der linken Seite der Wechselkammer 1 ist identisch zu Wechselkammer 2 bzw. 3. Sonstige Angaben vgl. Abb. 2.2 A.

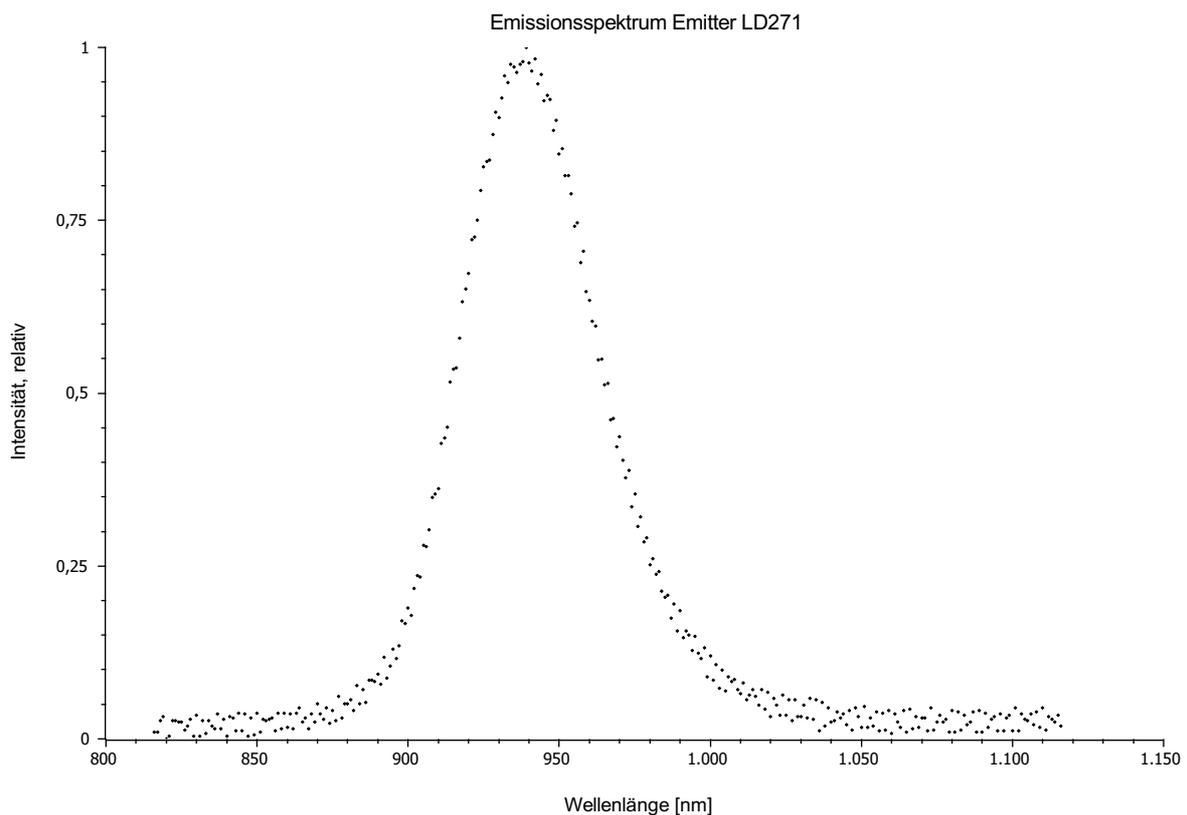


Abbildung 3.4: Emissionsspektrum der in den Wechselkammern eingebauten Emittor. Messung mit einem Spektrometer, untere Messgrenze $\lambda = 800 \text{ nm}$, obere Messgrenze $\lambda = 1100 \text{ nm}$, Auflösung $\lambda = 1 \text{ nm}$. Maximalintensität (0,2605) bei $\lambda = 939 \text{ nm}$ auf 1 gesetzt.

Trainingsprogramm übermittelt (Abb. 2.2). Da Goldfische noch Licht einer Wellenlänge mit deutlich über $\lambda = 700 \text{ nm}$ wahrnehmen können und dementsprechend mit einer optomoto-

rischen Folgereaktion antworten [persönliche Mitteilung C. Mora-Ferrer], wurde das Emissionsspektrum der Infrarot-Dioden ausgemessen. Wie in Abbildung 3.4 zu erkennen, steigt die Leuchtintensität erst ab $\lambda = 880$ nm rapide an und erreicht bei $\lambda = 950$ nm das Maximum. Nach C. Mora-Ferrer ist es sehr unwahrscheinlich, dass Goldfische die gemessenen geringen Intensitäten der Infrarot-Dioden bei $\lambda < 850$ nm wahrnehmen können.

3.2 Dressuren - Trainingsversuche

Die Goldfische wurden auf dreierlei Arten dressiert. Es waren dies (1) eine Konditionierung über einen Strafreiz, (2) eine operante Belohnungsdressur, sowie (3) ein Training, bei dem die Fische lernten, einen Reiz zu kompensieren, der das Schwimmverhalten beeinträchtigt. Der Schwerpunkt im Rahmen dieser Dissertation lag auf der erstgenannten Dressur.

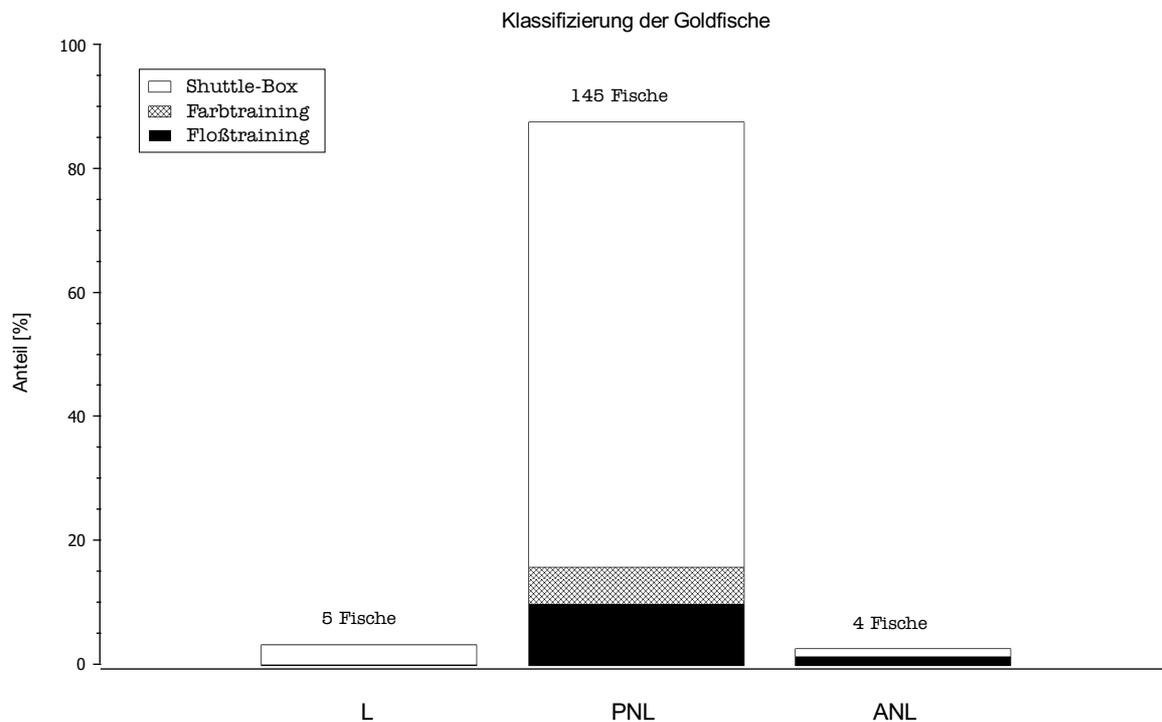


Abbildung 3.5: Gesamtergebnis der Trainingsversuche. Die Klassifizierung ergab insgesamt 3,0 % Lerner (L), 87,4 % passive Nichtlerner (PNL) und 2,4 % aktive Nichtlerner (ANL). 12 Fische (= 7,4 %) wurden im Rahmen des Floßtrainings nicht klassifiziert; $n = 166$.

3.2.1 Aktives aversives Meidetraining in der Wechselkammer (Shuttle-Box)

Von 166 Fischen wurden 126 in der Wechselkammer getestet. Davon erreichten 5 Fische das Kriterium "8 von 10 Zyklen vermieden", das sie laut Definition als Lerner von den Nichtlernern

unterscheidet. Es sind dies 4 % (Abb. 3.5). Dieses Ergebnis liegt unerwartet weit unter dem Literaturwert (48 % Lerner; PIRONT & SCHMIDT 1988). Es wurden folgende Testversuche bzw. Kontrollversuche durchgeführt, um die Gründe für dieses abweichende Ergebnis zu ermitteln:

- paarweise Eingewöhnung der Fische im Trainingsaquarium zwei Tage vor Versuchsbeginn.
- Verwendung von sauerstoffgesättigtem Aquarienwasser: 24 h vor Versuchsbeginn wurde das Aquarienwasser mit einem Ausströmerstein mit Frischluft versorgt.
- Erhöhung der Beleuchtungsstärke des Raums
- Vergrößerung der durchsichtigen Stirnseiten des Trainingsbeckens
- Einsatz verschiedenartiger Elektroden
- Verwendung alternativer Barrieren: (1) mit Durchgang am Grund, (2) durchsichtig, (3) mit flacher ansteigenden Seiten
- Training ohne Barriere
- Training mit konditionierten Reizen (Rotlicht) unterschiedlicher Art
- Training ohne konditionierten Reiz (Rotlicht)
- Training ohne unkonditionierten Reiz (Elektroden)
- Zusätzliche Voranpassung der Fische an die Versuchsbedingungen: Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde der Fisch 10 mal im Abstand von 60 s mit einem Käscher über die Barriere in jeweils den anderen Teilbereich des Trainingsbeckens geleitet.
- Allmähliche Steigerung der Spannung während des Versuchs: Beginnend bei ca. 1,5 V wurde nach jeder Verhaltensantwort „Erdulden“ (s. Kap. 2.2.3) das Potentiometer je um eine halbe Einheit erhöht, bis zu einer maximalen Spannung von ca. 6 V.

Keine dieser Maßnahmen half, den Anteil an Lernern zu erhöhen. Einige der getroffenen Änderungen im Versuchsablauf wirkten sich auf das Verhalten der Goldfische aus, aber hatten keinen Einfluss auf den Lernerfolg (s. Kap. 4.1.2).

Das Wechselkammer-Training des ersten Fisches, der das Lernkriterium erreichte, erfolgte am 28. Juli 2003. Ein Test für dieses Training erfolgte 4 Tage später. Der Lerner konnte sich jedoch nicht mehr erinnern (Abb. 3.6).

3.2.2 Operante appetitive Belohnungsdressur (Farbtraining)

Von den 22 Fischen, die zur operanten Belohnungsdressur darauf trainiert wurden, Futter aus einem Schlauch zu fressen, haben 11 Fische dieses Verhalten gelernt. Diejenigen Fische, die das Fressen aus dem Schlauch nicht beherrschten, wurden nicht weiter behandelt. Zwei erkrankte

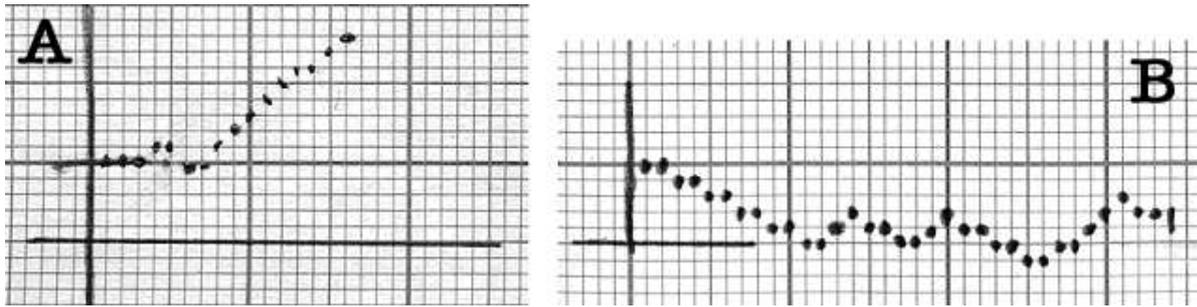


Abbildung 3.6: Einzelne Lernkurven eines trainierten Fisches. **A:** Im Training erreichte der Fisch nach 17 Zyklen das Lernkriterium. **B:** Im Test 4 Tage später wurde das Lernkriterium nicht erreicht. Jeder Punkt entspricht einer Verhaltensantwort während eines Zyklus' (s. Kap. 2.2.3). Ordinate: Lernerfolg; Abszisse: Zyklenzahl.

Fische wurden während des Vortrainings aussortiert. Von 10 in der operanten Belohnungsdressur getesteten Fischen hat keiner das Lernkriterium erreicht (s. Kap. 2.2.3). Dieses Ergebnis geht einher mit dem Lernerfolg der Goldfische in der Wechselkammer (Abb. 3.5).

3.2.3 Vestibulo-motorisches Training („Floßtraining“)

Im sog. Floßtraining müssen die Versuchstiere lernen, den zusätzlichen Auftrieb, hier experimentell durch ein Polystyrolblöckchen verursacht, zu überwinden, bis sie wieder ein normales Schwimmverhalten zeigen. Von den 30 Goldfischen, die trainiert wurden, erreichte kein Fisch die Lernbedingung (s. Kap. 2.2.3). 18 Fische wurden als Nichtlerner klassifiziert, wovon 2 Fische als aktive Nichtlerner aus dem Training hervorgingen. 12 Fische konnten aufgrund der Bedingungen nicht klassifiziert werden (Abb. 3.5). Abbildung 3.7 stellt beispielhaft die Verhaltenskurven zweier Fische (aktive und passive Nichtlerner) dar.

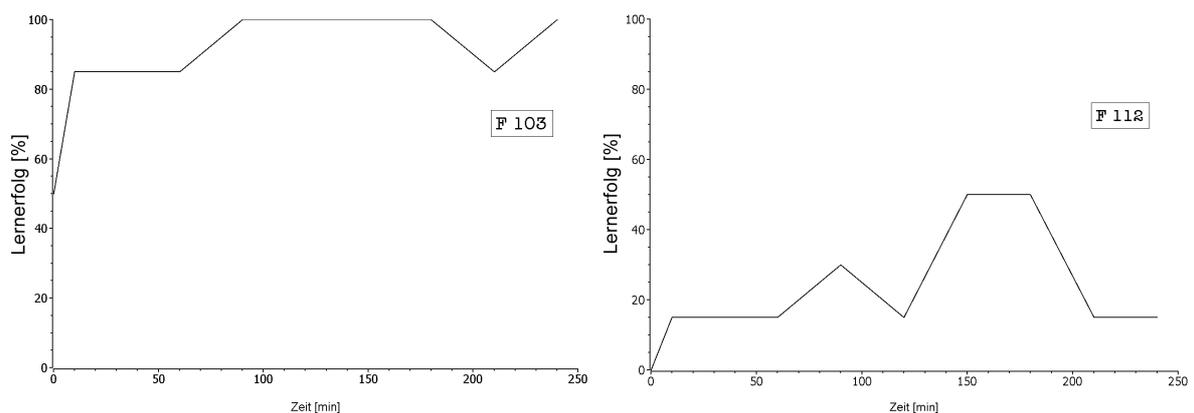


Abbildung 3.7: Exemplarische Lernkurven eines aktiven Nichtlerner (**A**, F 103) und eines passiven Nichtlerner (**B**, F 112). Der aktive Nichtlerner beherrschte das Training von Anfang an, der passive Nichtlerner hat es nicht erlernt.

| Verdünnung 1. AK [x] | Dauer [h] | Temperatur [°C] | Netzchen |
|----------------------|-----------|-----------------|----------|
| 50 | 2 | 20 | 18547 M1 |
| 50 | 2 | 20 | 18547 O1 |
| 50 | 22 | 4 | 18547 N3 |
| 50 | 22 | 4 | 18547 P4 |
| 50 | 70 | 4 | 18547 N1 |
| 50 | 70 | 4 | 18547 P1 |
| 200 | 2 | 20 | 18547 M4 |
| 200 | 2 | 20 | 18547 O4 |
| 200 | 22 | 4 | 18547 M2 |
| 200 | 22 | 4 | 18547 O2 |
| 200 | 70 | 4 | 18547 N5 |
| 200 | 70 | 4 | 18547 P5 |
| 1000 | 2 | 20 | 18547 N2 |
| 1000 | 2 | 20 | 18547 P3 |
| 1000 | 22 | 4 | 18547 M5 |
| 1000 | 22 | 4 | 18547 O5 |
| 1000 | 70 | 4 | 18547 M3 |
| 1000 | 70 | 4 | 18547 O3 |
| ∞ | 2 | 20 | 18547 N4 |
| ∞ | 2 | 20 | 18547 P2 |

Tabelle 3.1: Verwendete Kombinationen zur Ermittlung der optimalen Verdünnungsstufe des primären Antikörpers (AK) bei der Immunogoldmarkierung (s. Kap. 2.2.7). Der Zweitantikörper wurde in einer Verdünnung 1:20 eingesetzt. x = Verdünnungsfaktor; ∞ = ohne Erstantikörper.

3.3 Markierung des Antigens Ependymin

Wie bereits im methodischen Teil angesprochen (s. Kap. 2.2.7) muss die optimale Konzentration an Antikörpern erst durch Vorversuche ermittelt werden. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse aus diesen Vorversuchen dargestellt; die hierbei gefundenen optimalen Verdünnungsfaktoren beider Antikörper (**1:1000** bzw. **1:50**) wurde in allen nachfolgenden Markierungen verwendet.

3.3.1 Verdünnungsfaktoren der Antikörper

Primärantikörper. Im Rahmen einer Immunogoldfärbung wurden die fixierten Gewebeschnitte mit drei verschiedenen Konzentrationen des Erstantikörpers und drei verschiedenen Inkubationszeiten kombiniert. Als Doppelansatz durchgeführt, sind dies zusammen mit zwei negativen Kontrollen, die keinen Erstantikörper erhielten, insgesamt 20 Nickelnetzchen (Tabelle 3.1). Auf diesen sind je mehrere ultradünne Gewebeschnitte, die vom Tectum opticum einer fixierten Gehirnhälfte eines Fisches stammen, der die Endbedingung des Trainings in der Wechselkammer nicht erfüllte (s. Kap. 2.2.3).

Nach der in Gruppen eingeteilten unterschiedlichen Markierung der Schnitte auf den Nickelnetzchen mit an spezifischen Antikörpern gekoppelten Goldpartikel, wurde von jeder Schicht des Tectum opticum jeweils ein digitales Bild erstellt. Der Bildausschnitt innerhalb einer jeden Schicht des Neuropils und der Hirnhaut wurde **zufällig** gewählt ($\varnothing = 14,8 \mu\text{m}^2$). Um das Maß unspezifischer Bindungen abschätzen zu können, wurden zusätzlich Bilder außerhalb des Gewebes, also im Einbettmedium sowie auf der Trägerfolie aus poly-Vinylformaldehyd (Formvar), aufgenommen.

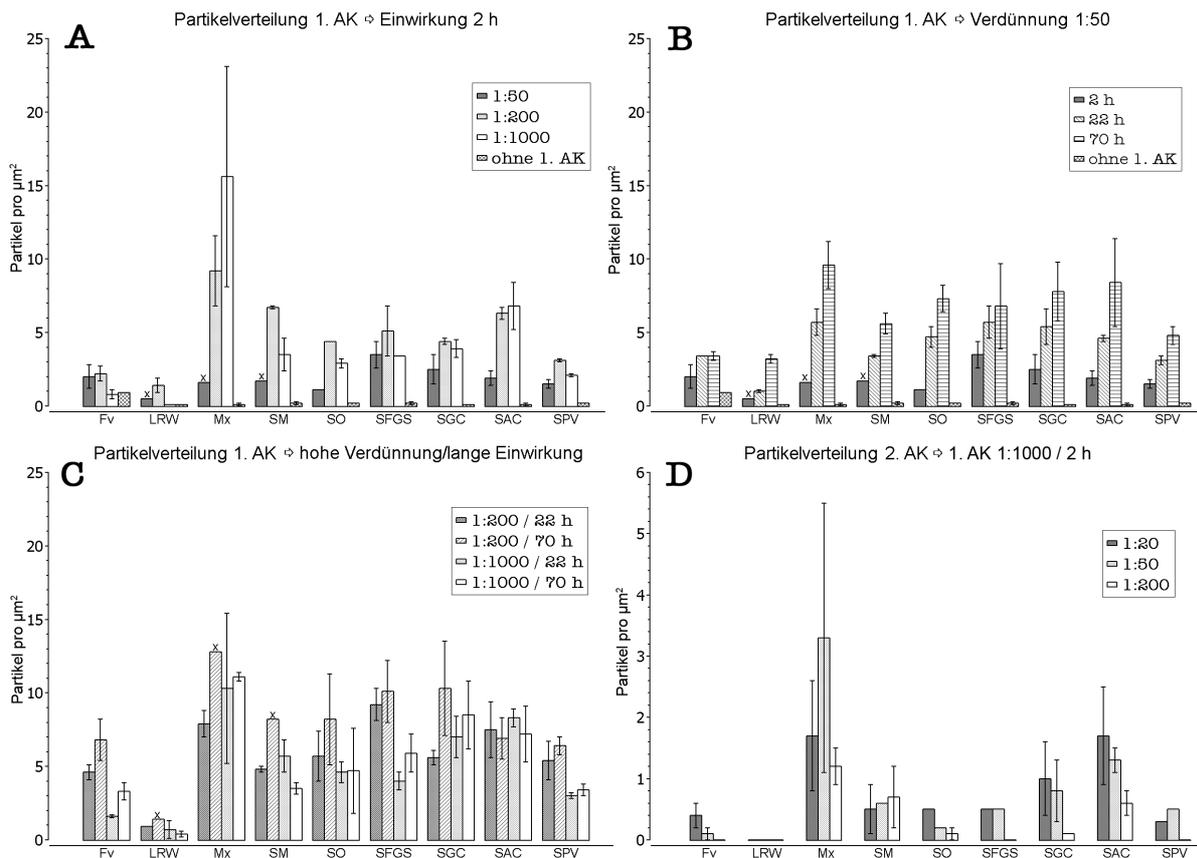


Abbildung 3.8: Verteilung der Goldpartikel in den Schichten des Tectum opticum nach Einwirkung des 1. Antikörpers (**A**) mit 2 h Einwirkungszeit, (**B**) in einer 50-fachen Verdünnung, (**C**) kombiniert mit hohen Verdünnungen und längeren Einwirkungszeiten. 2. Antikörper 1: 20. **D:** Verteilung der Goldpartikel nach Einwirkung des 2. Antikörpers (Gold 20 nm). Abszisse: Trägerfolie aus Formvar (Fv), Einbettmedium (LRW), Hirnhaut (Mx), Stratum marginale (SM), S. opticum (SO), S. fibrosum et griseum superficiale (SFGS), S. griseum centrale (SGC), S. album centrale (SAC), S. periventriculare (SPV). Zur Quantifizierung wurde das Makro V.Faerbungen.sfm (s. Kap. 6) verwendet. Raumtemperatur bei 2 h Inkubation des Erstantikörpers, sonst 4 °C; Balken in A–C = Spannweite bei $n = 2$, außer die mit x markierten Balken ($n = 1$); Balken in D = SEM bei $n = 4$.

Die Immunogoldpartikel sind nicht gleichmäßig auf den Nickelnetzchen verteilt. In der Hirnhaut konnten am meisten gezählt werden, bis über 15 Partikel pro μm^2 (Abb. 3.8 A); außerhalb des Gewebes, auf dem Einbettmedium, mit unter 4 Partikel pro μm^2 am wenigsten. Die unspezifischen Bindungen des Sekundärantikörpers (Abb. 3.8 A u. B, Kreuzschraffur) sind

unbedeutend. Die Markierung der verschiedenen Schichten des Neuropils, der Hirnhaut sowie auch die unspezifischen Bindungen außerhalb des Gewebes sind hier abhängig von der Einwirkzeit und der Konzentration des Primärantikörpers. Wie in Abbildung 3.8 A dargestellt, bewirkt eine höhere Verdünnung eine Erhöhung der Partikeldichte in den meisten Bereichen: Der Level der Markierung ist bei der höchsten Konzentration im ganzen Gehirngewebe niedrig und erreicht im Stratum fibrosum et griseum superficiale mit lediglich 4 Goldpartikel pro μm^2 das Maximum; somit ist die Markierungsdichte auf dem gleichen Niveau wie die der maximal gemessenen unspezifischen Bindungen im Einbettmedium (Abb. 3.8 B, 70 h). Eine Erhöhung der Einwirkungszeit bei konstant gehaltener Konzentration resultiert in einer gleichförmigen Signalverstärkung (Abb. 3.8 B). Im Allgemeinen verdoppelt sich die Anzahl der Markierungen bei jeder Zeitstufe in jeder ausgewerteten Region. Auch hier zeigt die Hirnhaut mit 10 Goldpartikel pro μm^2 (70 h) die höchste Markierungsdichte. Abbildung 3.8 C zeigt die Markierungsdichte an Goldpartikel bei hohen Verdünnungsstufen (1:200, 1:1000) bei gleichzeitig längerer Einwirkzeit (22 h bzw. 70 h). Das Markierungsniveau ist bei allen Schichten des Tectum opticum hoch; mit über 10 Goldpartikel pro μm^2 in der Hirnhaut am höchsten, gefolgt von Stratum griseum centrale und Stratum fibrosum et griseum superficiale.

In einem **zusätzlichen** Versuch wurden die Schnitte im Rahmen der Immunogoldmarkierung mit dem Primärantikörper in einer 50-fachen Verdünnung für die Dauer von 90 min bei 37 °C inkubiert. Die Markierung in erhöhter Temperatur erbrachte ein unspezifisches Verteilungsmuster (Daten nicht gezeigt).

Basierend auf den dargestellten Ergebnissen ist eine Verdünnungsstufe von 1:1000 zu empfehlen. Da die Auswahl hier zufällig erfolgte und bedingt durch die Heterogenität des Gehirngewebes die Fehlerabweichungen groß sind, erfolgte ein separater Versuch an klar definierten Strukturen (s. Kap. 3.3.2).

Sekundärantikörper. Entsprechend zu der Versuchsreihe des Primärantikörpers wurde der Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen IgG mit 20 nm Gold) zur Bestimmung der optimalen Einsatzkonzentration untersucht. Jeweils vier Nickelnetzchen wurden mit dem Sekundärantikörper inkubiert, der in einer Verdünnung von 1:20, 1:50 und 1:200 eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte auf den Netzchen stammen vom Tectum opticum fixierter Gehirnhälften zweier Fische, welche das Lernkriterium des Trainings in der Wechselkammer nicht erfüllten. Der Verdünnungsfaktor und die Einwirkungszeit des primären Antikörpers ist jeweils 1:1000 und beträgt zwei Stunden. Wie bei der Versuchsreihe mit dem Primärantikörper wurde von jeder Schicht des Tectum opticum, sowie vom Einbettmedium und der Trägerfolie jeweils ein digitales Bild erstellt. Der Bildausschnitt wurde ebenfalls **zufällig** gewählt ($\varnothing = 10,9 \mu\text{m}^2$).

Die verschiedenen Verdünnungen des sekundären Antikörpers resultieren in einer unterschiedlichen Markierungsdichte (Abb. 3.8 D). Im Allgemeinen sinkt die Markierungsdichte in den untersuchten Bereichen proportional zur eingesetzten Konzentration des Sekundärantikörpers. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Einsatzkonzentration von 1:200 zu gering ist, da die

Markierung in vielen Arealen ähnlich niedrig ist wie die der unspezifische Markierung (Abb. 3.8 D, Fv). Die zuvor verwendete Konzentration von 1:20 zeigt gute Markierungsergebnisse, allerdings sind die unspezifischen Bindungen hier ebenfalls hoch. Eindeutige Markierungen lassen sich daher nur in der Hirnhaut und dem Stratum album centrale aufzeigen. Einen Kompromiss aus den beiden angesprochenen Verdünnungen stellt die 50-fache Verdünnung dar: Bei einem vertretbaren Hintergrund sind eindeutige Markierungen in den meisten untersuchten Gewebebereichen dargestellt. Die Markierung in der Hirnhaut ist hier nicht niedriger als bei der höheren Konzentration von 1:20. Im Hinblick auf die gefundenen Ergebnisse wurde in dieser Arbeit daher der Sekundärantikörper zur Immunogoldmarkierung bevorzugt in einer 1:50-Verdünnung angesetzt.

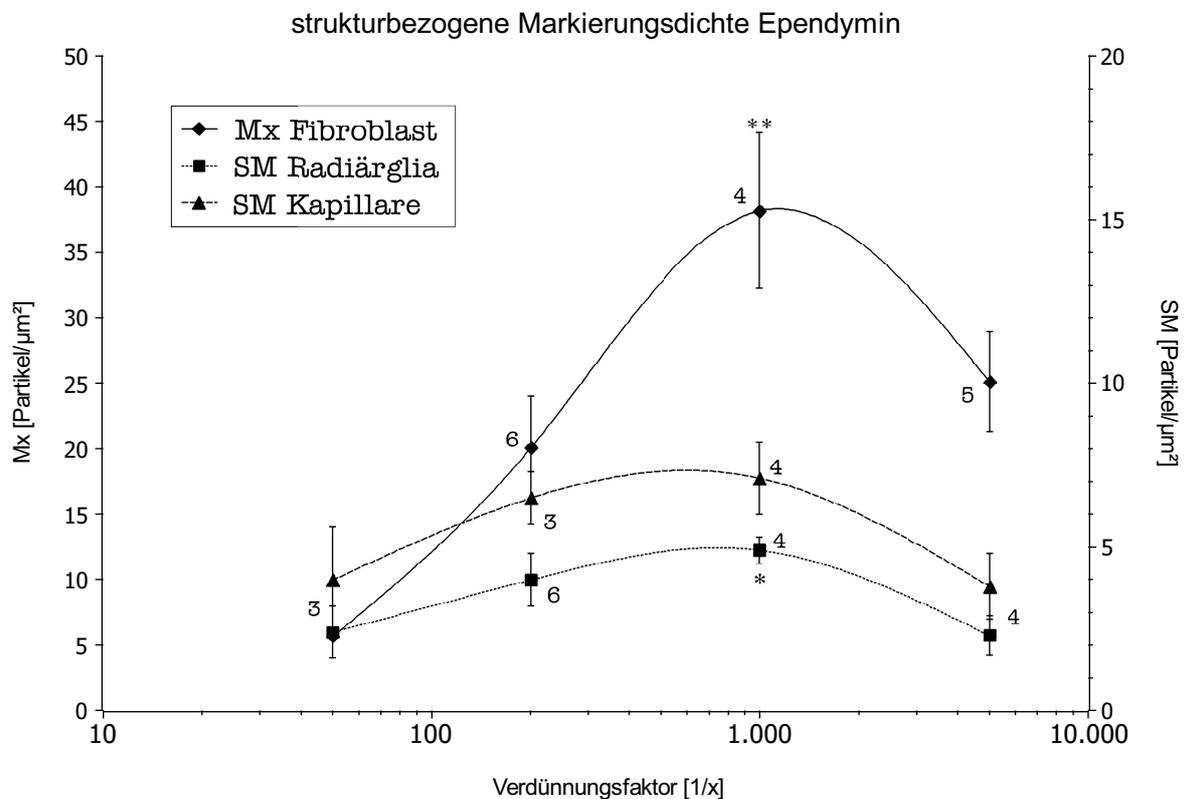


Abbildung 3.9: Anzahl der Goldpartikel an jeweils dem gleichen strukturellen Gebiet bei verschiedenen Verdünnungsfaktoren (1:50; 1:200; 1:1000; 1:5000) des Primärantikörpers bei jeweils 2 h Einwirkungsdauer. Zur Quantifizierung wurde das Makro Einfache Partikeldetektion1m A.sfm (s. Kapmakro) verwendet. Mx = Hirnhaut, SM = Stratum marginale; Zahlen an Datenpunkten: n Schnitte; Vergleich 1:50/1:1000: $p < 0,01$ (**) bzw. $p < 0,05$ (*) (Student's t-Test). Hintergrundmarkierung abhängig von der Konzentration (vgl. Abb. 3.8, LRW). Beachte verschiedene Ordinaten!

3.3.2 Bestimmung des Verdünnungsfaktors durch direkten Vergleich

Während die Auswahl zur Bestimmung des optimalen Verdünnungsfaktors des Primärantikörpers zunächst zufällig erfolgte (s. Kap. 3.3), wurde in einer zweiten Testserie die spezifische Bindung des **primären Antikörpers** an das Ependymin-Antigen über ausgewählte Strukturen untersucht. Dazu wurden in Schnittserien, auf die unterschiedliche Konzentrationen an Primärantikörper einwirkten, jeweils gleiche strukturelle Gebiete im Gehirngewebe quantitativ ausgewertet. In der Hirnhaut war dies (1) der Somabereich eines Fibroblasten, im Stratum marginale der Bereich (2) eines subpialen Endfußes der Radiärglia, sowie (3) einer Gefäßwand. Diese Bereiche wurden gewählt, weil die Markierung in diesen Strukturen i. d. R. immer stark ist.

Bei einer Verdünnung des primären Antikörpers von 1:1000 sind in jedem der untersuchten Bereiche Goldpartikel reichlich vorhanden (Abb. 3.9). Es zeigt sich eine Optimumskurve sowohl in den Somata der Fibroblasten der Hirnhaut, als auch in den subpialen Endfüßen der Radiärglia und im Bereich einer Gefäßwand im Stratum marginale. Eine Verdünnung von 1:1000 oder höher scheint für die hier angewendete Markierungsmethode geeignet. Dies ist im Einklang mit der Beobachtung, dass wiederverwertete Primärantikörper-Lösungen von 1:1000 keine geringere Markierungsdichte aufweisen (s. Kap. 2.2.7, Anmerkung). Des Weiteren kann angenommen werden, dass der Antikörper in allen Strukturbereichen das gleiche Antigen erkennt, sonst wäre in einem der untersuchten Bereiche eine andere Verteilung wahrscheinlich gewesen.

3.4 Vergleich der Fixierumlösungen

Es wurden vier verschiedene Lösungen zur Fixierung der Gehirne hergestellt (s. Kap. 2.2.4). Alle alternativen Fixierumlösungen zeigten im elektronenmikroskopischen Bild keine Veränderungen in der Erhaltung des Gewebes. Da eine Erhöhung an Glutardialdehyd bei Protokoll B mit einer Beeinträchtigung der Antigene einhergeht, ist es sinnvoll, die Gewebeschnitte auf die Bindung des Primärantikörpers an das Antigen Ependymin hin zu überprüfen (s. Kap. 2.2.7). Die Immunogoldmarkierung in den unterschiedlichen Schichten des Tectum opticum zeigte bei Fixierumlösung B keine merklichen Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Ohne den Protease-Inhibitor E-64 bei Protokoll C wirkt die Ependymin-Markierung in einigen Neuropilschichten dagegen schwächer als mit E-64 (Daten nicht gezeigt). Lässt man hingegen das EGTA wie in der Fixierumlösung D weg, so findet sich eine signifikant ($p < 0,01$; Student's t-Test) höhere Immunogoldmarkierung in den vakuolösen Bereichen der Fibroblasten in der Hirnhaut (s. Kap. 3.5.8). Der Vergleich zwischen den subpialen Endfüßen der Radiärglia (s. Kap. 3.5.7) bei Schnitten deren Fixierumlösungen kein EGTA zu denen, die 2 mM EGTA enthielten, erbrachte dagegen keine signifikanten Unterschiede (Tab. 3.2).

Falls nicht anders angegeben, wurde stets Fixierumlösung A verwendet.

| Struktur | 2 mM EGTA | 0 mM EGTA | p |
|--------------|-------------------------|---------------------------|--------|
| Fibroblasten | 42,6 ± 17,7 (SD; n = 5) | 128,2 ± 29,2 (SD; n = 6) | < 0.01 |
| Radiärglia | 61,0 ± 50,8 (SD; n = 6) | 237,7 ± 189,4 (SD; n = 3) | > 0.05 |

Tabelle 3.2: Vergleich der Fixierungslösung A (2 mM EGTA) und D (0 mM EGTA; s. Kap. 2.2.4) am Beispiel der vakuolösen Bereiche der Fibroblasten und an den subpialen Endfüßen der Radiärglia. Auswertung über Makro „Einfache Partikeldetektion1m A.sfm“ (s. Kap. 6). SD = SEM.

Anmerkung. Eigene Versuche haben gezeigt, dass sowohl durch eine doppelte Markierung, bei der die Immunogoldmarkierung (s. Kap. 2.2.7) zweimal hintereinander durchgeführt wurde (vgl. Abb. 3.28 B/C und Abb. 3.35), als auch durch längeres Ätzen mit 3 %igem (w/v) Natriummetaperjodat die Markierungsdichte erhöht werden konnte (vgl. Abb. 3.19). Letztere Methode ist jedoch nicht zu empfehlen, da Feinstrukturen verloren gehen können.

3.5 Ultrastrukturelle Ependymin-Verteilung im Tectum opticum

Das Ziel dieser Dissertation ist nach einer verhaltensrelevanten Dressur die Verteilung des Glykoproteins Ependymin im Tectum Opticum an Goldfischen nachzuweisen. Dazu wurden die Gehirne nach dem *Post-embedding*-Verfahren aufbereitet und Ultradünnschnitte des Gewebes im Transmissionselektronenmikroskop systematisch betrachtet. Das Tectum opticum wird vom tektalen Ventrikel durch das Nervengewebe bis hin zur Hirnhaut in laminare, konzentrische Schichten unterteilt (Abb. 3.10):

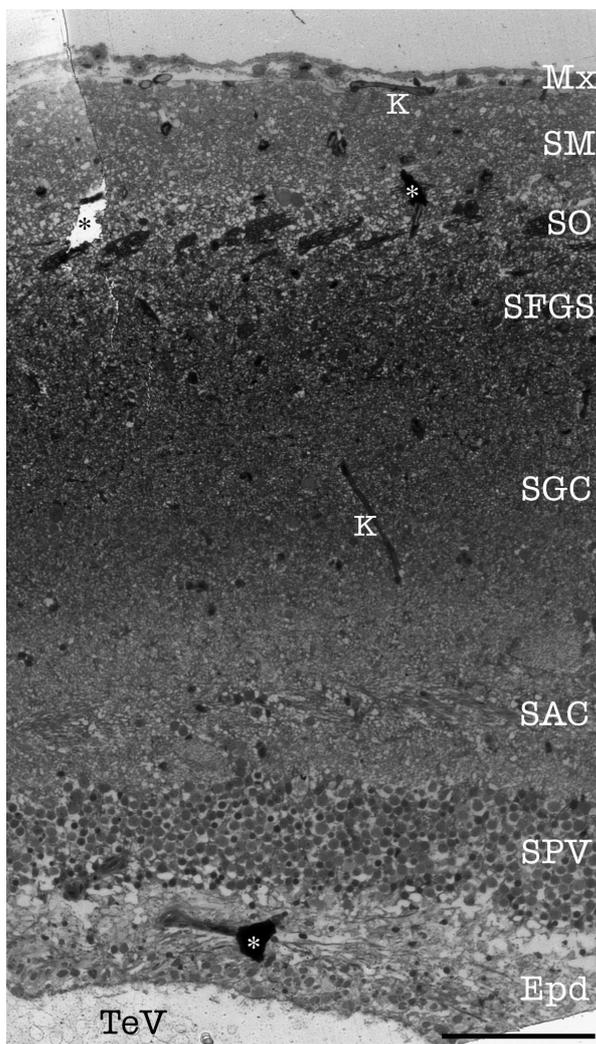


Abbildung 3.10: Tectum opticum im Querschnitt (vgl. Abb.2.4 B):

Mx = Hirnhaut,

SM = Stratum marginale,

SO = Stratum opticum,

SFGS = Stratum fibrosum et griseum superficiale,

SGC = Stratum griseum centrale,

SAC = Stratum album centrale,

SPV = Stratum periventriculare,

Epd = ependymale Zone,

TeV = tektaler Ventrikel.

K = Blutgefäß, * = Artefakte. Gefärbt mit Toluidinblau O (s. Kap. 2.2.6); Messbalken 100 μm .

Zwischen dem Stratum periventriculare und dem tektalen Ventrikel liegt die **ependymale Zone**, die in der klassischen Unterteilung des Gehirngewebes in Schichten nicht berücksichtigt wird. Auch die **Hirnhaut**, die dem Stratum marginale aufliegt, zählt aufgrund fehlender Nervenzellen wie die o. a. ependymale Zone nicht zum Nervengewebe im eigentlichen Sinne. Im Rahmen dieser Arbeit werden diese Schichten in die Nomenklatur von VANEGAS *et al.* [1974] integriert und vergleichend betrachtet. Das Stratum griseum centrale wurde hier als eine Schicht angesprochen, da sowohl eine morphologische als auch funktionelle Unterscheidung

in zwei Unterschichten in dieser Arbeit nicht eindeutig getroffen werden konnte. Die **Neurone** werden hier sowohl nach den vergleichend-morphologischen Bezeichnungen von VANEGAS *et al.* [1974], als auch nach der numerisch-ordnenden römischen Ziffern von MEEK & SCHELLART [1978] benannt. Die Bezeichnung der synaptischen Terminalien erfolgt nach ITO *et al.* [1980].

In allen Abbildungstexten wird „Messbalken“ als „MB“ abgekürzt.

3.5.1 Ependymale Zone

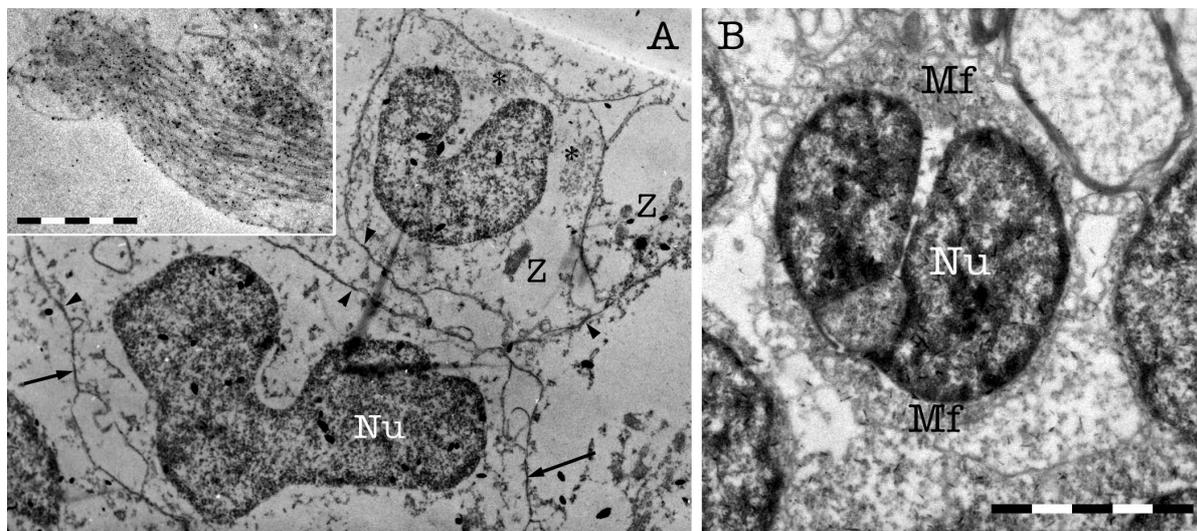


Abbildung 3.11: **A:** Ependymgliazellen (Fixierungsprotokoll B); *Inset:* Fortsatz einer Ependymgliazelle mit Ependymin-Markierung (schwarze Punkte). **B:** Soma einer Radiärgliazelle. Mf = Mikrofibrillen, Nu = Zellkern, Z = Zilien, * = Fibrillenbündel, Pfeile/-köpfe = Beispiele von *Gap junctions* bzw. Desmosomen; rombenförmige Kristalle sind Artefakte; MB 2 μm .

Die ependymale Schicht besteht aus zwei glialen Zellarten: **Ependymgliazellen** (Abb. 3.11 A) liegen vorwiegend am tektalen Ventrikel an und bilden eine mehrschichtige Zellpopulation. Die Zellen haben als Ausläufer starke Fortsätze und Zilien, die in den Ventrikelraum hineinreichen (Abb. 3.11 A, *Inset*). Ihr voluminöses Soma enthält einen asymmetrischen Zellkern mit tiefen zytoplasmatischen Invaginationen sowie dunkel erscheinende Mitochondrien. Bündel mit Mikrofibrillen sind häufig anzutreffen. Die Zellen sind untereinander mit *Gap junctions* und Desmosomen verbunden. Die Ependymgliazellen zeigen i. d. R. eine starke Immunmarkierung, teils auch in zytoplasmatischen Vakuolen (Abb. 3.12).

Als zweite Zellpopulation markiert die zu den Astrozyten gehörende **Radiärglia** (Glia limitans) einen ein- bis zweischichtigen Zellverband die Grenze zum Stratum periventriculare (Abb.

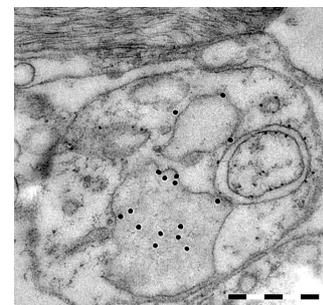


Abbildung 3.12: Ependymgliazelle. Ependymin-Markierung in Vakuolen. MB: 0,5 μm .

3.11 B). Sie bilden mächtige apikale Fortsätze aus, die das gesamte Nervengewebe in radiärer Orientierung bis zum Stratum marginale durchqueren (Abb. 3.13) und es dort mit ihren sog. subpialen Endfüßen gegen die Hirnhaut abgrenzen (s. Kap. 3.5.7). Radiärgliazellen haben einen dunklen, runden Zellkern mit tiefen zytoplasmatischen Invaginationen, der von einem dünnen, Organellen-armen Zytoplasmasaum umgeben ist. Im mikroskopischen Bild erscheinen die Fortsätze dunkel, buschig und dick; die Mitochondrien haben eine dunkle Granula und lassen sich dadurch von neuronalen Strukturen unterscheiden. Im Gegensatz zu den subpialen Endfüßen (s. Kap. 3.5.7) und den apikalen Fortsätzen (Abb. 3.13) weisen die Somata der Radiärgliazellen kaum Immunmarkierung auf.

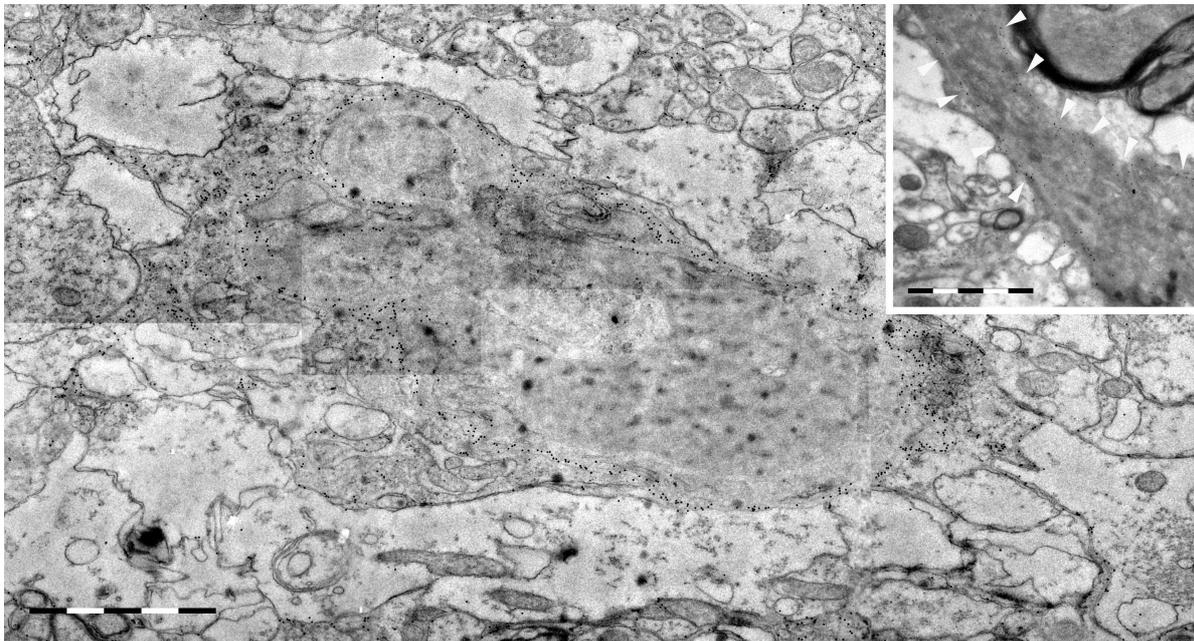


Abbildung 3.13: Dunkler Fortsatz einer Radiärgliazelle auf Höhe des Stratum fibrosum et griseum superficiale (s. Kap. 3.5.5) und des Stratum opticum (*Inset*; s. Kap. 3.5.6). Die Ependymin-Markierung (schwarze Punkte, Pfeilköpfe) am Rand der Fortsätze ist zahlreich. Bei den hellen begrenzenden Zellen handelt es sich wahrscheinlich um Astroglia-Zellen. MB 2 μm .

3.5.2 Stratum periventriculare (SPV)

Die erste Schicht des Nervengewebes wird von einer Zellart dominiert: Die **periventriculären Neurone** (Typ XIV und Typ XV) bilden eine dicht gepackte, mehrschichtige Zellpopulation. Die Zellkörper der Typ-XIV-Neuronen haben einen Durchmesser von 5-10 μm (Abb. 3.14, *Inset*). Ihr runder Zellkern ist nur von einem dünnen Zytoplasmasaum umgeben, das hell erscheinende Mitochondrien enthält. Die Zellen haben einen dünnen, glatten Apikaldendrit, der sich in radiärer Orientierung bis zum Stratum opticum erstreckt und sich dort verzweigt. Das Axon der Typ XIV-Neurone entspringt in Höhe des Stratum griseum centrale und endet im Stratum album centrale. Die Zellkörper sind durch zahlreiche *gap junctions* miteinander verbunden. Synapsen wurden nicht beobachtet. Im elektronenmikroskopischen Bild sind ver-

schiedene Arten periventrikulärer Neurone zu sehen, deren Zytoplasmen (Abb. 3.14 A) und Zellkerne (Abb. 3.14 B) unterschiedliche Graustufen aufweisen. Die Zellkerne haben offenbar auch verschiedene Größen (Abb. 3.14, *Inset*). Durch die fehlenden Invaginationen der Zellkerne lassen sich die periventrikulären Neurone von den Radiärgliazellen unterscheiden. Die Zellkörper der ersteren haben kaum eine Immunogoldmarkierung.

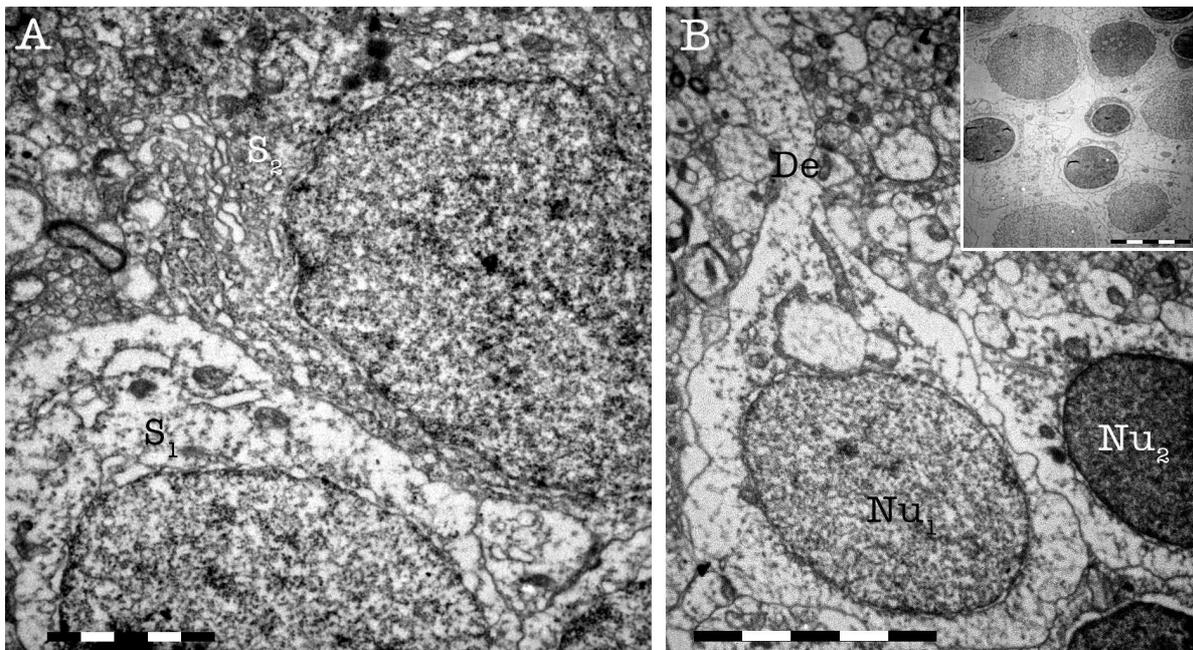


Abbildung 3.14: Periventrikuläre Neurone im SPV; Ependymin-Markierung nicht gefunden. **A:** Zwei unterschiedliche Neurone, deren Somata (S_1 u. S_2) jeweils eine andere Elektronendichte haben; MB 2 μm . **B:** Periventrikuläres Neuron (Nu_1) mit Apikaldendrit (De); rechts Nuklei anderer periventrikulärer Neurone (Nu_2). *Inset:* Die Neurone der einen Population sind kleiner und erscheinen dunkler als die der anderen Population; MB 5 μm .

3.5.3 Stratum album centrale (SAC)

In der zweiten Schicht des Nervengewebes finden sich viele myelinisierte Axone, zwei Typen von Neuronen sowie weitere Fortsätze (Abb. 3.15 A). Vor allem sind die Bündel **myelinisierter Axone** auffällig (Abb. 3.15 B). Als weitere Elemente durchqueren die (dunklen) Fortsätze der Radiärglia und die Apikaldendriten der periventrikulären Neurone das SPV (vgl. Abb. 3.16 A). Nicht selten sind hier auch Faserbündel zu finden (Abb. 3.16 B), die efferente, unmyelinisierte Axone sein können. Eine Immunogoldmarkierung beschränkt sich auf die extrazellulären Bereiche, vorwiegend zwischen dem Myelin (Abb. 3.15 B). Große multipolare Neurone (Typ XIII) konnten in dieser Arbeit nicht von den großen piriformen Neurone unterschieden werden (Daten nicht gezeigt).

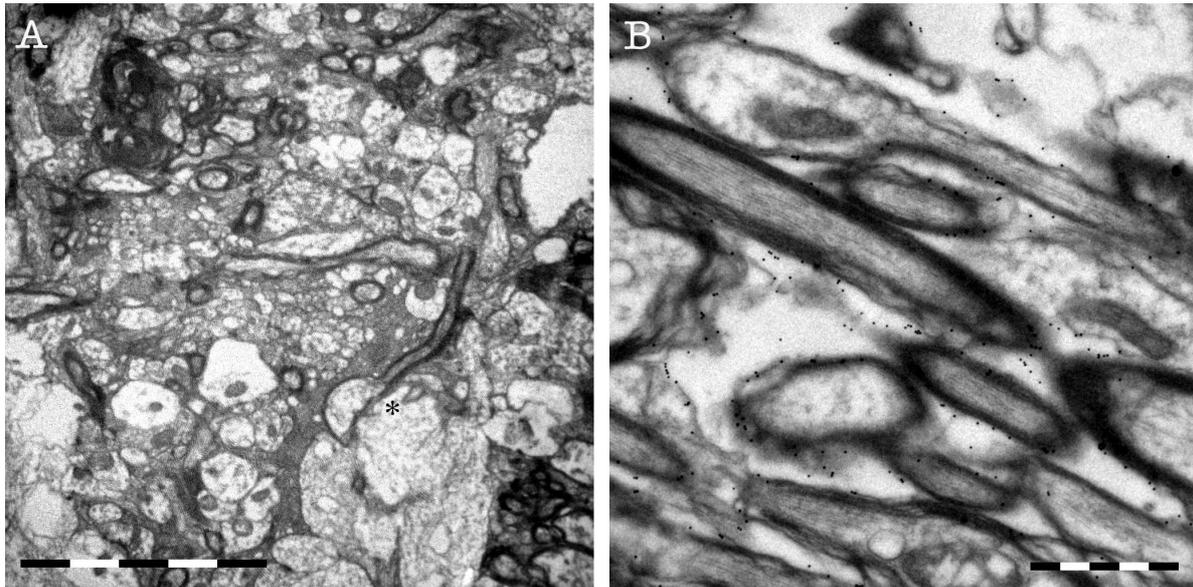


Abbildung 3.15: **A:** SAC in der Übersicht. Myelinisierte Axone kreuzen mit Dendriten und klein-zellulären Strukturen; * = axonales Terminal mit Synapse auf postsynaptischen Dorn; MB 5 μm . **B:** Bündel myelinisierter Axone im Längsschnitt; Ependymin-Markierung (schwarze Punkte) in den extrazellulären Bereichen vorhanden. MB 1 μm .

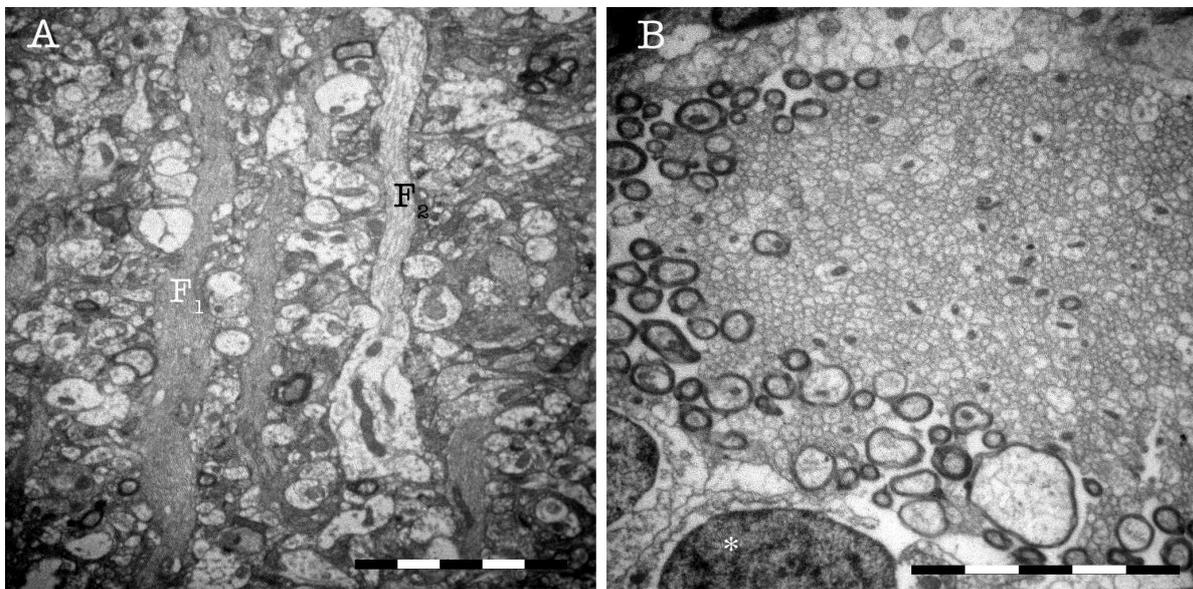


Abbildung 3.16: **A:** Fortsätze im Längsschnitt im SAC/Stratum griseum centrale. **B:** Faserbündel im SAC (Querschnitt). * = Zellkerne periventrikulärer Neurone. MB 5 μm .

3.5.4 Stratum griseum centrale (SGC)

Das Stratum griseum centrale ist die mächtigste Schicht des Tectum opticum. Fusiforme (Typ XI und XII), kleine multipolare (Typ IX und X), kleine piriforme (Typ II), bipolare (Typ VI und VIII) und horizontale Neurone (Typ V und VII) haben ihren Zellkern in dieser Schicht.

Abbildung 3.17 zeigt mit hoher Wahrscheinlichkeit ein kleines piriformes Neuron mit monopolarer Zytosmasma und einem einzelnen Apikaldendriten. Eine Ependymin-Markierung konnte nicht gefunden werden. Typisch für das SGC ist der hohe Anteil an Dendriten, die es durchqueren. Abbildung 3.18 zeigt den Fortsatz eines periventrikulären oder eines großen piriformen Neurons, an dessen Schaft einige Synapsen zu sehen sind. Trotz der Vielzahl an Neuronentypen und neuronalen Elementen erscheint das Stratum griseum centrale im elektronenmikroskopischen Bild erstaunlich homogen und ist im Allgemeinen frei von myelinisierten Axonen. Ependymin-Markierungen finden sich an Membranen und vor allem in extrazellulären Bereichen (Abb. 3.18 und 3.19).

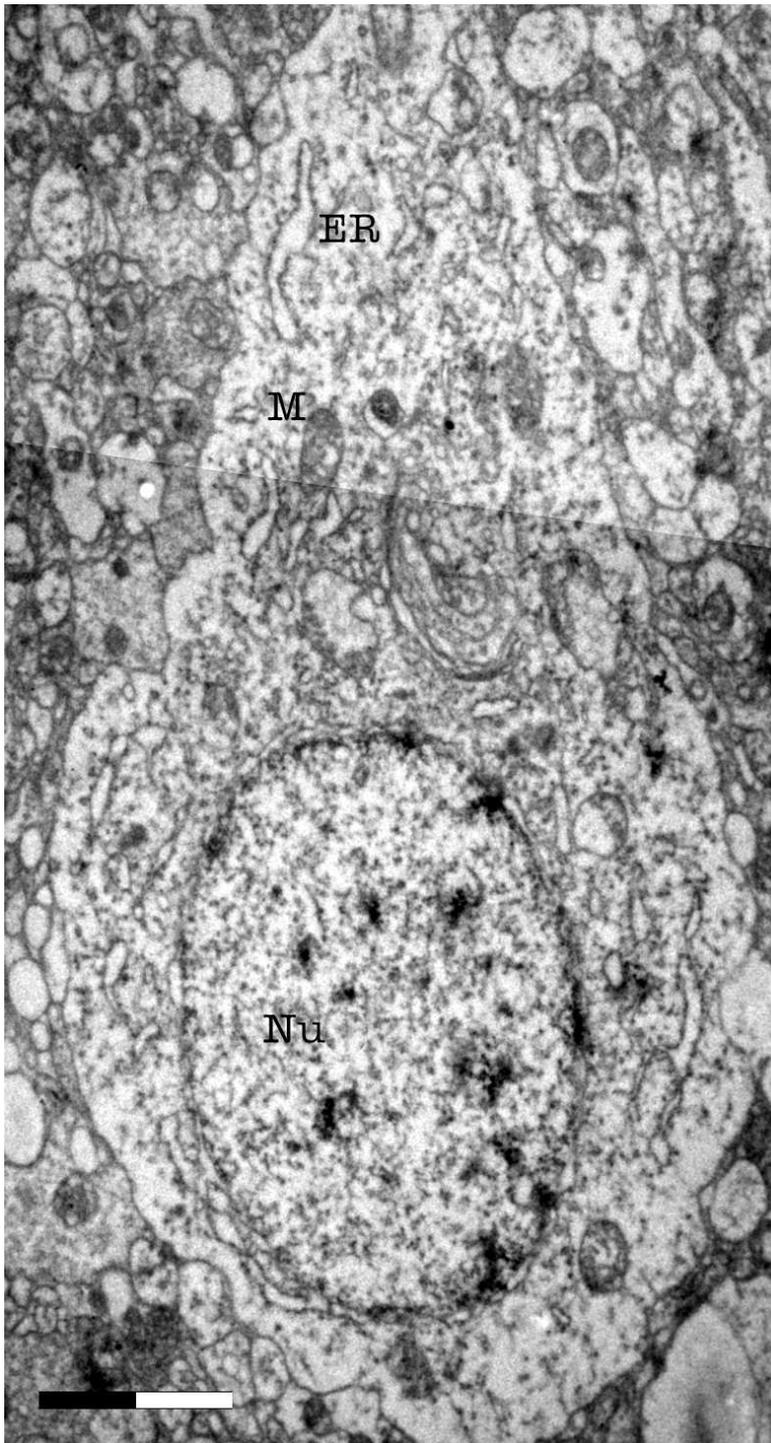


Abbildung 3.17: Zytoplasma mit Ansatzzone eines Apikaldendriten im SGC. Aufgrund vergleichender Betrachtung handelt es sich wahrscheinlich um das Soma eines Typ II- (kleinen piriformen) Neurons. Keine Ependymin-Markierung beobachtet. ER = Endoplasmatisches Retikulum, M = Mitochondrium, Nu = Zellkern. MB 2 μm .

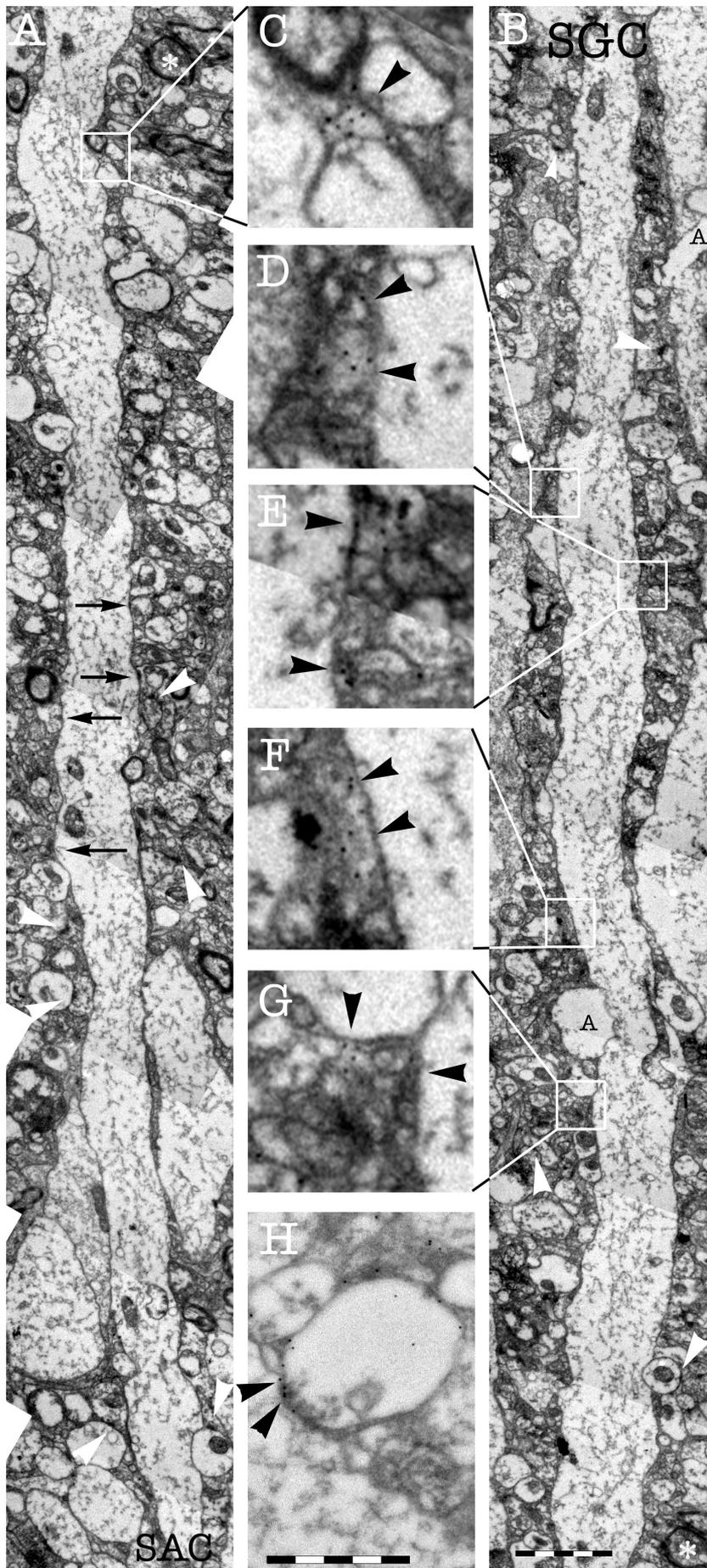


Abbildung 3.18: Verlauf eines Dendriten zwischen SAC (A) und SGC (B). In bestimmten Abschnitten (SAC) konnten vermehrt Synapsen an dendritischen Dornen gefunden werden (weiße Pfeilköpfe), an der Grenze zwischen SAC und SGC Synapsen am Dendritenschaft (schwarze Pfeile) und im SGC vermehrt extrazelluläre Bereiche am Schaft, die markiert sind (schwarze Pfeilköpfe in den Ausschnittsvergrößerungen C-G). Aufgrund des geraden, langen und relativ schmalen Schaftes handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um einen Apikaldendrit eines Typ XIV-Neurons. A = Astroglia, * = Marker (identische Struktur). H: Markierung einer Synapse am Dendritenschaft. MB: A/B: 2 μm ; H: 1 μm ; Kästchen C-G: 1 μm^2 .

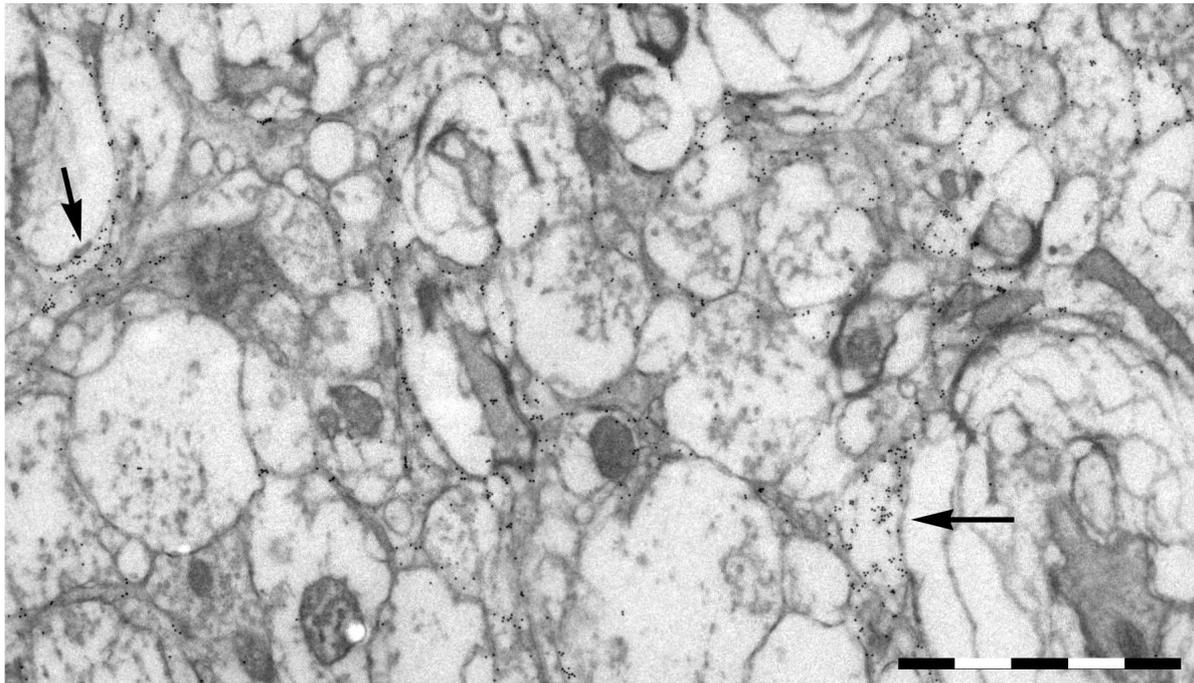


Abbildung 3.19: Typischer Neuropilbereich im SGC. Zellmembranen und extrazelluläre Bereiche sind markiert. Pfeile: Bestimmte hyalin erscheinende Zellen (Astrozyten?) weisen ebenfalls eine Markierung auf. Die starke Markierung resultiert aus längerem Ätzen der Schnitte (s. Kap. 3.4, Anmerkung), Synapsen sind dadurch nicht erkennbar; Fixierung mit 50 mM Natriumcacodylat. MB 2 μm .

3.5.5 Stratum fibrosum et griseum superficiale (SFGS)

Vier Arten Neurone, zahlreiche Dendritenachsen und -verzweigungen, myelinisierte Axone, die radiär und oberflächenparallel verlaufen sowie zahlreiche Arten von Axonendigungen (S2-S5, F1 u. F2) machen das SFGS des Tectum opticum zur Schicht mit der größten Heterogenität im mikroskopischen Bild (Abb. 3.20 A).

Die **pyramidalen Neurone** (Typ I) besitzen ein vertikal verlängertes bipolares Zytoplasma mit rundem Zellkern und dunklen Mitochondrien. Neben zwei Basaldendriten, die sich im SGC verzweigen, ist vor allem der mächtige Apikaldendrit auffällig, der radiär ins Stratum marginale verläuft, dort gabelförmig auffächert und viele Synapsen ausbildet (s. Kap. 3.5.7). Zytoplasma, Zellkern und Apikaldendrit eines pyramidalen Neurons zeigen eine Immunogoldmarkierung (Abb. 3.21). Die kleinen **bipolaren Neurone** (Typ VI und VIII) besitzen ebenfalls ein vertikal verlängertes bipolares Zytoplasma mit rundem Zellkern. Im Gegensatz zu den pyramidalen Neuronen erscheinen Soma und Mitochondrien der kleinen bipolaren Neurone heller (Abb. 3.20 B).

S2-Endigungen retinalen Ursprungs treten häufig im SFGS auf. Sie sind groß, erscheinen Golfschläger-artig und enthalten hell erscheinende Mitochondrien (Abb. 3.20 C). Neben wenigen synaptischen Kontakten am Apikaldendrit und Zytoplasma der pyramidalen Neurone gehören vor allem die zahlreichen Synapsen auf den dendritischen Dornen der periventriculären Neurone, deren Dendritenbaum in dieser Schicht auffächert, zu diesen S2-Endigungen.

Alle anderen Endigungen haben dunkle Mitochondrien (Daten nicht gezeigt). Immunogold-Markierungen des Ependymins sind ebenso wie im SGC entlang der Zellmembranen und in extrazellulären Bereichen häufig zu finden (Abb. 3.20 D).

3.5.6 Stratum opticum (SO)

Charakteristisch für die (im Goldfisch) dünnste Schicht des Tectum opticum ist die Vielzahl myelinisierter Axone (Abb. 3.22 A). Im SO können drei Bereiche unterschieden werden: Die Pars Superficialis, die Intermedia und die Profunda. Als Superficialis werden die Bereiche der retinalen Ganglienzellen beschrieben, die aus dem jeweils contralateralen Auge in Bündeln angeordnet das Tectum opticum oberflächenparallel innervieren. Mit ihren größeren Axon-Durchmessern werden sie von den ebenfalls myelinisierten retinalen Axonen der Profunda unterschieden. Beide Bereiche werden durch die Intermedia getrennt, die vor allem aus den Apikaldendriten tiefer im Tectum opticum liegender Neuronen besteht, nämlich den der periventriculären, der kleinen piriformen und der pyramidalen Neurone (Abb. 3.22 B). Als einziger Neuronentyp finden sich in der Intermedia die Zellkörper **horizontaler Neurone** (Typ III–V), die einen runden Zellkern aufweisen und deren Endoplasmatisches Retikulum erweitert erscheint (Abb. 3.22 C). Ihre Dendriten erstrecken sich horizontal durch das SO und das obere SFGS. Die horizontalen Neurone werden als Typ IV bezeichnet, wenn ihre Zellkörper im SFGS, und als Typ V, wenn sie im SGC liegen. Ependymin-Markierung ist in der Regel extrazellulär zwischen den Myelinscheiden der retinalen Axone zu sehen (Abb. 3.22 D) oder an Membranen in der Nähe von S2-Terminalien (s. Kap. 3.5.7).

3.5.7 Stratum marginale (SM)

Das SM ist frei von Neuronen. Es besteht vorwiegend aus Dendriten und Axonen, die nicht von Myelinscheiden umhüllt sind. Diese Schicht des Tectum opticum hat ein homogenes mikroskopisches Erscheinungsbild (Abb. 3.23 A). Die oberflächenparallel verlaufenden **Marginalfasern** des Torus longitudinalis haben hufeisenförmige Synapsen (S1-Terminalien) auf sog. Dornen, blasenartige Auswölbungen an den distalen Verzweigungen des Apikaldendriten der pyramidalen Neurone (Abb. 3.23 B–D, 3.24), die von glialen Elementen umgeben sind.

Den physiologischen Abschluss des SM und damit des Nervengewebes als solches bilden Ausläufer der Radiärgliazellen, deren Somata im Ependym (s. Kap. 3.5.1) liegen und deren Fortsätze das gesamte Tectum opticum in radiärer Orientierung durchziehen (vgl. Abb. 3.13, *Inset*). Diese Ausläufer, die subpialen Endfüßchen, erscheinen im elektronenmikroskopischen Bild großflächig, hell und strukturarm (Abb. 3.25).

Auffällig im SM sind größere extrazelluläre Bereiche, die eine starke Ependymin-Markierung aufweisen (Abb. 3.26 C–D, 3.35). Zuweilen treten sie auch in engen Kontakt mit den Apikaldendriten (Abb. 3.26 A–B). Einige S1-Terminalien zeigen ebenfalls eine Ependymin-Markierung an der präsynaptischen Seite der Synapse (Abb. 3.23 C, 3.24). Ebenso zeigen die Endfüßchen der Radiärglia eine Immunogold-Markierung (Abb. 3.25 B).

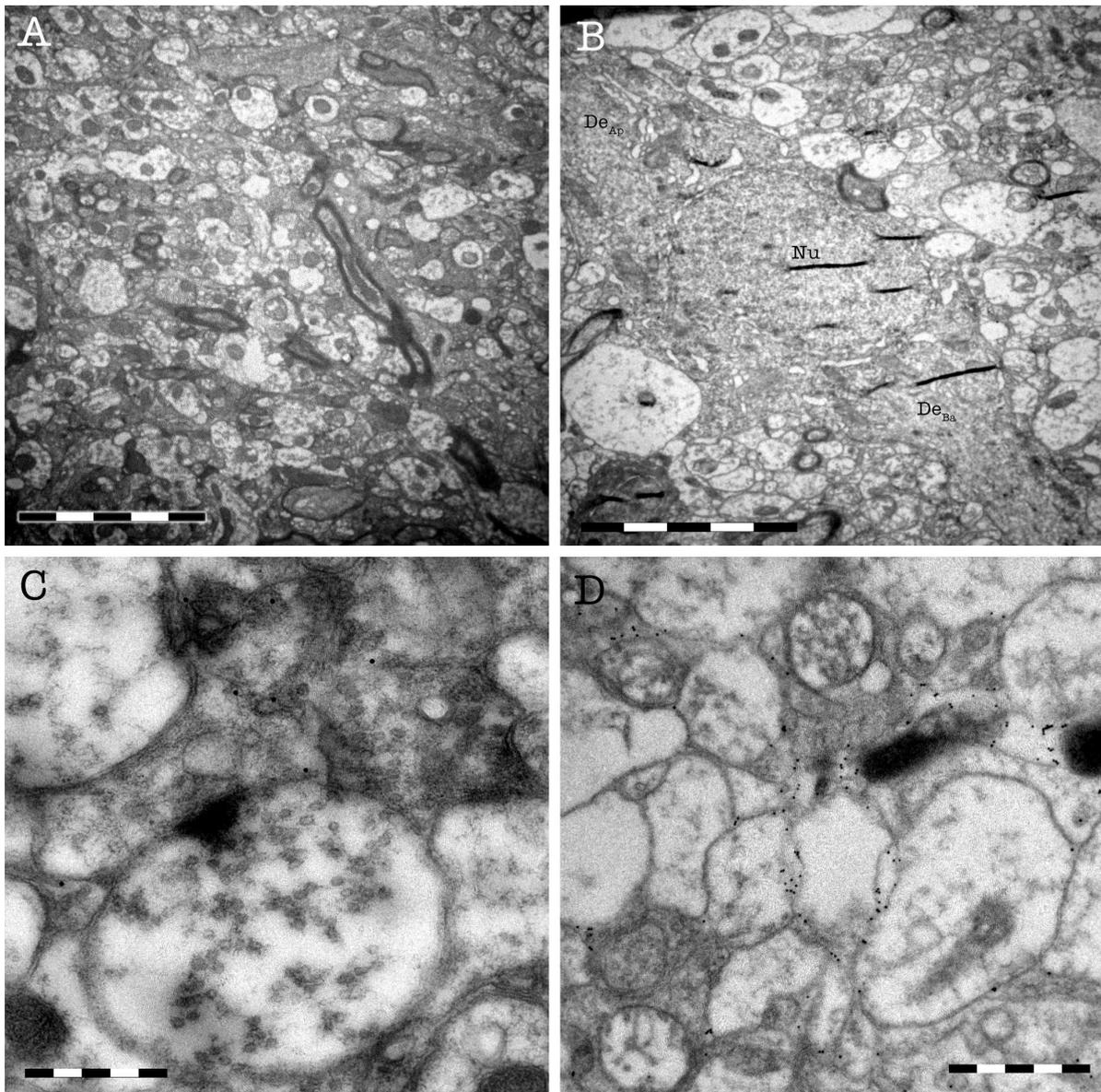


Abbildung 3.20: **A:** Typischer Neuropilbereich im SFGS mit zahlreichen neuronalen Elementen. **B:** Typ-VI-Neuron mit bipolarem Zytoplasma. De_{Ap}/De_{Ba} = Apikal-/Basaldendrit; Nu = Zellkern. Schwarze, horizontale Linien sind Artefakte. **C:** Retinales S2-Terminal mit Synapse. Markierungen sind vorhanden, im synaptischen Bereich jedoch fehlend. **D:** Ependymin-Markierung an Membranen und extrazellulären Bereichen im SFGS. MB A/B: $5\ \mu\text{m}$; C: $0,5\ \mu\text{m}$; D: $1\ \mu\text{m}$.

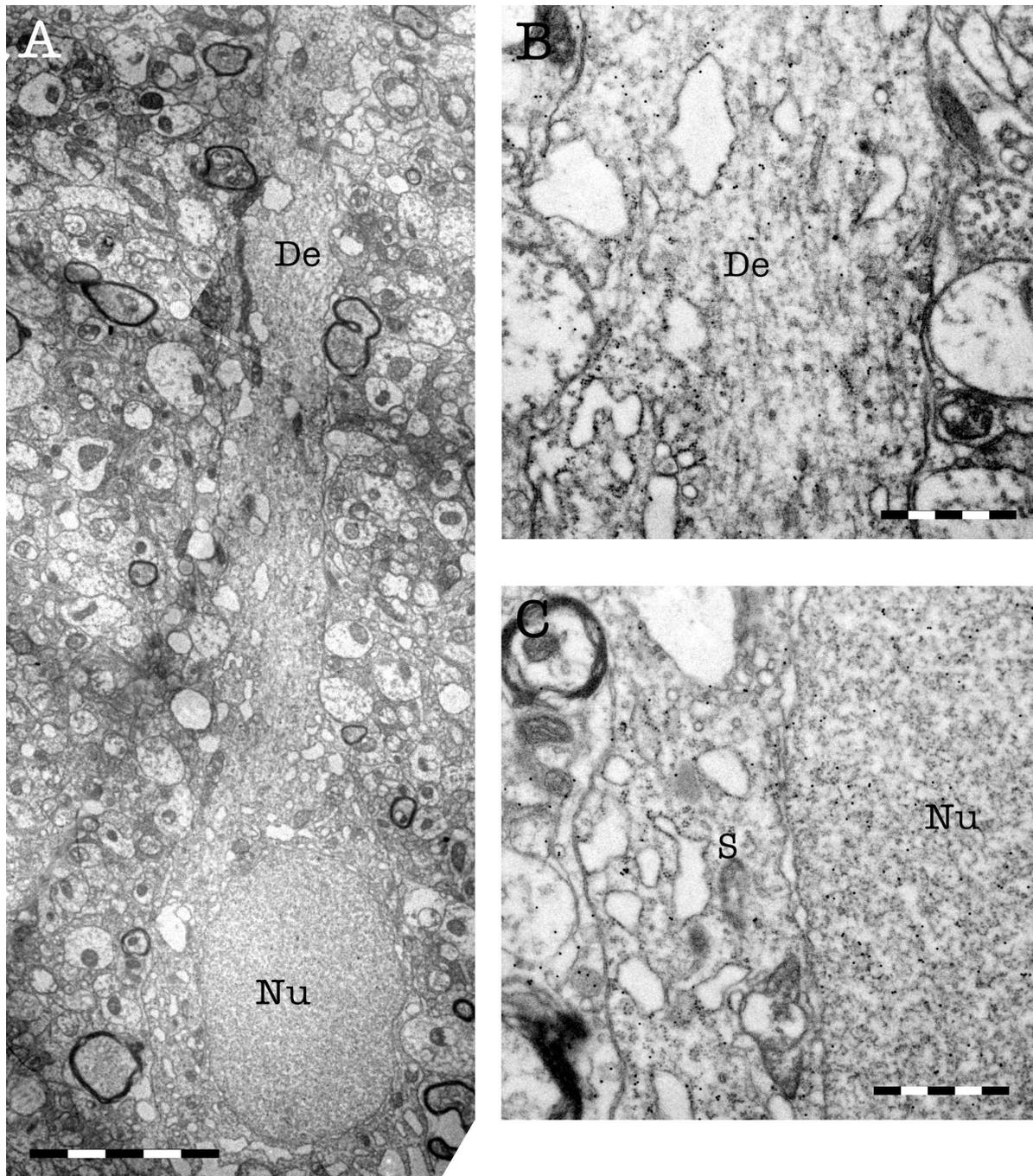


Abbildung 3.21: **A:** Typ I-Neuron mit proximalem Apikaldendrit. **B:** Detailausschnitt des Apikaldendriten mit Immunogoldmarkierung gegen Ependymin. **C:** Detailausschnitt des Zytoplasmas mit Zellkern. Immunogoldmarkierung ist bei beiden vorhanden. De = Apikaldendrit; Nu = Zellkern; S = Zytoplasma; MB
A: 5 μm ; B/C: 1 μm

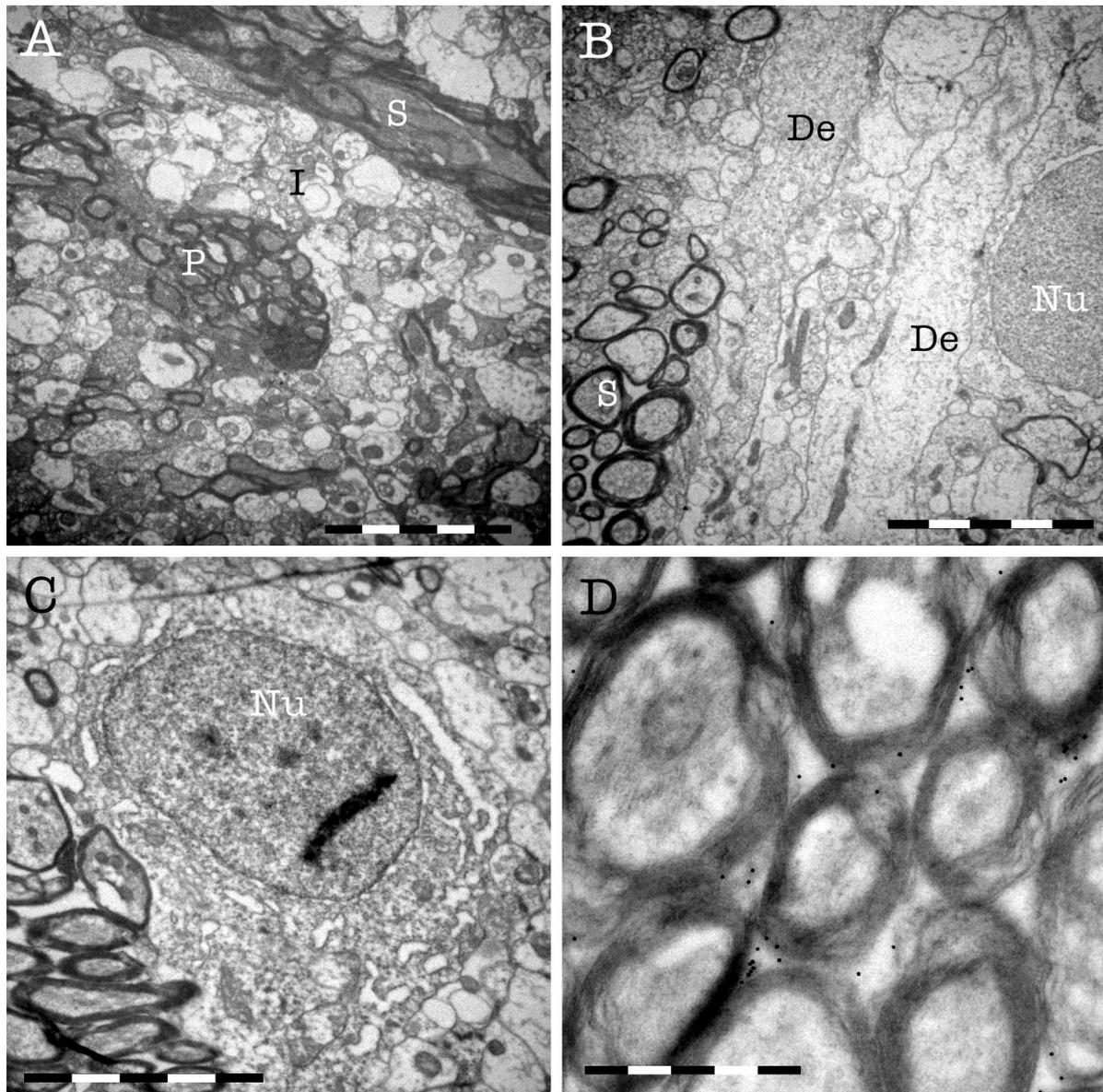


Abbildung 3.22: **A:** Typisches Erscheinungsbild des SO mit Bündeln myelinisierter Axone und den Bereichen Superficialis (S), Intermedia (I) und Profunda (P). **B:** SO mit Superficialis (S), Apikal-Dendriten (De) und Zellkern eines Typ III-Neurons (Nu). **C:** Zellkörper mit Zellkern (Nu) eines Typ III-Neurons in der Intermedia. (Schwarzer Balken im Zellkern ist ein Artefakt.) **D:** Extrazelluläre Ependymin-Markierung zwischen dem Myelin der Axone retinaler Ganglienzellen. MB A-C: 5 μm ; D: 1 μm .

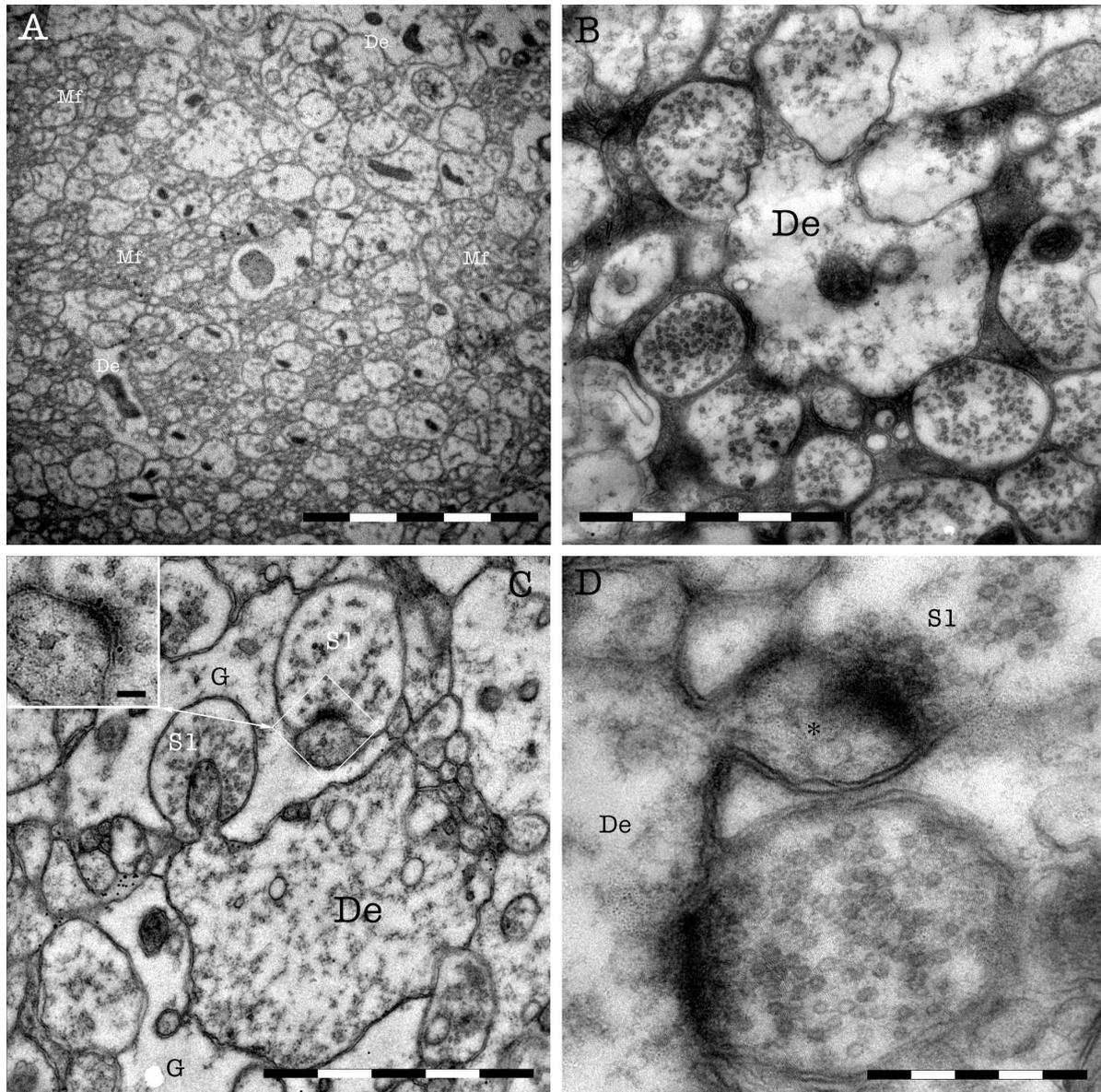


Abbildung 3.23: **A:** Typisches Erscheinungsbild des SM mit unmyelinisierten Axonen der Marginalfasern (Mf) aus dem Torus longitudinalis und einigen Dendriten (De). **B:** Querschnitt eines Dendriten (De) mit Synapsen direkt am Dendritenschaft und an den Dornen. **C:** Schnitt durch einen Apikaldendriten (De) mit hufeisenförmigen Synapsen (S1) an dendritischen Dornen. Eine präsynaptische Ependymin-Markierung ist an einer Synapse sichtbar (*Inset*). In extrazellulären Bereichen ist auch Ependymin-Markierung vorhanden. **D:** Detailansicht zweier Synapsen an einem Dendrit (De). Oben: Dendritischer Dorn (*) eines S1-Terminal (S1); unten: Synapse direkt am Schaft des Dendriten. 0,5 % (v/v) Glutaraldehyd; ohne Immunogoldmarkierung. MB A: 5 μm ; B/C: 2 μm ; D: 0,5 μm ; *Inset* in C: 100 nm.

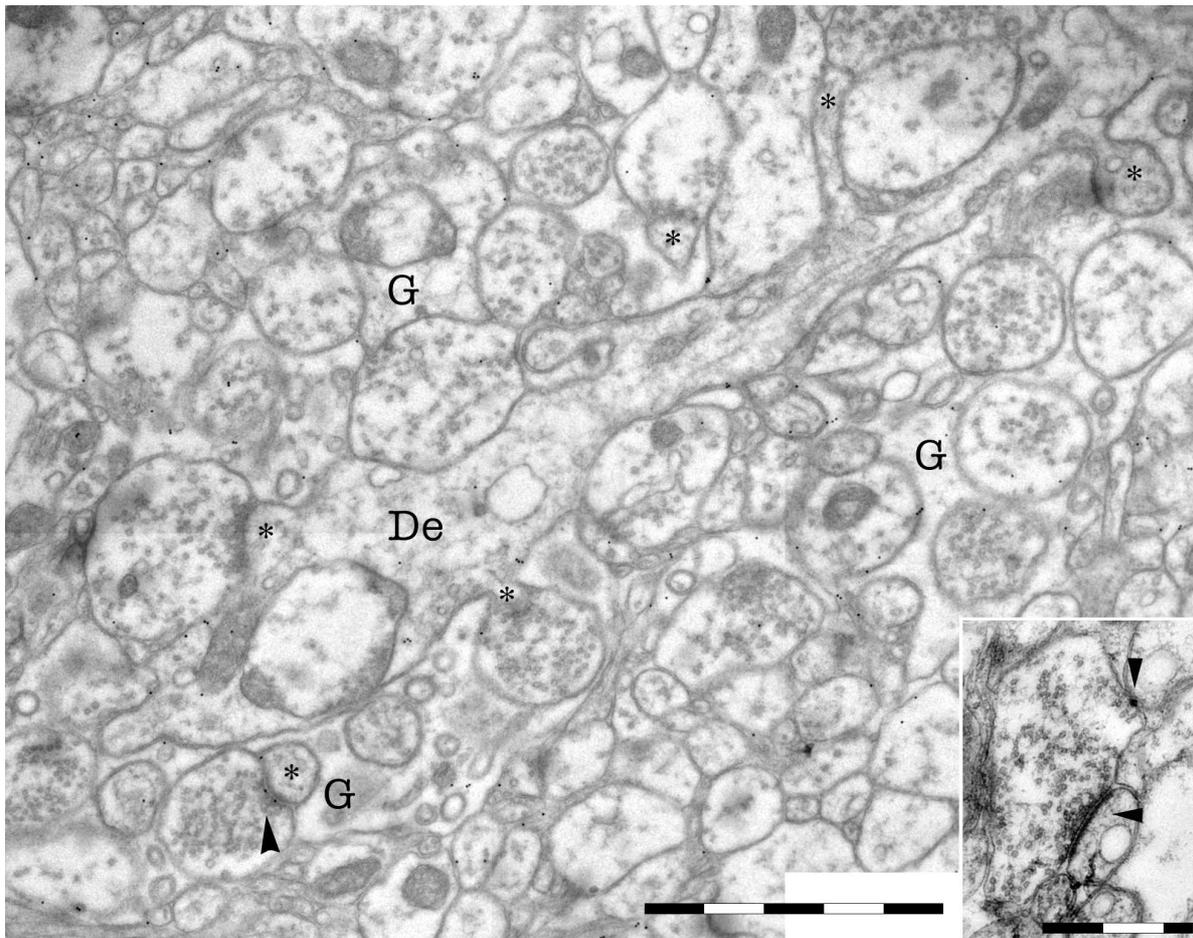


Abbildung 3.24: Ausschnitt eines Apikaldendriten (De) mit einigen S1-Terminalien (*). Ein S1-Terminal zeigt Ependymin-Markierung auf der präsynaptischen Seite dieser Synapse (Pfeilkopf). Glia-Zellen (G) umgeben die Terminalien. *Inset:* S1-Terminal mit 2 Synapsen (Pfeilköpfe). MB: 2 μm ; *Inset:* 1 μm .

3.5.8 Hirnhaut - Meninx (Mx)

Den Abschluss des Gehirngewebes bildet die Hirnhaut, die nicht zum Nervengewebe gezählt wird. Sie wird in Ectomeninx (*Dura mater*) und Endomeninx bzw. Leptomeninx unterschieden. Die **Ectomeninx** liegt dem Schädeldach an; vom perimeningalen Raum getrennt, liegt die **Endomeninx** dem Nervengewebe auf. Die Endomeninx ihrerseits wird in drei Schichten eingeteilt: Die dicke innere Endomeninx (*Pia vera*), eine dünne intermediäre Schicht und die äußere endomeningeale Schicht, dem Stratum externum meningis, die der *Arachnoidea* der Säugetiere entspricht (Abb. 3.27, 3.34).

Das SM wird durch eine dreiteilige dünne Membran, die Basallamina (Abb. 3.28, 3.35), von der Endomeninx abgegrenzt. Sie ist im elektronenmikroskopischen Bild insbesondere bei älteren Goldfischen durch dunkle, diskusförmige Strukturen Pia-seits gelegen zu erkennen (Abb. 3.28 D, 3.35). Im Bereich der inneren Endomeninx und der Endfüßen der Radiärglia gibt es einige Vesikel, deren Lumen Ependymin-Markierungen aufweisen können (Abb. 3.29).

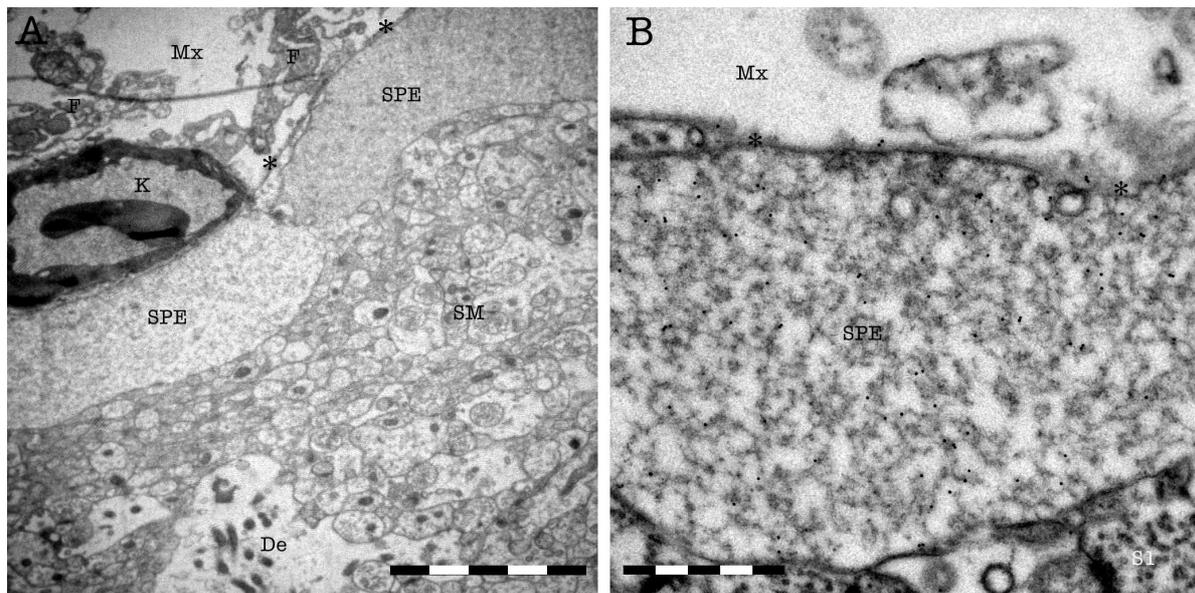


Abbildung 3.25: **A:** Übersichtsbild der Hirnhaut (Mx) mit Fibroblasten (F) und einem Blutgefäß (K), die durch die Basallamina (*) vom SM mit den subpialen Endfüßchen der Radiärglia (SPE) und Dendriten (De) getrennt ist. **B:** Das Detailbild zeigt eine einheitliche Ependymin-Markierung des subpialen Endfüßchens (SPE). Unten rechts ist ein S1-Terminal zu sehen. MB A: 5 μm ; B: 1 μm .

Die innere Endomeninx ist gekennzeichnet durch zahlreiche Fibroblasten, Blutgefäße, Makrophagen und voluminöse Extrazellularräume (Abb. 3.27). Die Fibroblasten der inneren Hirnhaut sind reich an Endoplasmatischem Retikulum (Abb. 3.30 A/B), das sich auf den Schnitten als kanalartige (Abb. 3.30 C, 3.31 D) oder ringförmige (Abb. 3.30 D, 3.31 C) Struktur präsentiert, bald erweitert erscheint (Abb. 3.31 A/B) und schließlich große Vakuolen ausbildet (Abb. 3.31 C/D). Diese Vakuolen können mit dem eigentlichen Fibroblasten noch verbunden sein (Abb. 3.32). An der Verbindungsstelle verdünnt sich das dunkle Zytoplasma der Mutterzelle und resultiert in einer Doppelmembran, die die Vakuole umschließt (Abb. 3.32, *Inset*).

Die Fibroblasten besitzen zahlreiche Ausläufer, die bis an die Basallamina auf der einen und bis an die intermediäre Schicht auf der anderen Seite reichen. Die kompakt angeordneten Zellen dieser monozellulären intermediären Schicht haben pinozytotische Vesikel, sowie zahlreiche *tight-* bzw. *gap-*junctions und Desmosomen (Abb. 3.33). Den Abschluss der Endomeninx bildet die äußere Endomeninx, die vorwiegend aus locker angeordneten, abgeflachten Zellen besteht, die mit ihren Fortsätzen in den perimeningealen Raum hineinreichen und zum Teil eine starke Ependymin-Markierung zeigen (Abb. 3.34).

Ependymin-Markierungen können in der Endomeninx an vielen Strukturen gefunden werden: Im rauhen Endoplasmatischen Retikulum der Fibroblasten (Abb. 3.30), besonders zahlreich in deren Aufweitungen und Vakuolen (Abb. 3.31), in allen extrazellulären Bereichen sowie an der Basallamina (Abb. 3.35), im perineuronalen bzw. perivaskulären Raum rund um die Blutgefäße (Abb. 3.36), sowie in lysosomalen Strukturen in endomeningeealen Zellen, aber auch in Zellen im SM (Abb. 3.37).

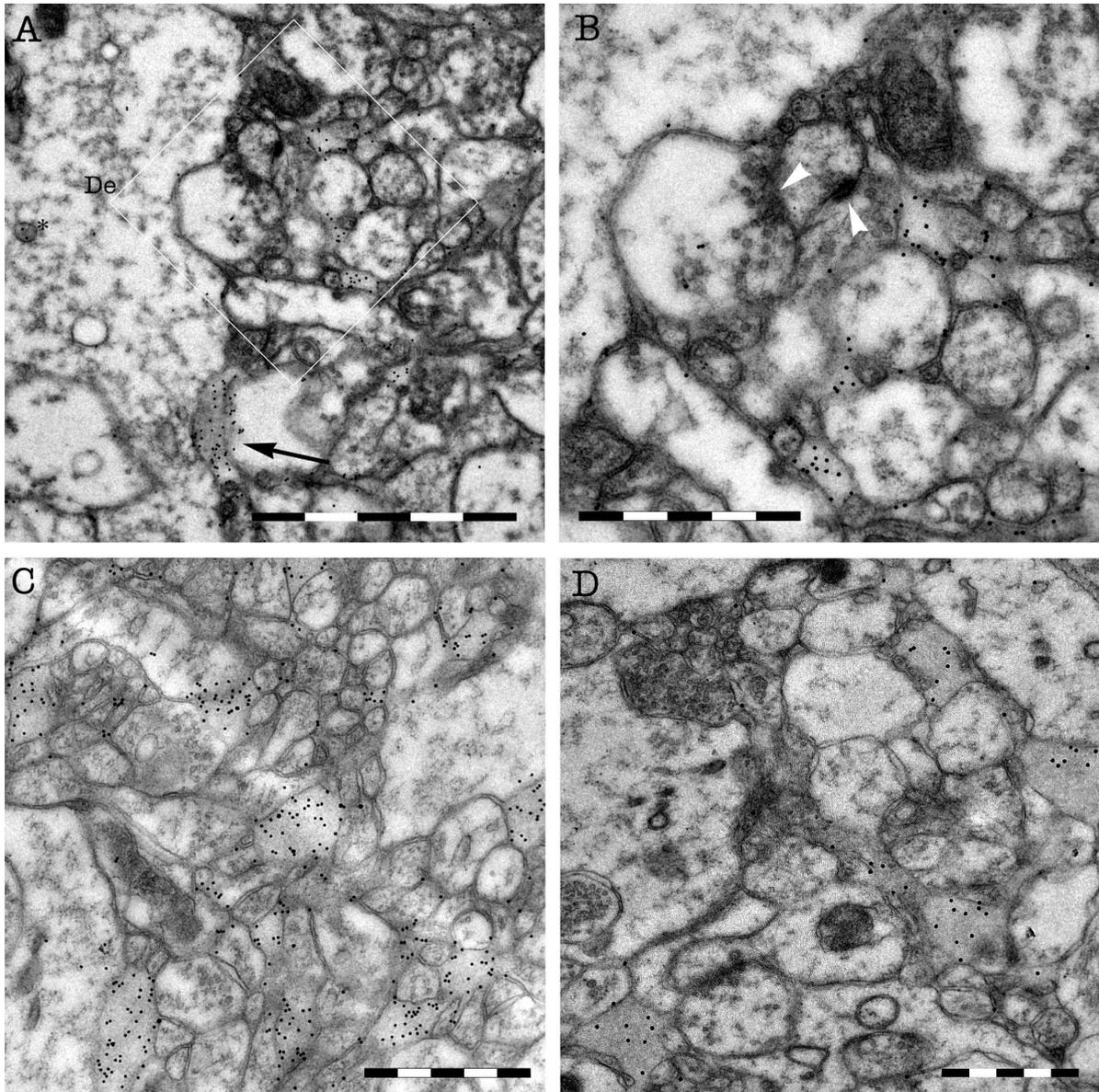


Abbildung 3.26: **A:** Apikaldendrit (De) mit anliegenden extrazellulären Bereichen (Pfeil), die eine Ependymin-Markierung zeigen. Eine Vesikel im Dendriten (*) zeigt ebenfalls Ependymin-Markierung. **B:** Ausschnitt aus A: Synapsen (Pfeilköpfe) an einem dendritischen Dorn. **C/D:** Ependymin-Markierung in extrazellulären Bereichen innerhalb des oberen SM. Die extrazellulären Bereiche sind meist an ihrer einheitlichen Textur sowie an der fehlenden Zell-typischen Doppelmembran zu erkennen. MB A: 2 μm ; B-D: 1 μm .

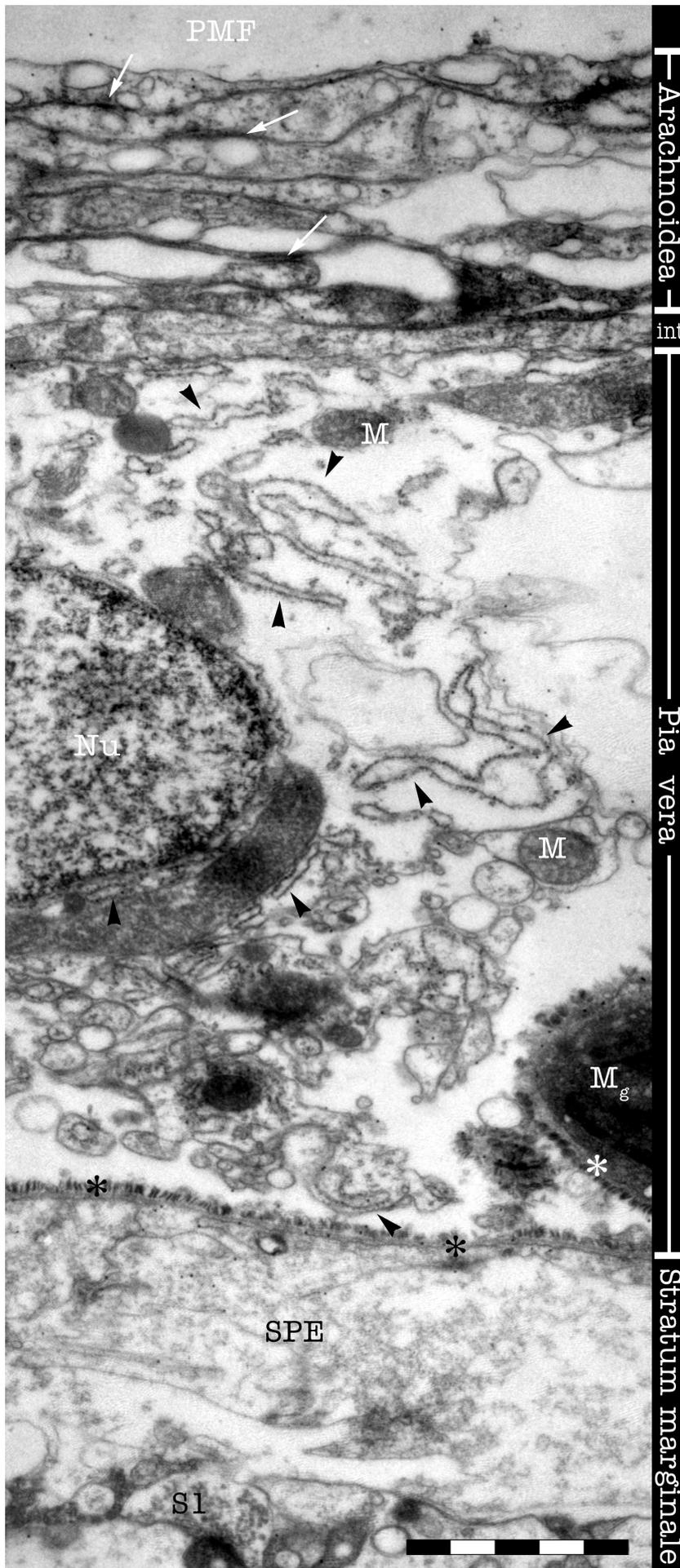


Abbildung 3.27: Übersicht der inneren Hirnhaut (Endomeninx) vom Goldfisch. Als letzte Schicht des Gehirngewebes ist das Stratum marginale mit seinen S1-Terminalien unten zu sehen, dessen Abschluss die subpiaalen Endfüße der Radiärglia (SPE) mit der Basallamina (* - schwarz) bilden. Von einer Lamina (* - weiß) sind ebenfalls die glatten Muskelzellen (M_g) der Blutgefäße umgeben. Die innere Endomeninx, *Pia vera*, nimmt mit ihren Fibroblasten und deren Organellen (Nukleus, N; rauhem ER (Pfeilköpfe); Mitochondrien, M) den größten Raum ein. Getrennt von einer monozellulären, kompakten intermediären Zellschicht (int) bilden die Zellen der äußeren Endomeninx, *Arachnoidea*, mit ihren Zellkontakten (Pfeile) den Abschluss der inneren Hirnhaut. PMF = Permeatingeale(r) Raum-/Flüssigkeit. MB: 2 μ m.

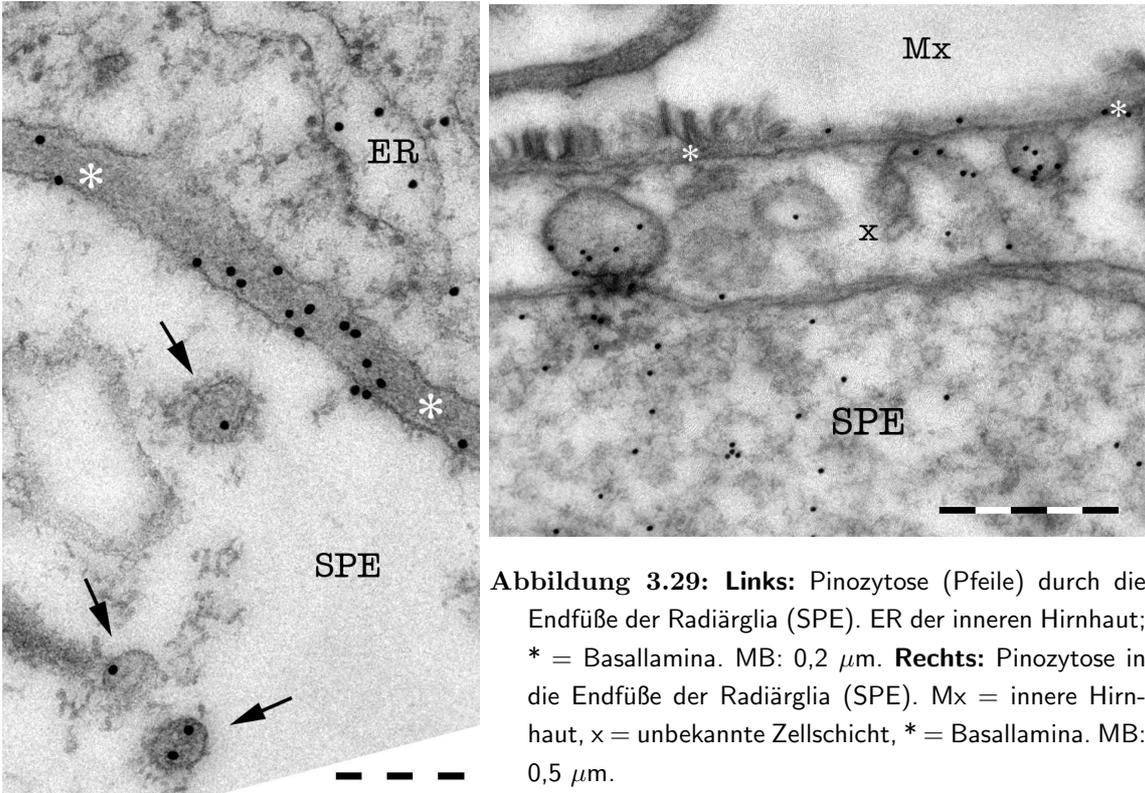


Abbildung 3.29: **Links:** Pinozytose (Pfeile) durch die Endfüße der Radiärglia (SPE). ER der inneren Hirnhaut; * = Basallamina. MB: 0,2 μ m. **Rechts:** Pinozytose in die Endfüße der Radiärglia (SPE). Mx = innere Hirnhaut, x = unbekannte Zellschicht, * = Basallamina. MB: 0,5 μ m.

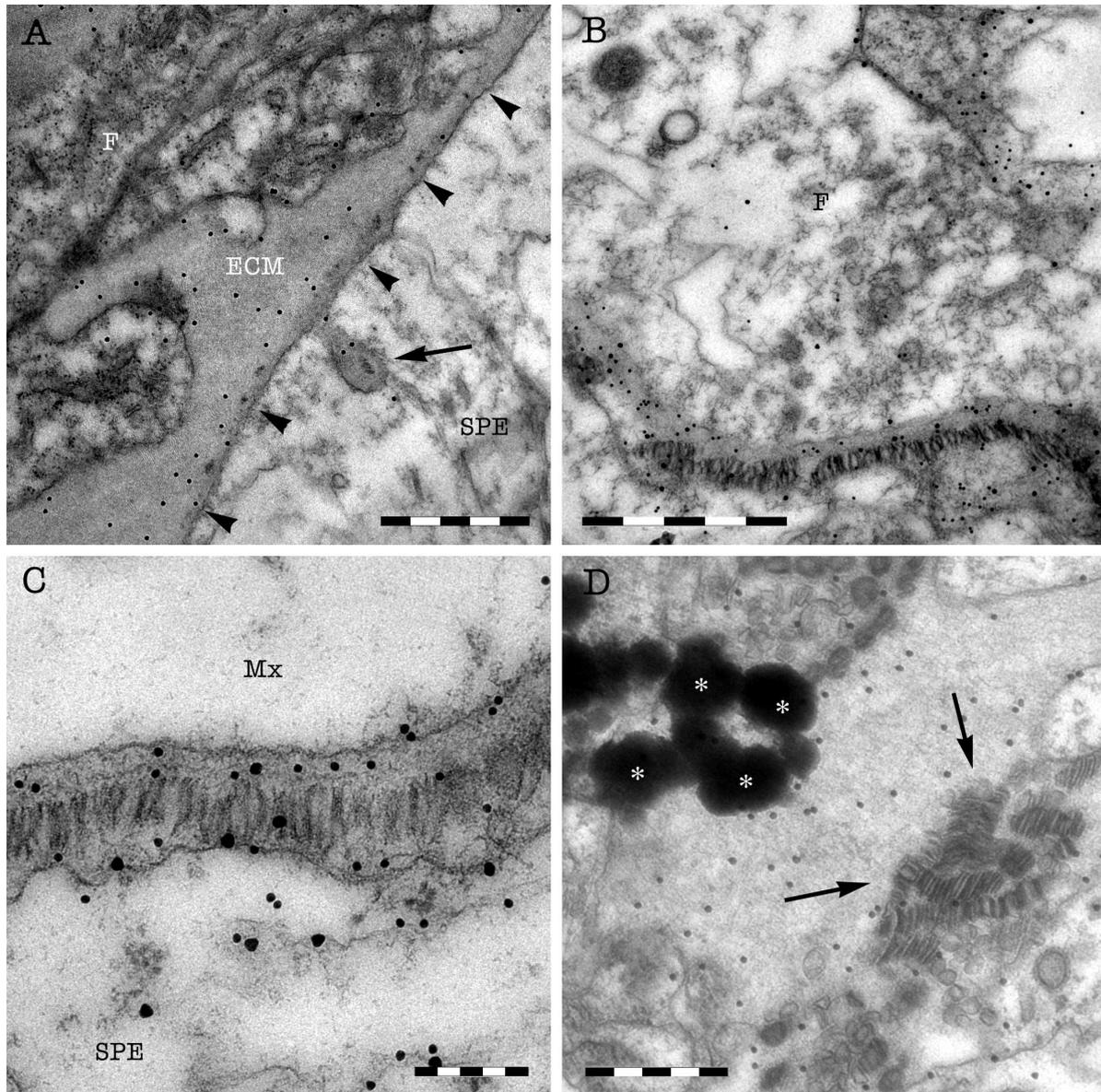


Abbildung 3.28: Basallamina des Tectum opticum mit Ependymin-Markierung. **A:** Die Basallamina eines jungen Goldfischgehirns (Pfeilköpfe) trennt die Endomeninx mit den Fibroblasten (F) ohne erkennbare Grenze zur extrazellulären Matrix (ECM) von den subpialen Endfüßen der Radiärglia (SPE) ab. Gelegentlich sind Einstülpungen (Pfeil) in die SPE zu erkennen. **B:** Bei älteren Fischen ist die mittlere Schicht der Basallamina durch zottenartige Strukturen gekennzeichnet. Doppelte Färbung (s. Kap. 3.4, Anmerkung) **C:** Detailansicht. Doppelte Färbung, Mx = Endomeninx. **D:** Detailansicht akkumulierter Zotten der lamina densa (Pfeile) in der inneren Endomeninx. * = Artefakte. MB A/B: 1 μm ; C: 200 nm; D: 0,5 μm .

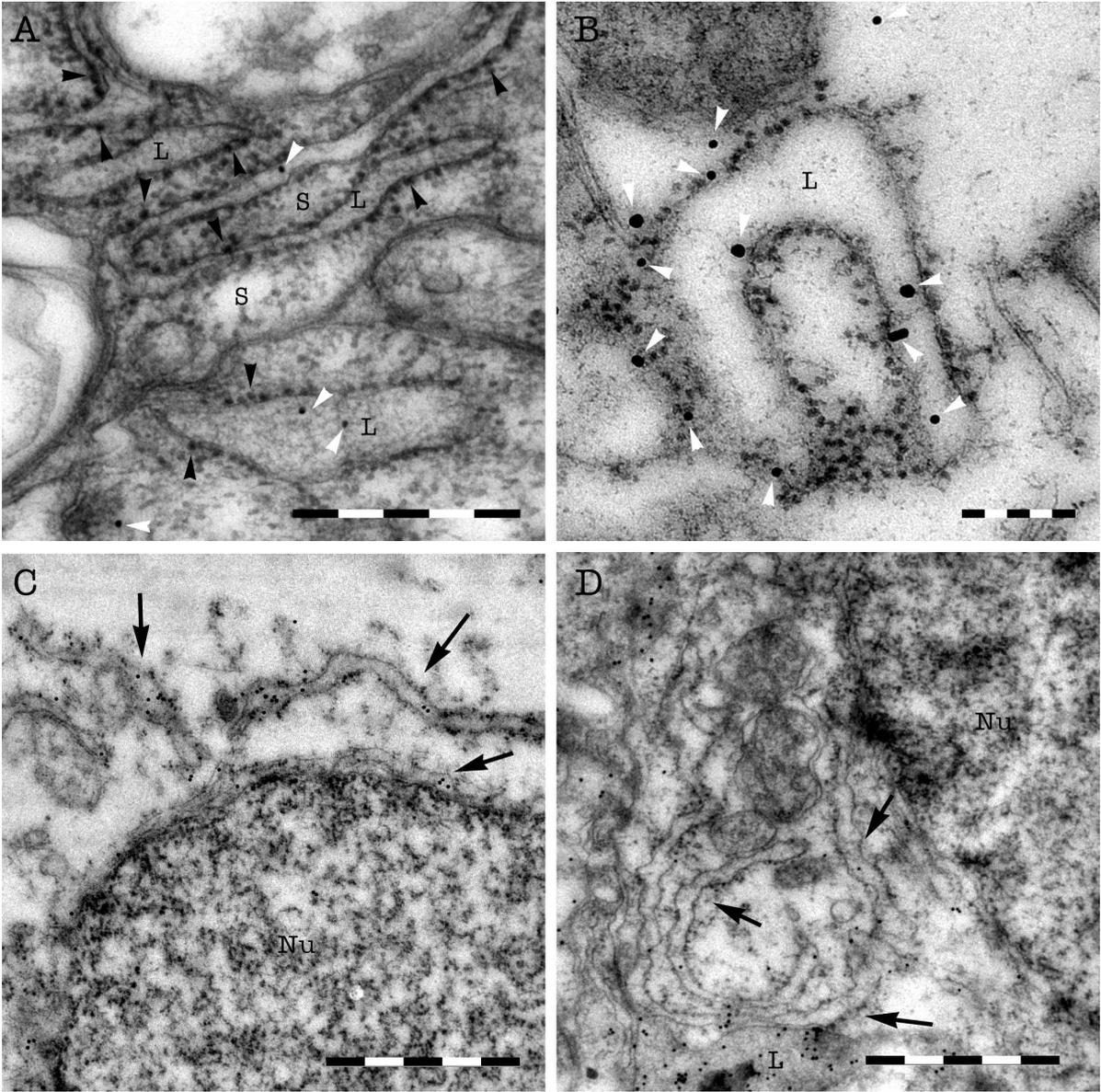


Abbildung 3.30: Endoplasmatisches Retikulum (ER) in den Fibroblasten der inneren Hirnhaut. **A/B:** Nahaufnahme mit Immunogold-Partikel (weiße Pfeilköpfe) und Ribosomen (Beispiele: schwarze Pfeilköpfe). **C/D:** ER am Zellkern (Nu) in dünnem schlangenartigen oder schalenförmigen Aufbau (Pfeile). L = Lumen des ER, S = Zytoplasma der Zelle. MB A: 0,5 μ m; B: 200 nm; C/D: 1 μ m.

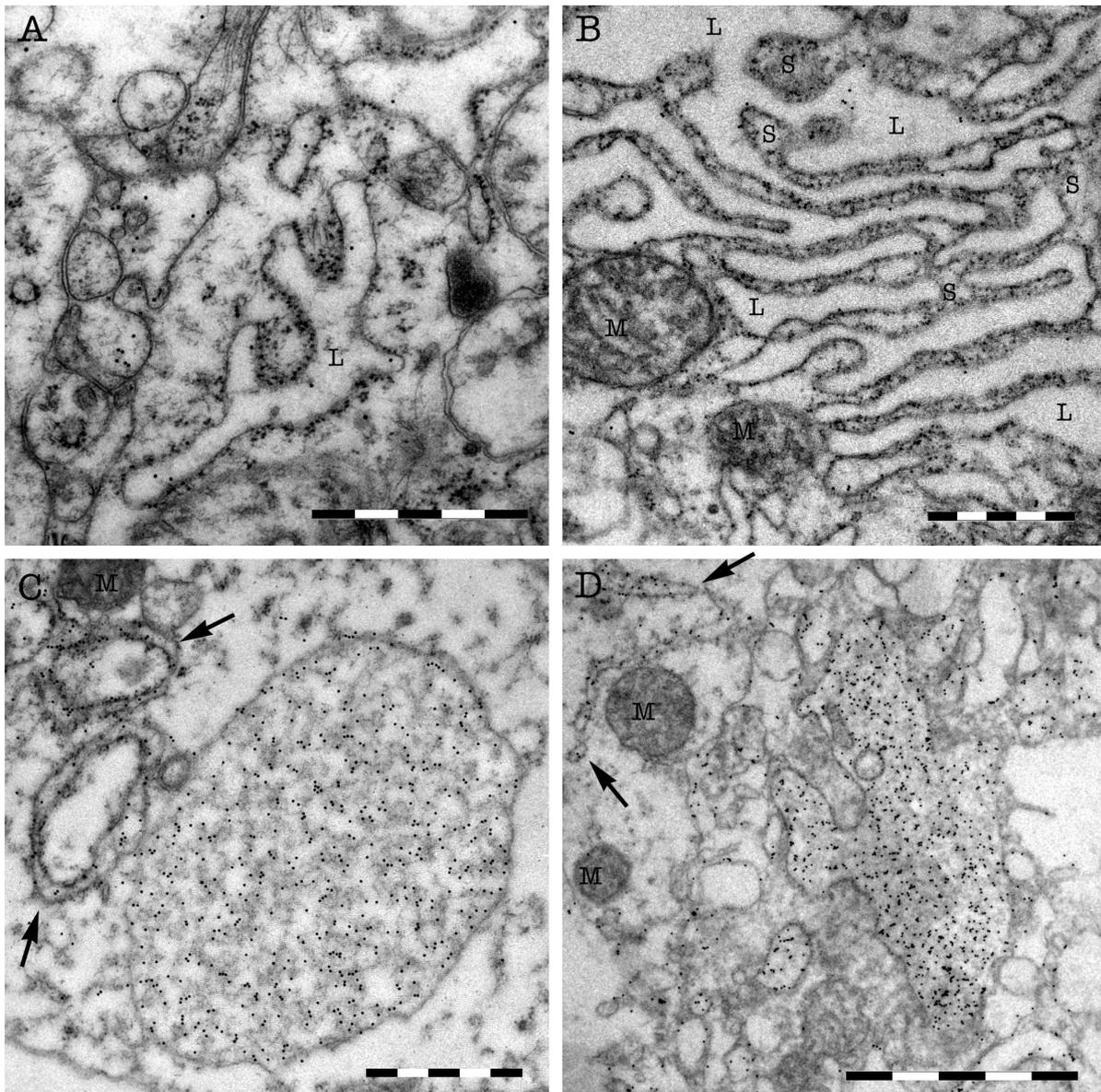


Abbildung 3.31: **A/B:** Erweitertes Endoplasmatisches Retikulum (ER) in den Fibroblasten der inneren Hirnhaut. Zytoplasma (S) mit Ribosomen an der Membran-Außenseite des ER; Ependymin-Markierung (schwarze Punkte) im Lumen (L) und der Membran-Innenseite des ER. **C/D:** Ependymin-Markierung in großen Vakuolen. ER als Ringe oder Kanäle angeschnitten (Pfeile). M = Mitochondrium. MB A-C: 1 μm ; D: 2 μm .

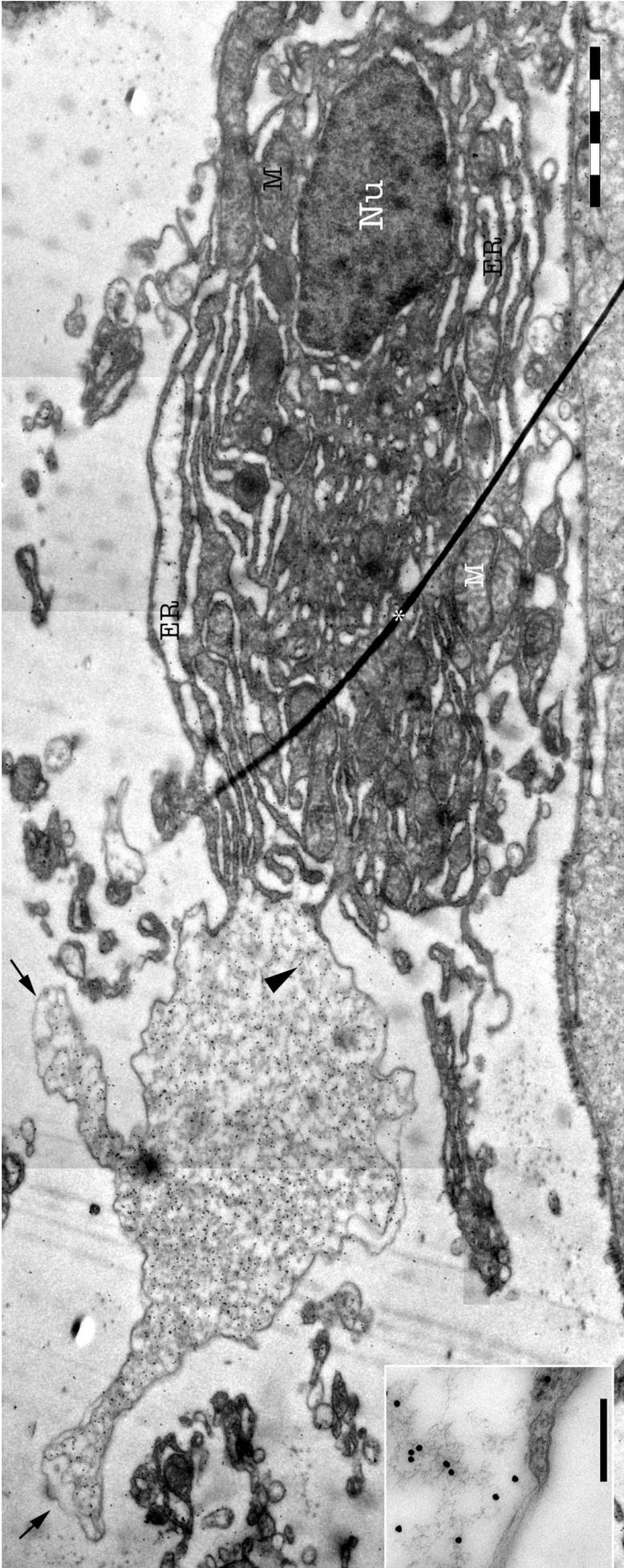


Abbildung 3.32: Fibroblast (dunkel, rechts) ist mit Vakuole (hell, links) verbunden und weist auf eine apokrine bzw. holokrine Sekretion; die Doppelmembran scheint degeneriert (Pfeile). Die Vakuole zeigt deutliche Immunogold-Markierung, ebenso das ER in der Mutterzelle. Der Pfeilkopf weist auf die Übergangszone (siehe *Inset*). M = Mitochondrien, Nu = Nukleus, * = Artefakt. MB: 2 μm ; *Inset*: 0,2 μm .

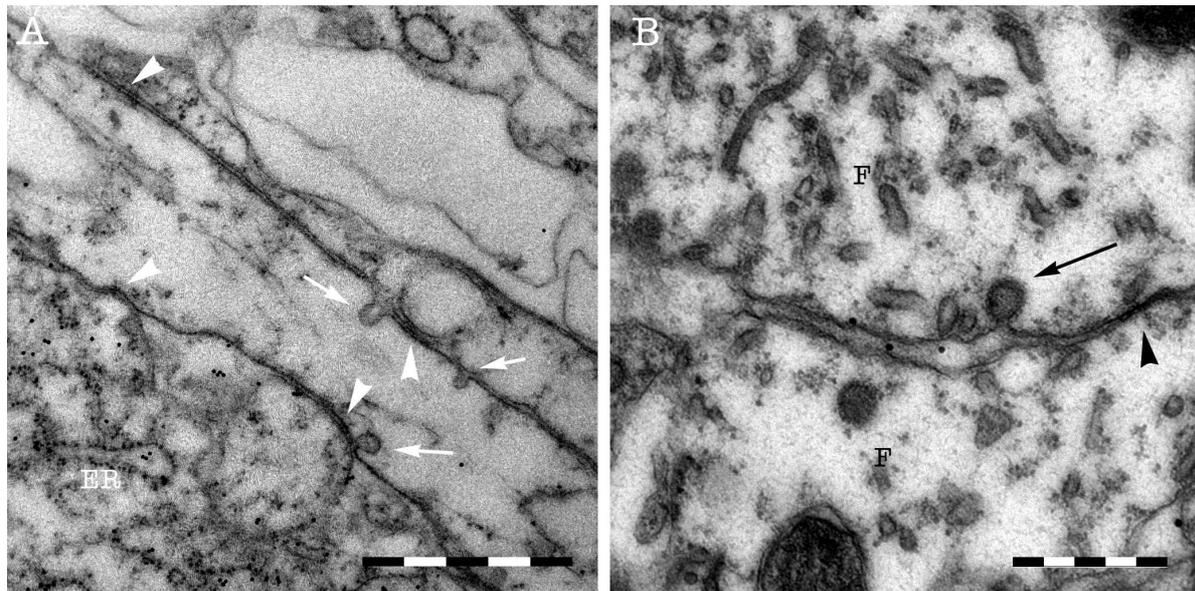


Abbildung 3.33: **A:** Monozelluläre intermediäre Zellschicht mit endo- bzw. exozytotischen Vesikeln (Pfeile) und zahlreichen Zellkontakten (Pfeilköpfe) zur äußeren (oben) und inneren Endomeninx (unten). ER = Endoplasmatisches Retikulum. **B:** Zellkontakte (Pfeilkopf) und endozytotische Vesikel (Pfeilkopf) an Fibroblasten (F). MB A: $1\ \mu\text{m}$; B: $0,5\ \mu\text{m}$.

3.5.9 Zusammenfassung der Ependymin-Markierung im Tectum opticum

Eine Ependymin-Markierung im Tectum opticum der Goldfische kommt in den extrazellulären Bereichen aller Schichten sowie der inneren Hirnhaut vor, obgleich nicht in gleicher Menge (vgl. Abb. 3.8). Neben den extrazellulären Bereichen ist eine intrazelluläre Ependymin-Markierung in folgenden strukturellen Bereichen beobachtet worden:

- in Fortsätzen und Vakuolen von Ependymalgliazellen (vgl. Abb. 3.11 A und Abb. 3.12).
- in Zytoplasma, Zellkern und Apikaldendrit pyramidaler Neurone im SGFS (vgl. Abb. 3.21)
- in den Endfüßen der Radiärglia im SM (vgl. Abb. 3.25 B)
- im Endoplasmatisches Retikulum und in Vakuolen der Fibroblasten in der Endomeninx (vgl. Abb. 3.30 und 3.31)
- in glialen Zellen (eventuell Astrozyten, vgl. Abb. 3.19)
- in lysosomalen Strukturen innerhalb glialer Zellen (vgl. Abb. 3.37), sowie in Makrophagen (vgl. Abb. 3.38).

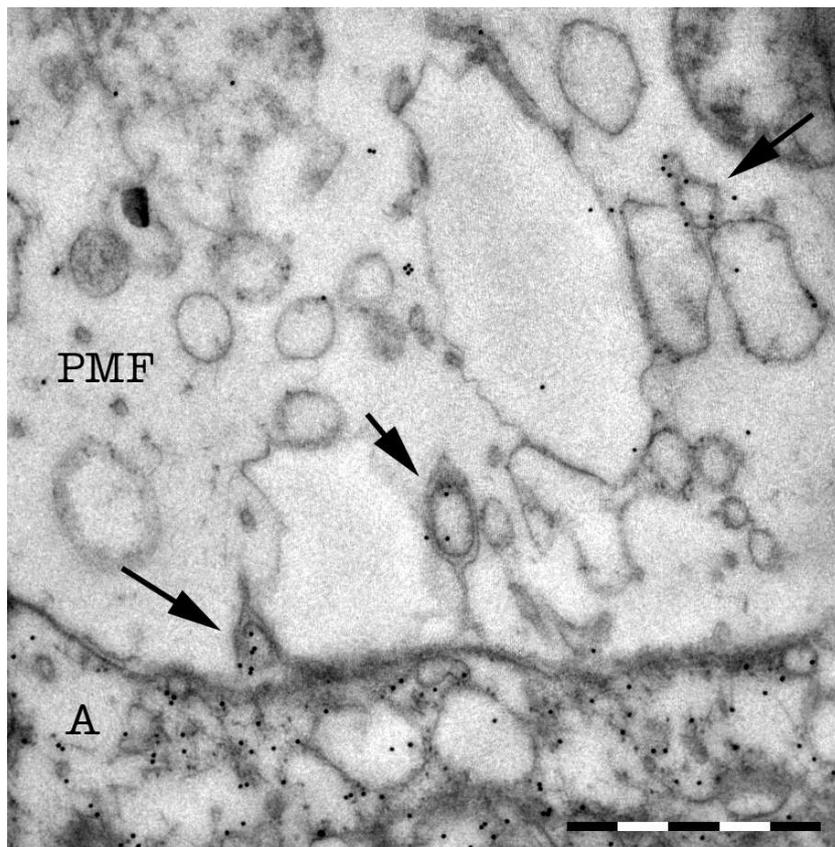


Abbildung 3.34: Exozytose (Pfeile) in den Perimeningealen Raum (PMF). Vesikel zeigen eine starke Ependymin-Markierung. Schnitt von einem Goldfisch, der das Lernkriterium erfüllt halt. A = äußere Endomeninx (Arachnoidea). MB: 1 μm .

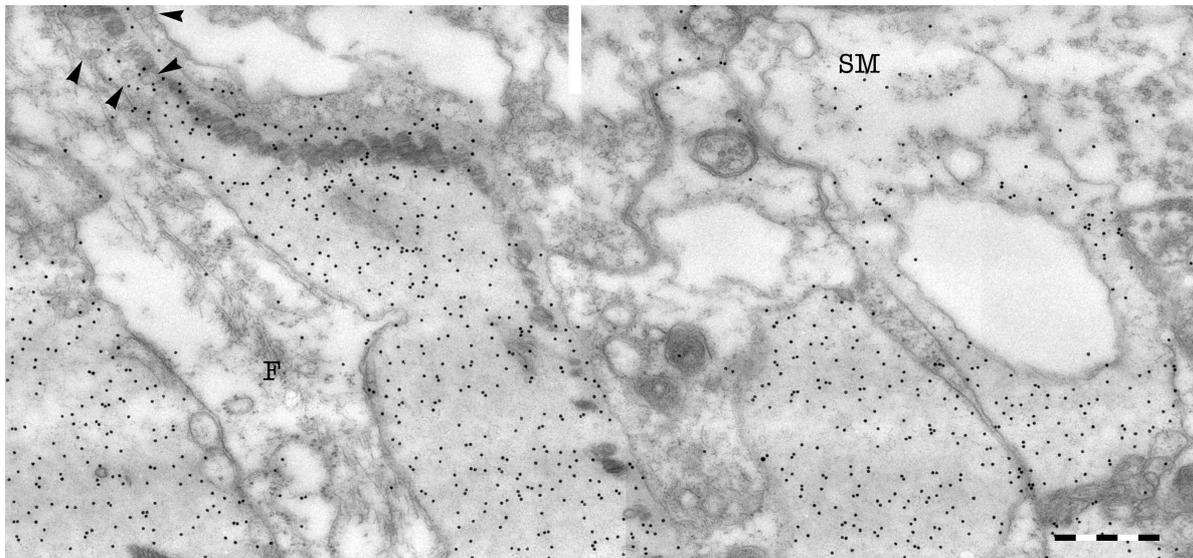


Abbildung 3.35: Ependymin-Markierung in extrazellulären Bereichen der inneren Endometrium (links) und des äußeren Stratum marginale (SM; vgl. auch Abb. 3.26 C/D). Die Basallamina wird von diskusförmigen Strukturen begleitet. Ein tangentialer Anschnitt der Basallamina ist möglich. Am oberen Bildrand sind Vesikel an der Basallamina erkennbar (Pfeilköpfe). F = Fibroblast. Doppelte Färbung (s. Kap. 3.4, Anmerkung). MB: 0,5 μm .

3.6 Auswertung der Bilder mit Hilfe des Bildanalyse-Programms *analySIS*

Da die Antigene durch die Einbettung nach dem *Post-embedding* Verfahren (s. Kap. 2.2.7) ausschließlich auf der Oberfläche der Schnitte markiert wurden, kann die Markierungsdichte ermittelt werden, indem sie ins Verhältnis zur Fläche gesetzt wird. Mit dem Bildanalyseprogramm *analySIS* lassen sich Bildbearbeitung und -auswertung über die Benutzung von sog. Makros weitgehend automatisieren. Hinsichtlich der Fragestellungen in dieser Arbeit wurden mehrere Makros geschrieben (s. Kap. 6). Die Auswirkungen der wichtigsten Makro-Befehle auf ein Bild werden in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Kontrast. Ein Grauwertbild ist aus zahlreichen unterschiedlichen Bildpunkten zusammengesetzt, die jeweils eine bestimmte Helligkeitsstufe haben. Je nach der „Tiefe“ des Bildes (8 bit bzw. 16 bit) sind dies 256 oder 65536 einzelne Abstufungen, die jeweils von reinweiß (Stufe 255 bzw. 65535) bis schwarz (Stufe 0) reicht. Da die meisten Graustufen mehrmals in einem Bild vorkommen, lässt sich in einem Koordinatensystem die Anzahl der Bildpunkte von jeder Helligkeit (Graustufe) auftragen, und man erhält damit ein so genanntes **Histogramm**. Um dabei möglichst viele Bildinformationen zu erhalten, ist man bestrebt die Grauwerte auf den zur Verfügung stehenden Grauwertbereich aufzuspreizen: Der Kontrast wird maximiert.

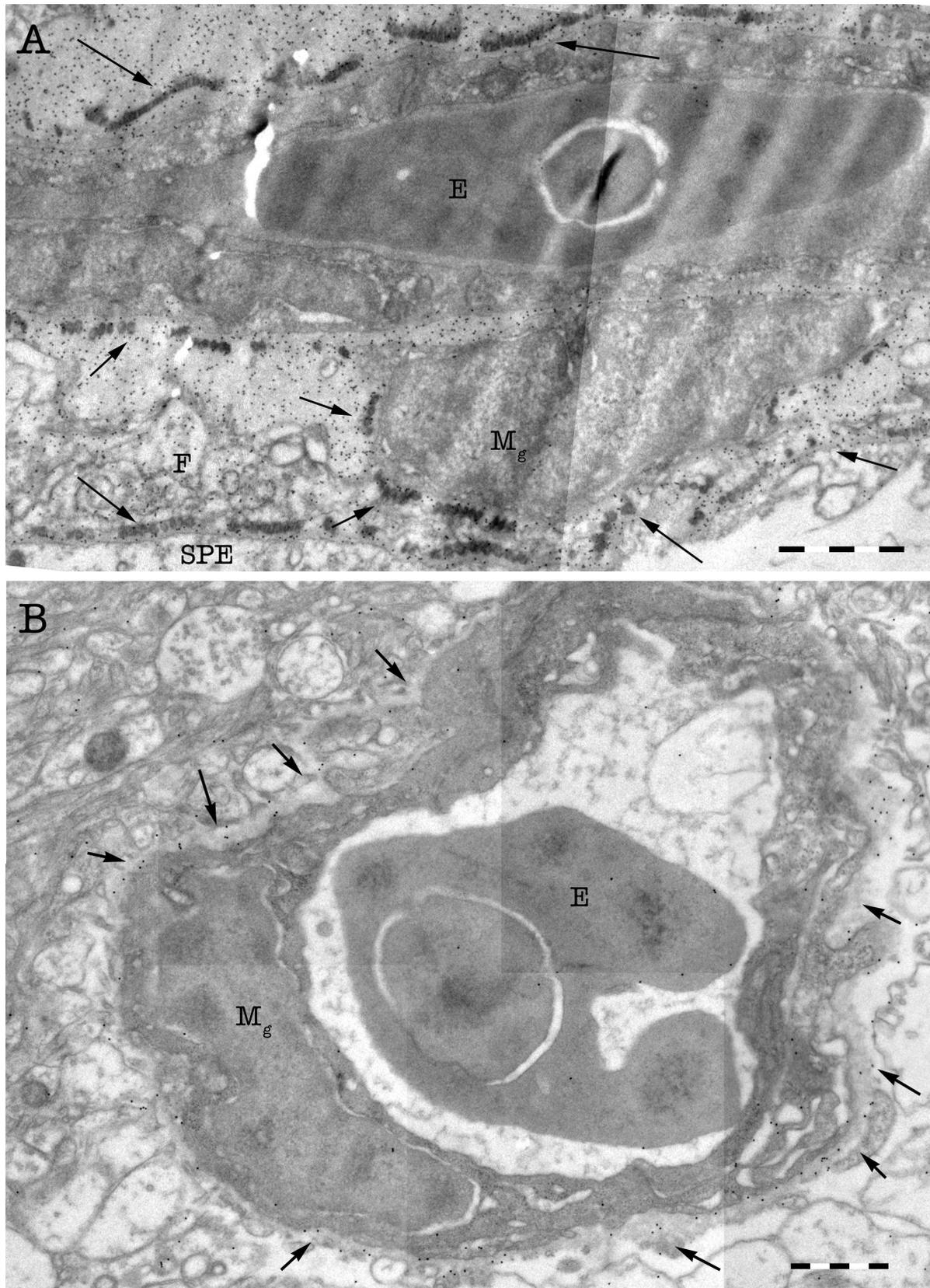


Abbildung 3.36: Ependymin-Markierung an Blutgefäßen. **A:** Blutgefäß in der inneren Endomeninx mit glatter Muskelzelle (M_g), rotes Blutkörperchen (E) mit Zellkern und umgrenzende Lamina (Pfeile). **B:** Blutgefäß im Stratum marginale. Pfeile deuten auf den perivaskulären Raum. F = Ausläufer eines Fibroblasten; SPE = subpiaale Endfüße im SM. MB A: 2 μm ; B: 1 μm .

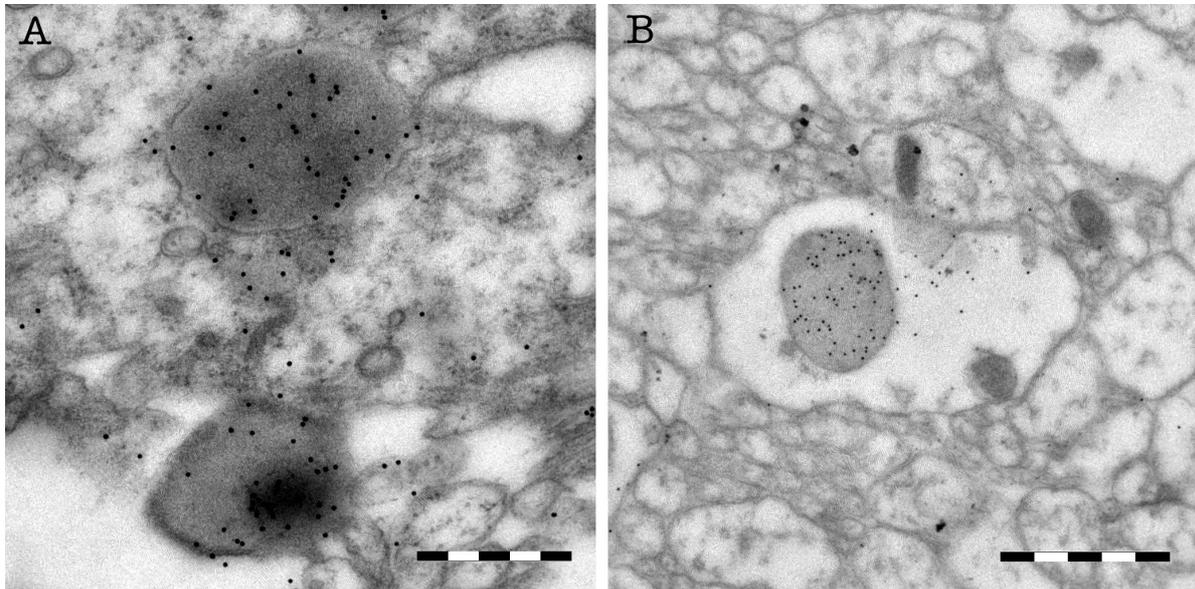


Abbildung 3.37: Ependymin-Markierung in lysosomalen Strukturen in endomeningealen Zellen der inneren Hirnhaut (**A**) und in Zellen im Stratum marginale, hier vermutlich in einer Astrozyte gezeigt (**B**). MB A: 0,5 μm ; B: 1 μm .

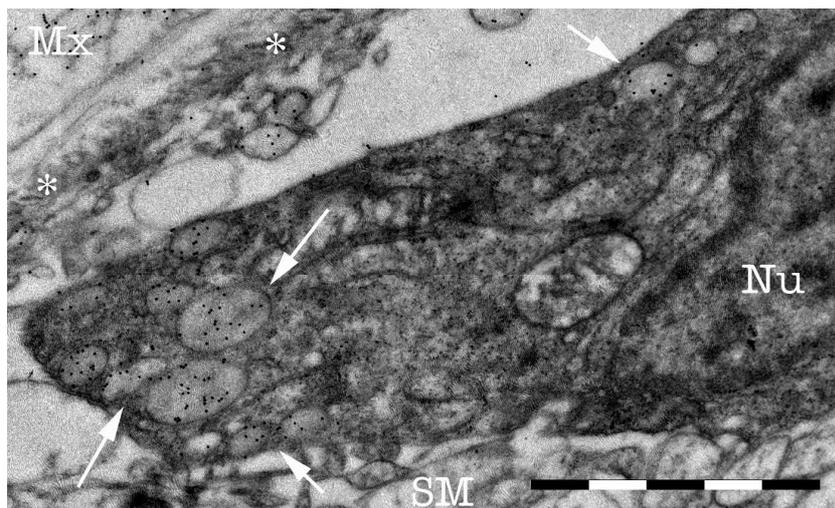


Abbildung 3.38: Makrophage im Tectum opticum. Ependymin-Markierung in Vakuolen (Pfeile). Mx = innere Hirnhaut, Nu = Zellkern, SM = Stratum marginale, * = Basallamina MB: 2 μm .

| Befehlsname | Anzeige im Makro | Auswirkung |
|-------------------------|------------------------------|--|
| Kontrast maximieren | KontrastMaximieren() | Grauwerte werden auf den größtmöglichen Bereich (65536 Helligkeitsstufen bei 16-bit-Schwarzweißbildern) gespreizt. |
| Shading-Korrektur | ShadingKorrektur() | Ungleichmäßige Bildausleuchtung wird beseitigt, sehr dunkle Strukturen werden hervorgehoben. |
| ROIs definieren | ROIsDefinieren\$() | Modul, das den Benutzer beliebige Bereiche (<i>Regions Of Interest</i>) innerhalb des Bildes auswählen lässt. |
| Filter: Mittelwert | Mittelwert() | Ersetzt den Grauwert jedes Pixels durch den mittleren Grauwert seiner Nachbarschaftspixel. |
| Filter: Trenner | Trenner() | Markiert dunkle Grauwertbereiche mit einer Linie; wird hier zum Nachzeichnen der Membranen verwendet. |
| Bildtaschenrechner | imgCalcExpression(...) | Daten zweier Bilder werden voneinander abgezogen (<code> = ODER</code>) bzw. addiert (<code>& = UND</code>). |
| Schwellenwerte setzen | GrauSchwellenwerteSetzen\$() | Festlegung der Grauwertgrenze, die dem Modul angibt, welcher Grauwertbereich zur weiteren Berechnung herangezogen werden soll. |
| Detektion | Detektieren() | Ausgewählter Grauwertbereich wird quantifiziert. |
| Partikel klassifizieren | PartikelKlassifizieren(...) | Einteilung des detektierten Grauwertbereichs (= Partikel) in Klassen nach einem geeigneten Parameter. |
| Rahmen/ROI Ergebnisse | RahmenROIErgebnisse() | Auflistung der detektierten Bereiche innerhalb des ROIs in Tabellenform. |

Tabelle 3.3: Auswirkung einiger Makro-Befehle auf die Darstellung des Bildes

Schwellenwerte. Die Setzung eines sog. Schwellenwertes ist notwendig, um eine Partikeldetektion durchführen zu können. Im Bildanalyseprogramm *analySIS* geschieht die Festlegung dieser Grenze im Histogramm unter visueller Kontrolle am Bild. Nur Grauwerte unterhalb dieser frei bestimmbaren Grenze werden zur Detektion herangezogen; Grauwerte oberhalb dieser Grenze werden ignoriert. So können gewünschte Strukturen einheitlicher Grauwerte durch individuelle Anpassung markiert werden. Das in dieser Arbeit angewandte Verfahren, an einen Antikörper gekoppeltes Gold als Partikel vom Hintergrund zu separieren, erwies sich als sehr empfindlich gegenüber der Wahl des Schwellenwertes. Diese Unzulänglichkeit der Schwellenwertsetzung wird in *analySIS* durch eine Vielzahl an Klassifikationsparametern zur Bildanalyse kompensiert.

Detektion. Detektion heißt hier eine Zählung von zuvor durch Schwellenwertsetzung markierten Bereichen. Um eventuelle Hintergrundmarkierung von der Quantifizierung auszuschließen, ist es zweckmäßig vor der eigentlichen Detektion eine weitere Grenze festzusetzen, unter derer keine Markierungen gezählt werden dürfen. In dem Programm-eigenen, vorgesehenen Feld kann diese Größe in der Einheit „Pixel“ angegeben werden. An Hand eines Eichbildes, das mit 20 nm-großen Goldpartikeln markiert wurde und dessen identischer Bildausschnitt im Transmissionselektronenmikroskop unter verschiedenen Vergrößerungen aufgenommen wurde, ist eine Formel ermittelt worden, mit deren Hilfe sich die tatsächliche Größe der Partikel in Pixel umrechnen lassen:

$$\text{Größe für 15 nm-Partikel [Pixel]} = \left(\frac{\text{Vergrößerung}}{1270} \right)^2$$

$$\text{Größe für 20 nm-Partikel [Pixel]} = \left(\frac{\text{Vergrößerung}}{845} \right)^2$$

Detektionen unterhalb dieser Zahl können keine Partikel darstellen und werden daher von vornherein ausgeschlossen. Die Praxis hat gezeigt, dass die nach dieser Formel erhaltene Pixelausschlusszahl noch einmal um etwa ein Zehntel erniedrigt werden sollte.

Klassifizierung. Bei Partikeln, die nur quantifiziert werden, wird in der Regel keine Klassifizierung benötigt. Da sich die Goldpartikel jedoch auch teils zusammenlagern, können mehrere Goldpartikel fälschlicherweise auch als ein Partikel gezählt werden. Das Programm *analySIS* hat viele Parameter, die zur Klassifizierung der als Partikel detektierten Grauwertbereiche herangezogen werden können. Unter diesen war der Parameter **Elongation** am besten geeignet (Daten nicht gezeigt). Die Klassengrenzen wurden dabei so gewählt, dass die Anzahl der zusammen gelagerten Partikel der jeweiligen Klasse entspricht. Der Parameter „Elongation“ beschreibt die Ausdehnung eines Partikels in Anlehnung des Verhältnisses von Länge zu Breite. Ein Wert von 1 beschreibt einen runden Partikel; je höher der Wert, desto länglicher ist es.

3.6.1 Ependymin an Membranen im Stratum fibrosum et griseum superficiale

Nach einer Immunogoldmarkierung sind die Goldpartikel im Neuropil nicht gleichmäßig verteilt (s. Kap. 3.3). Mit Hilfe eines selbst geschriebenen Makros (s. Kap. 6) wurden Membranen automatisiert markiert. Dieser Bildbereich „Membran“ wurde als Fläche prozentual zur Fläche des Gesamtbildes angegeben. Anschließend wurden die Partikel, die an diesen Membranen liegen, ins Verhältnis zur Gesamtanzahl der Partikel in diesem Bild gesetzt. Der Erwartungswert für diese Membranpartikel berechnet sich demnach aus dem Produkt von der Anzahl der Partikel im Gesamtbild und der prozentualen Membranfläche und beträgt bei den 16 ausgewerteten Bildern ca. 13 Partikel pro 100 Partikel.

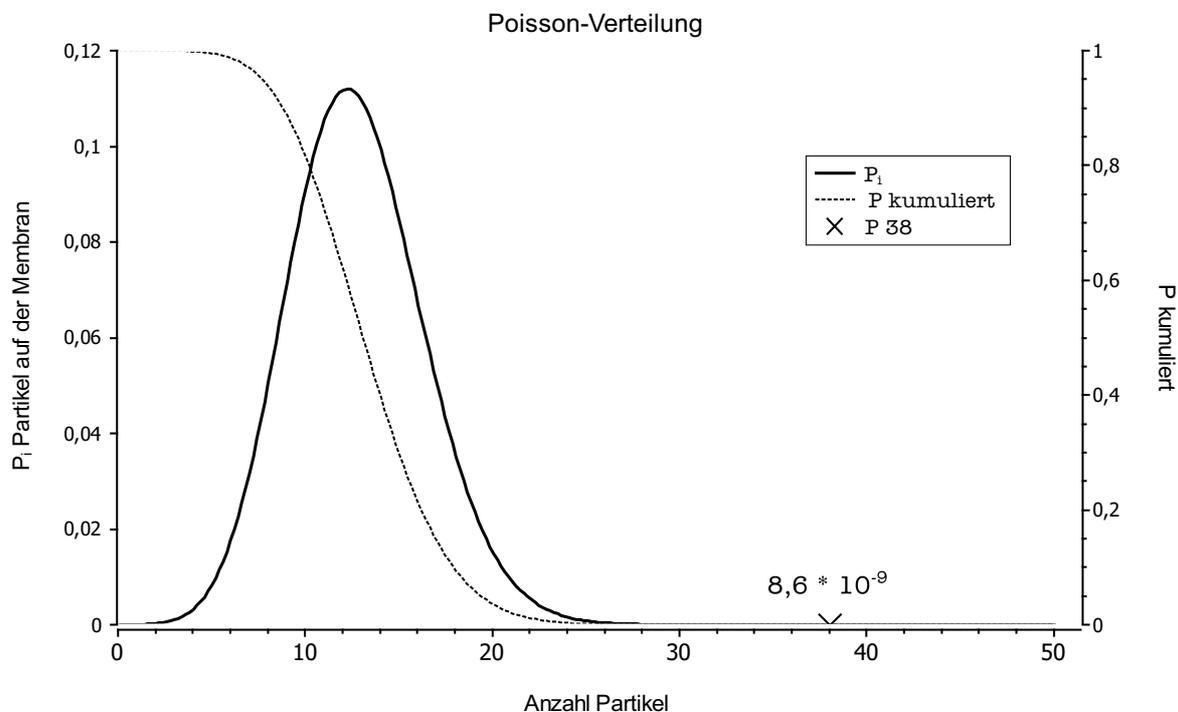


Abbildung 3.39: Poisson-Verteilung über die Wahrscheinlichkeit, wie viele Partikel auf der Membran liegen. Hohe Werte werden schnell sehr unwahrscheinlich. Normiert auf jeweils 100 Partikel (Abszisse bei 50 Partikel abgeschnitten) zeigt der Datenpunkt „38“ die durchschnittlich gezählten Partikel auf den Membranen (SEM = 13,5). Dicke Linie, linke Ordinate: Einzelwahrscheinlichkeit P_i einer jeden Partikelanzahl; gestrichelte Linie, rechte Ordinate: kumulierte Wahrscheinlichkeit; $n = 16$ Bilder; verwendetes Makro: MembranpartikelMWm.sfm.

Über eine Poisson-Verteilung wurde nun die tatsächliche Anzahl an Partikel, die auf der Membran liegen, einer statistisch über das Gesamtbild verteilten gegenübergestellt (Abb. 3.39). Am Beispiel des Stratum fibrosum et griseum superficiale zeigte sich, dass die Goldpartikel statistisch hochsignifikant ($p < 0,01$; χ^2 -Anpassungstest) in den Membranbereichen lokalisiert

sind: Ein Anteil von 38 % oder mehr an Membranpartikel würde statistisch gesehen nur in $8,6 * 10^{-9}$ % aller Fälle vorkommen. Da dieser Wert den experimentellen Durchschnitt aus 16 Einzelbildern widerspiegelt, kann eine zufallsbedingte Verteilung des Ependymins über das gesamte Stratum fibrosum et griseum superficiale verworfen werden. Die restlichen 62 % der Partikel verteilen sich meist auf größere extrazelluläre Bereiche, die einen weiten Abstand zur Membran aufweisen und daher nicht mehr als „Membranpartikel“ definiert werden (s. Kap. 6). Des Weiteren konnten tangential getroffene Membranen ebenfalls nicht erfasst werden.

3.6.2 Ependymin an S1-Terminalien im Stratum marginale

Das Stratum marginale ist reich an S1-Terminalien, Boutons unmyelinisierter Axone, die aus dem Torus longitudinalis stammen und Synapsen auf die Dornen dendritischer Schäfte von Typ-I Neuronen bilden (s. Kap. 3.5.7). An einigen dieser Synapsen (6 von 33 untersuchten) ist jeweils an der präsynaptischen Seite eine Ependymin-Markierung zu finden. Diese 13 Markierungen liegen nur etwa 20 nm vom synaptischen Spalt entfernt (vgl. z. B. Abb. 3.23 C).

Das Histogramm (Abb. 3.40) zeigt die Abstände der Goldpartikel zum synaptischen Spalt aufgeteilt in 10 Klassen mit einer Klassenbreite von jeweils 100 nm. Ein Test auf die Poisson-Verteilung hat ergeben, dass Abstände von unter 100 nm überproportional häufig vertreten sind (Daten nicht gezeigt). Ohne die 13 präsynaptischen Partikel (Abb. 3.40 - oberer Abschnitt des ersten Balkens) entsprechen die Daten hingegen einer Poisson-Verteilung. Ein Verhältnis zwischen Ependymin-positiven und -negativen Synapsen konnte nicht ermittelt werden, da die Datenerhebung, also die Auswahl der elektronenmikroskopischen Aufnahme, keinem zufälligen Muster zugrunde lag: Synapsen mit einer Ependymin-Markierung wurden sehr viel häufiger aufgenommen, als solche ohne Markierung. Des Weiteren wurde nicht überprüft, ob die Schnitte, auf denen eine Markierung an den S1-Synapsen vorhanden ist, auch allgemein eine höhere Immun-Markierung aufweisen. Daher ist keine statistisch relevante Aussage zu treffen.

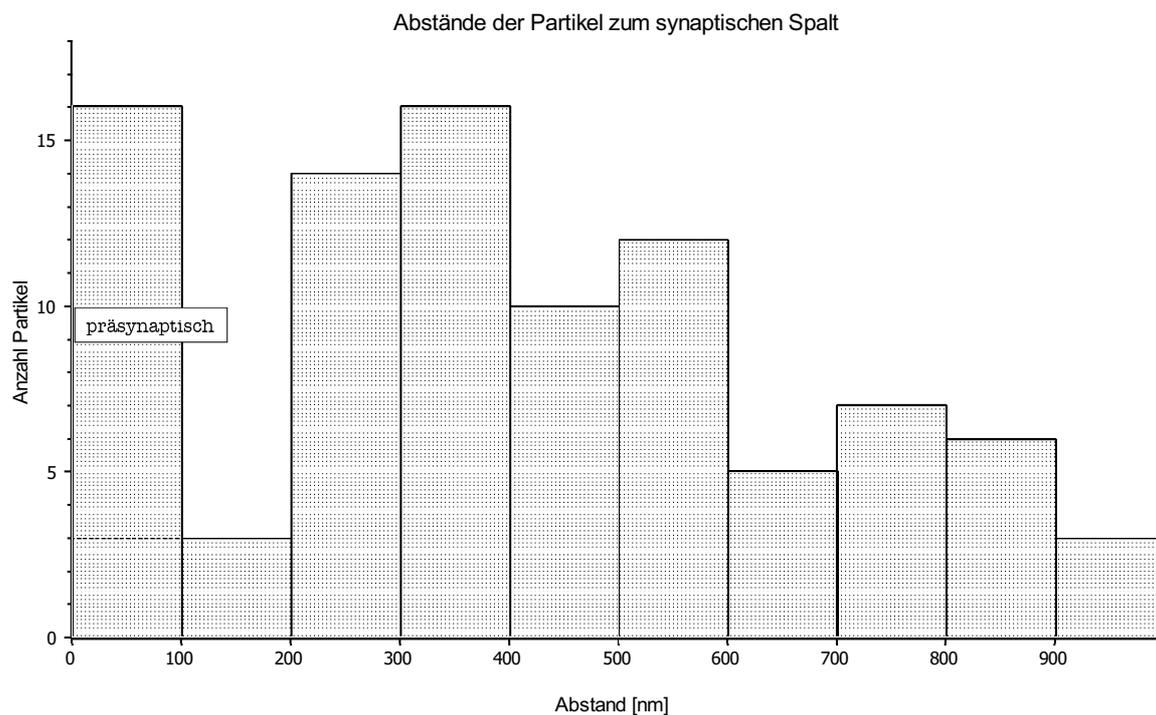


Abbildung 3.40: Histogramm über die Abstände der Goldpartikel zum synaptischen Spalt von S1-Terminalien. Mit Hilfe des Bildanalyseprogramms analySIS wurden 33 Synapsen auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen aus dem Stratum marginale vermessen: Die Abstände der jeweils 3 nächstgelegenen Goldpartikel zum synaptischen Spalt der entsprechenden Synapse wurde gemessen und in 10 Klassen aufgeteilt. Insgesamt 13 Partikel befanden sich im synaptischen Spalt von insgesamt 6 S1-Terminalien (Abschnitt oberhalb getrichelter Linie der 1. Klasse). Die 10. Klasse zeigt die Anzahl der Goldpartikel mit einer Entfernung über 900 nm. Näheres siehe Text.

4 Diskussion

4.1 Die Dressur von Goldfischen

Nach Idee der vorliegenden Dissertation sollen biochemische Änderungen im Gehirn nach Lernvorgängen auf elektronenmikroskopischer Ebene über ein Nachweissystem dargestellt werden. Dazu wurde in einem möglichst einfach gestalteten Experiment eine Versuchgruppe einer Kontrollgruppe gegenübergestellt: Goldfische, die nach einem gewählten Parameter ein Lernkriterium in drei unabhängigen Versuchsanordnungen erreichen, können von solchen, die dieses nicht erreichen, getrennt werden. Die Ergebnisse haben unerwarteterweise gezeigt, dass nach den bisher verwendeten Lernkriterien so gut wie keine „Lerner“ erhalten werden konnten (vgl. Abb. 3.5). Die möglichen Ursachen dazu werden im Anschluss erörtert. Dennoch konnte die Synthese und Verteilung des Ependymins nach Lernversuchen gezeigt werden: In einer Serie elektronenmikroskopischer Abbildungen (s. Kap. 3.5) wurde im laminar aufgebauten Tectum opticum, dem wichtigsten neuronalen Koordinations- und Integrationszentrums bei Fischen [MEEK 1983], das Vorkommen des Ependymins besonders an extrazellulären Bereichen gezeigt. Statistische Analysen unterstützen das Vorkommen des Ependymins vorwiegend an Membranen, jedoch nicht bevorzugt an neuronalen Synapsen (s. Kap. 3.6). Die Gründe für die gefundenen Ergebnisse werden nachfolgend beschrieben.

4.1.1 Das Verhalten des Goldfisches in der Wechselkammer

Ein Großteil der Trainingsversuche wurde als aktive aversive Vermeidungskonditionierung mit einem Lichtreiz als konditioniertem Stimulus in einer Wechselkammer (s. Kap. 2.2.3) durchgeführt, da Goldfische eine gute räumliche Koordination besitzen [RODRIGUEZ *et al.* 1994] und sehr gut sehen können [PORALLA & NEUMEYER 2006].

Goldfische zeigen als Gruppe einen eher schwachen Schwarmzusammenhalt [KAVALIERS 1981]; individuelle Verhaltensmuster treten daher bei jedem Einzeltier auf [HERTER 1948]: Solche, die sich im Verband als aktiv zeigten und eine Art von Leitposition übernahmen [KÖHLER 1976], können im Versuch von anderen isoliert teilnahmslos sein und kein einziges Mal über die Barriere schwimmen [LAUDIEN *et al.* 1986]. Möglicherweise kann als natürliche Entsprechung zum Stromreiz ein elektrischer Fisch als Feind dienen, bei dessen Anwesenheit sich ein Fisch wahrscheinlich tot stellen würde [BRAY & HIXON 1978]. Andere Fische zeigen ein gegenteiliges Verhaltensmuster und schwimmen innerhalb eines Zyklus' mehrmals über die Barriere. Diese Hyperaktivität kann als Ausdruck von Nervosität und Stress [VON FRISCH 1942] durch die Loslösung aus dem Schwarmverband gedeutet werden. Viele Fische sind sehr

interessiert ihrem Spiegelbild zugewandt und sehen in ihm offenbar einen Artgenossen, der ihm Schmerzen zufügt. Bei Sauerstoffarmut oder der Verwendung von Leitungswasser ohne Zusatz von Natriumchlorid [LAHLOU *et al.* 1969; BERNARDS 1972] zeigen sich die Fische ebenfalls sehr agil und knabbern während der Dressur häufig an den Plattenelektroden. RITTER [2010] beobachtete eine erhöhte Atemfrequenz, wenn das Aquarienwasser nicht vor erneutem Training ausgetauscht wurde. Bei Sauerstoff-gesättigtem Wasser sind die Goldfische ruhiger und wirken neugieriger, allerdings ohne dass sich ihr Verhalten auf den Lernerfolg auswirkt. Im Gegensatz zu LAUDIEN *et al.* [1986] wurde bei dem Wechselkammer-Training darauf verzichtet, besonders inaktive und hyperaktive Tiere vom Versuch auszuschließen. Eine weitere Gruppe von Goldfischen zeigt zuerst keine Reaktion, gegen Ende des Versuchs aber beginnen sie zu fliehen und zu vermeiden. Diese Goldfische haben im Vergleich zu untrainierten Kontrollfischen in *in situ* Experimenten die höchste Zunahme an Ependymin ergeben [SCHMIDT *et al.* 1992] und werden als konditioniert bezeichnet, wenn sie das Lernkriterium (s. Kap. 2.2.3) erfüllen. Es erweckt auch den Anschein, dass die Goldfische eine unterschiedliche Reizschwelle bei gleicher Stromstärke besitzen, da bei nicht wenigen Ermüdungserscheinungen beobachtet werden können. Diese könnten durch geringe Mengen von Chlor verursacht werden, das durch Elektrolyse von Natriumchlorid während des Trainings erfolgt. Ebenso kann eine passive Stressbewältigung in Form von Ausharren im Stromreiz erfolgen [ØVERLI *et al.* 2002]. Auch die Jahreszeit [SHASHOUA 1973; FJERDINGSTAD & SHASHOUA 1974], die Wassertemperatur [HUNTER & WISBY 1964] und das Alter der Fische [SHASHOUA 1976B] scheint eine Rolle zu spielen. Schließlich gibt es auch solche Tiere, die eine Seite der Wechselkammer zu bevorzugen scheinen [HERTER 1948]. Daher ist eine vereinheitlichende Wertung von individuellem Verhalten immer schwierig [HERTER 1948], und nur eine entsprechend hohe Anzahl an Dressuren kann eine genügende statistische Sicherheit bieten (s. Kap. 4.1.4).

4.1.2 Vergleichende Betrachtung der Dressuren

In dieser Arbeit wurden insgesamt 126 Fische in der Wechselkammer trainiert (s. Kap. 3.2.1). David Zollt trainierte 250, G. Münzner 60 und S. Ritter 108 Goldfische in der Wechselkammer [persönliche Mitteilungen]. Zusammen sind dies 544 Fische, die seit 2003 nachweislich in der Wechselkammer trainiert worden sind. Davon konnten zusammen nur 24 Fische (4,4 %) als konditioniert („Lerner“) nach dem gegebenen Kriterium (s. Kap. 2.2.3) klassifiziert werden.

Ein Blick auf den **geschichtlichen Fortgang** der aversiven Vermeidungskonditionierung in der Wechselkammer ist aufschlussreich: In den Jahren 1962 bis 1968 zeigten sich Goldfische in der Wechselkammer bei einem aversiven Vermeidungstraining als nahezu fehlerlos [BEHREND & BITTERMAN 1962; SAVAGE 1968]. Zwanzig Jahre später trainierte PIRONT in der Wechselkammer insgesamt ca. 1000 Goldfische [persönliche Mitteilung R. Schmidt] und erhielt ca. 440 Fische, die innerhalb von zehn Fällen acht Mal die richtige Verhaltensantwort zeigen [PIRONT & SCHMIDT 1988]. ROTHER [1992] hat eine unbekannte Ausbeute von „Lernen“, die nicht getestet wurden. Die Fische wurden jeweils bei einer lokalen Tierhandlung bestellt [persönliche Mitteilung M.-L. Piront-Sonntag] und in dem Prototyp der Wechselkammer dressiert, dessen

Reizfrequenz doppelt so hoch ist, wie bei den im Folgenden verwendeten Wechselkammern (s. Kap. 2.2.3). In diesem Zusammenhang sind die Versuche von MCGAUGH [1966] von Interesse, bei denen gezeigt wurde, dass die Schocklänge (nicht die Reizhöhe!) einen entscheidenden Einfluss auf die elektrophysiologische Aktivität des Gehirns bei Mäusen hat. HOLTMANN [2002] hat eine neue Dressurform in unserem Institut aufgebaut, eine operante Belohnungsdressur (s. Kap. 2.2.3). Er erzielte mit 55 % eine hohe Ausbeute an „Lernern“; jedoch ist deren ermittelte Menge an Ependymin gegenüber den Kontrollen nur gering erhöht. Die Höhe der Belohnung spielt bei Goldfischen dabei kaum eine Rolle [MACKINTOSH 1971]. MÜNZNER hatte die von SHASHOUA [1968] etablierte vestibulo-motorische Dressur durchgeführt, aus der 23 % „Lerner“ hervorgingen [MÜNZNER 2007].

Dieses sog. **Floßtraining** wurde aufgrund zweier Gründe nur zu Vergleichszwecken in dieser Arbeit durchgeführt: Zum einen hat das richtige Verhältnis von der Größe des Polystyrol-Blöckchens zur Fischgröße eine beträchtliche Bedeutung [SHASHOUA 1977B], denn zu kleine Blöckchen verändern das Schwimmverhalten nur minimal, während bei zu großen Blöckchen die Fische erst gar keine Chance haben, das Lernparadigma zu beherrschen [SHASHOUA 1970]. Eine entsprechende Kontrolle zu finden, die zeigt, dass ein Goldfisch definierter Größe bei entsprechender „Floßgröße“ immer eine gewisse Chance habe, das Lernparadigma zu beherrschen, kann nur aus einer Vielzahl an Testdressuren errechnet werden und berücksichtigt dabei noch keine individuellen Anpassungspotentiale der einzelnen Fische.

Zum anderen werden beim Erlernen eines neuen Schwimmmodus' andere **Gehirnregionen** aktiviert als bei dem auf einen optischen Reiz basierenden Wechselkammer-Training: Das Tectum opticum, dessen aus der Netzhaut einlaufende Axone hauptsächlich im Stratum opticum und Stratum fibrosum et griseum superficiale enden [VANEGAS *et al.* 1974], und das über nikotinisch-cholinerge Rezeptoren visuelle Informationen verarbeitet [SCHMIDT & FREEMAN 1980], ist unter anderem für die Koordinierung von Augen- und Körperbewegungen [AL-AKEL *et al.* 1986] sowie für Fluchtverhalten [HERRERO *et al.* 1998] verantwortlich. Vom Tectum opticum über mehrere Kerne innerviert [LUITEN 1981], hat für die Steuerung von Bewegungen das Tegmentum eine dominierende Rolle im zentralen Nervensystem [WULLIMANN *et al.* 1996], das die Information über seinen rostralen Bereich wieder zurück auf das Tectum opticum überträgt [GROVER & SHARMA 1981]. Bei der vestibulo-motorischen Dressur ist ebenfalls die Schwimmblase betroffen, daher ist ein experimenteller Vergleich des Nervus vagus bzw. der Vagus-Kerne sinnvoll, die an der Anpassung der Schwimmblase involviert sind [SCHWERTE *et al.* 1997]. Auch die für den Gleichgewichtssinn verantwortlichen Kerne des Nervus octavus, die zum Rückenmark leiten [BECKER *et al.* 1997], spielen beim „Floßtraining“ eine Rolle [BERNSTEIN 1964]. BENOWITZ & SHASHOUA [1977] konnten eine hohe Ependymin-Konzentration in der Ependymalen Zone des verlängerten Marks, der Vagus-Kerne, des dorsalen Tegmentums und des Tectum opticum bei untrainierten Fischen darstellen. Eine vergleichbare Ependymin-Verteilung ergab sich nach der vestibulo-motorischen Dressur [SHASHOUA 1985], die kürzlich auch von MÜNZNER [2007] im Tectum opticum bestätigt worden ist. Im Gegensatz zur letztgenannten Arbeit konnte mit der hier angewendeten Methode (s. Kap.

2.2.7) *keine* Ependymin-Markierung an den periventrikulären Neuronen (s. Kap. 3.5.2) nachgewiesen werden, obwohl diese maßgeblich an der Verarbeitung visueller Information beteiligt sind [O'BENAR 1976; KINOSHITA & ITO 2006]. Abgesehen davon konnten Goldfische, deren Fähigkeit mit dem Polystyrol-Floß zu schwimmen durch doppelte Ependymin-Antikörpergabe für zehn Tage blockiert wurde (also unfähig waren, sich sowohl an das Verhalten zu erinnern als auch es neu zu erlernen), ohne Probleme im Vermeidungstraining konditioniert werden [SHASHOUA 1985]. Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse je nach angewandeter Trainingsart erscheint daher eine getrennte Betrachtungsweise im Hinblick auf die Ependymin-Verteilung im Gehirn von Goldfischen sinnvoll.

4.1.3 Ependymin-Synthese nach der Dressur

Der Zeitpunkt des Lernens während der Dressur gibt hierbei Aufschluss auf die **Neu-Synthese** von Ependymin. Tiere, die sofort den konditionierten Reiz mieden, können nichts Neues gelernt haben. Goldfische, die erst gegen Ende der Dressur das Lernkriterium erreicht haben, zeigen hingegen eine starke Erhöhung der Ependymin-Konzentration [persönliche Mitteilung R. Schmidt]. Von Interesse ist es hierbei, den Zeitpunkt zu finden, wann eine Konditionierung stattfindet und ein Vermeiden nicht mehr das Resultat einer ausgeprägten Rotscheu ist. Aufschlussreich ist dazu das Trainingsergebnis eines ehemals aus der Farbdressur (s. Kap. 2.2.3) als Nichtlerner hervorgegangener Goldfisch: Aus dem erstmaligen Training in der Wechselkammer als „Lerner“ nach 17 Zyklen hervorgegangen, konnte sich der Fisch im Test drei Tage später nicht mehr an das neu erlernte Verhalten erinnern (s. Kap. 3.2.1). ZOLLT [2009] hat dieses Vergessen ebenfalls bei seinen „Lernern“ festgestellt, so dass die Grenze, wann ein Fisch als Aktiver Nichtlerner gezählt werden sollte, wahrscheinlich zu eng gesetzt wurde [PIRONT & SCHMIDT 1988]. ZOLLT [2009] zeigt ferner, dass die Goldfische, die als Nichtlerner aus dem Wechselkammer-Training hervorgegangen sind, ein höheres Signal nach einer *in situ* Hybridisierung haben als die „Lerner“. ROTHER *et al.* [1995] zeigen im Gegensatz dazu in der Meninx bei konditionierten Fischen ein höheres Signal als bei untrainierten. Autoradiografische Bilder von Nichtlernern wurden jedoch nicht gezeigt. Die Region mit der höchsten Ependyminsynthese befindet sich an den Einsenkungen der Hirnhaut (Cavum cranii) [KÖNIGSTORFER *et al.* 1990; ROTHER *et al.* 1995; SCHMIDT 1995]. Quantifizierungen autoradiographischer Signale am Cavum cranii wurden nicht durchgeführt, vermutlich weil das Waschen der auf Objektträger aufgezogenen Gewebeschnitten mit scharfen Lösungen ein Gewebeverlust zur Folge haben kann [ROTHER 1992], der entsprechend Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Sondendetektion hat, wie auch eigene Erfahrungen an der Immun-Markierung zeigen (s. Kap. 3.4, Anmerkung).

ROTHER [1992] und ROTHER *et al.* [1995] haben dargelegt, dass eine erhöhte Ependymin-Synthese nur bei solchen Fischen erfolgt, die das Lernkriterium erreicht haben. Bei Kontrollfischen zeigt sich dagegen i. d. R. keine Erhöhung der Synthese. Man beachte jedoch, dass ein Vergleich zwischen „Lernern“, deren Training nach bereits 20 Zyklen abgebrochen wurde, gegenüber von Nichtlernern, welche die doppelte Zeit in der Wechselkammer verbrachten, nur

bedingt aussagekräftig ist. Es wäre demnach auch möglich, dass die Dauer, die ein Goldfisch in der Wechselkammer verbringt, die Synthese von Ependymin aktiviert, unabhängig davon, wann er über die Barriere schwimmt. So wurde gefunden, dass Isolation [LAUDIEN *et al.* 1986], eine neue Situation [BEYER 1976] und ein Schockreiz in der Wechselkammer [DENZER & LAUDIEN 1987] dem Goldfisch Stress verursacht, der auch zu morphologischen Veränderungen an dendritischen Dornen von tektalen Interneuronen führen kann [COSS & GLOBUS 1978]. DAVIS & AGRANOFF [1966] haben ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Stress und Verweildauer in der Wechselkammer festgestellt: Die Empfindlichkeit gegenüber dem Proteinbiosynthese-Hemmer Puromycin [AGRANOFF & KLINGER 1964] wird verlängert, wenn der Goldfisch noch eine Stunde nach der Dressur in der Wechselkammer verbleibt. Ebenso hat das **Alter** der Goldfische Einfluss auf die Dressur, das SHASHOUA [1985] im Zusammenhang mit einem erhöhten Stresslevel sieht: Goldfische, die älter als ein Jahr sind, verhalten sich drei Tage später wie naive Tiere und weisen nach der Dressur auch keine Änderungen in ihrer Proteinzusammensetzung im Gehirn auf [SHASHOUA 1976A]. Über das Alter der hier verwendeten Fische ist nichts bekannt.

4.1.4 Wann sind Goldfische konditioniert?

Die Goldfische lernen sehr schnell sich im elektrischen Feld optimal auszurichten und zeigen wenige Sekunden vor dem Schockreiz Formen der Erregung [SHASHOUA 1988-89]. Ebenso ist nach Sensibilisierung auf den Schockreiz die Reaktion auf einen Lichtreiz besser [SGONINA 1939]. In dieser Arbeit können die Goldfische jedoch die Endbedingung für den Lernerfolg, innerhalb von zehn Zyklen acht Mal zu vermeiden, nicht mehr erreichen. Da die Entscheidung, wann ein Fisch gelernt hat aus praktischen Gründen erwogen wurde (Versuchs- und Vergleichsgruppe sollen in etwa gleich groß sein), soll die Frage gestellt werden, wann der Fisch ein Verhaltensmuster zeigt, dass sich signifikant von der Grundwahrscheinlichkeit zufälliger Überquerungen abhebt. Mit welcher Wahrscheinlichkeit überquert also ein Fisch zufällig in einem Zyklus die Barriere innerhalb der ersten 20 Sekunden? Die Wahrscheinlichkeit für solch eine einzelne Überquerung beträgt 4,6 %, was eine Messung von 22 Goldfischen ohne Reizsignal in drei unabhängigen Testserien ergeben hat (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe der Binomial-Verteilung ergibt sich, dass vier von zehn Überquerungen innerhalb der ersten 20 Sekunden bereits eine Wahrscheinlichkeit von lediglich 0,08 % haben. Goldfische könne man daher bereits als konditioniert bezeichnen, wenn sie bereits nach vier innerhalb von zehn Zyklen den Stromreiz vermieden haben ($p < 0.001$). Die zuvor angewendete Endbedingung „acht von zehn Zyklen“ [PIRONT & SCHMIDT 1988] erscheint als zu hoch angesetzt.

4.2 Vorkommen des Ependymins im Tectum opticum

In vorangegangenen Studien an Goldfischen wurden Ependymine mit Antikörpern [BENOWITZ & SHASHOUA 1977; THORMODSSON *et al.* 1992A; LAKOS *et al.* 1994] oder mit radioaktiver Markierung [BENOWITZ & LEWIS 1983; SCHMIDT & LAPP 1987] in vielen verschiedenen

Gehirngebieten gefunden. In dieser Dissertation wurde ausschließlich das Tectum opticum untersucht, das als visuelles Verarbeitungszentrum bei Fischen gilt [WULLIMANN *et al.* 1996].

Die beschriebene Verteilung der Ependymin-Markierungen im Tectum opticum (s. Kap. 3.5) unterscheidet sich zum Teil stark von der dargestellten Verteilung anderer Autoren (z. B. ROTHER 1992; MÜNZNER 2007). Der Grund kann zum einen an dem verwendeten Verfahren zur Einbettung des Gewebes liegen: Im Gegensatz zu dem sog. *Pre-embedding* werden bei dem hier verwendeten *Post-embedding* (s. Kap. 2.2.7) die Antigene erst dann mit Antikörpern markiert, nachdem sie im Harz eingebettet worden sind. Die Markierung mit den Immunogoldpartikeln erfolgt daher nicht durch die gesamte Schnittdicke des Gewebes, sondern auf der (angerauten) Oberfläche [STIRLING 1990]. Zum anderen wurde in dieser Arbeit erstmals eine niedrigere Antikörperkonzentration (1:1000-Verdünnung des Originalserums) basierend auf den Ergebnissen von Vorversuchen (s. Kap. 3.3) verwendet.

4.2.1 Ependymin in der inneren Endomeninx

In der inneren Endomeninx (Hirnhaut) liegt das Ependymin sowohl extrazellulär als auch intrazellulär vor (s. Kap. 3.5.8). Die Fibroblasten sind an der Sekretion von Molekülen in den extrazellulären Raum beteiligt [HOFFMANN & SCHWARZ 1996] und haben daher ein gut ausgebildetes granuläres Endoplasmatisches Retikulum (ER) [MOVAT & FERNANDO 1962]. Im Inneren des ER findet eine Markierung mit dem anti-Ependymin Antikörper statt (vgl. Abb. 3.30). Die Ependymin-Markierungen konzentrieren sich im ER der Fibroblasten, das sich zunehmend aufweitet und große Blasen bzw. Vakuolen bildet (vgl. Abb. 3.31). Verbindungen dieser Vakuolen zu den ursprünglichen schmalen Ringstrukturen des ER sind sichtbar (Pfeile in Abb. 3.31 C/D). Solch geweitete ER bzw. Vakuolen sind bereits von MAJOCHA *et al.* [1982] und LAKOS *et al.* [1994] beschrieben bzw. gezeigt worden [OLSEN & PROCKOP 1974; WANG *et al.* 1995].

Diese mit dem Fibroblasten verbundenen Vakuolen (vgl. Abb. 3.32) zeugen von einer **apokrinen** und **holokrinen** Sekretion [STINSON *et al.* 1974], bei der sich zunächst kleinere Mengen von Zytoplasma abspalten (apokrin), während sich die Zellmembran regeneriert. Schließlich löst sich der Fibroblast als Ganzes auf (holokrin), was von einer strukturellen Änderung vieler Zellorganellen eingeleitet und begleitet wird [STINSON *et al.* 1974]. Apokrine bzw. holokrine Sekretionen sind bekannt von sekretorischen Zellen, die große Mengen an synthetisiertem Produkt auf einmal entlassen [METKA & NADA 1992; SCHNEIDER & PAUS 2010]. Die hohe Konzentration des Ependymins im Gehirn der Fische [SCHMIDT & SHASHOUA 1981] würde diesem Sekretionsweg entsprechen. Eine apokrine Sekretion von Ependyminen wurde bereits von SCHMIDT *et al.* [1990] und LAKOS *et al.* [1994] angesprochen.

Die großräumigen Vakuolen der Fibroblasten enthalten anteilmäßig die größte Menge an intrazellulärem Ependymin (s. Kap. 3.5.9). Wenn bei der Fixierung die Kalzium-Ionen nicht weggefangen wurden (s. Kap. 3.4), wird sogar eine signifikant höhere Ependymin-Konzentration gefunden. Da Kalzium die Zellmembranen stabilisiert [MANERY 1966], kann die Fixierungslösung

nicht so schnell in die Zellen eindringen, so dass sich die Proteine möglicherweise vor ihrer Fixierung zersetzen [SRINIVASAN *et al.* 2002].

Nach Anreicherung in den Fibroblasten der inneren Hirnhaut wird das Ependymin in den **extrazellulären Raum** der inneren Hirnhaut abgegeben, so dass die Glykoproteine frei in der inneren Hirnhaut vorliegen (vgl. Abb. 3.35, linke Bildhälfte). Die Ependymine sammeln sich vorwiegend an der Basallamina (vgl. Abb. 3.28 B/C). Da Laminin in die Basallamina integriert ist [YURCHENCO *et al.* 1992], kann das HNK-1 Epitop der Goldfisch-Ependymine daran binden [MOHAN *et al.* 1990]. Wegen Fehlen dieses Epitops bei den Ependyminen der Regenbogenforelle [GANSS & HOFFMANN 1993], konnten SCHWARZ *et al.* [1993] eine nur unbedeutende Ependymin-Markierung an der Basallamina zeigen. Die Autoren berichten dagegen eine Bindung an Kollagenfibrillen [SCHWARZ *et al.* 1993], die in dieser Arbeit nicht gefunden werden konnte.

4.2.2 Sekretion aus der inneren Endomeninx

Es gibt Gründe, die für einen pinozytotischen Transport des Ependymins über die Basallamina hinweg sprechen, der bereits von LAKOS *et al.* [1994] angesprochen wurde. Zum einen können viele Immunogold-markierte Vesikel um die Basallamina auf der Neuropil-zugewandten Seite beobachtet werden (vgl. Abb. 3.28, 3.29), die auf eine spezifische Liganden-Rezeptor-Beziehung hinweisen, wenn das Goldfisch-Ependymin über das HNK-1 Epitop an die G2-Domäne des Laminins [HALL *et al.* 1997] bindet. Zum anderen zeigen sich membranöse Zotten an der Basallamina auf der Seite der inneren Hirnhaut (vgl. Abb. 3.28 B/D), die sich altersbedingt anreichern und dieselbe Dicke wie die Basallamina aufweisen [WANG *et al.* 1995]. Solche Zotten werden als Überbleibsel von unvollständiger Sekretion verstanden [STEIN & LUZIO 1991] und weisen ultrastrukturelle Übereinstimmungen mit sog. *surfactant-like* Körperchen anderer sekretorisch tätiger Gewebe auf [YAMASHIMA *et al.* 1990].

Das Vorkommen des Ependymins im **Perimeningealen Raum** wird kontrovers diskutiert. HOFFMANN [1992] beschreibt bei Fischen keine offene Verbindung zwischen diesem und der Zerebrospinalflüssigkeit, so dass das Vorkommen des Ependymins durch eine Transzytose über die intermediäre Zellschicht hinweg (vgl. dazu Abb. 3.33 A) oder durch Ependymin-Synthese in der äußeren Endomeninx erklärt wird, die bei Goldfischen ebenfalls Merkmale sekretorischer Zellen zeigen [persönliche Mitteilung H. J. Caruncho]. Eigene Versuche zeigen pinozytische Vesikel, die sich von der äußeren endomeningealen Schicht abschnüren und eine starke Ependymin-Markierung aufweisen (Abb. 3.34, Pfeile). SHASHOUA [1981] hingegen beschreibt eine offene Verbindung zwischen beiden Räumen, so dass die Ependymine frei zwischen Perimeningealen Raum und Zerebrospinalflüssigkeit zirkulieren.

4.2.3 Ependymin in der Extrazellulärflüssigkeit

Nach dem vesikulären Transport können die Ependymine in die Extrazellulärflüssigkeit (ECF) des Stratum marginale abgesondert werden. Findet die Synthese der Ependymine in den Bereichen der inneren Hirnhaut statt, die in den Optischen Ventrikel eingesenkt sind (Cavum

cranii; s. Kap. 4.2.1), so werden die Glykoproteine über das faserfreie Velum anticum [FRANZ 1912] in die **Zerebrospinalflüssigkeit** (CSF) sezerniert. Von dort gelangen die Ependymine über die Ependymale Zone des Tectum opticum in die ECF des Neuropils (vgl. Abb. 3.10).

Das Vorkommen hauptsächlich an den Membranen (vgl. Abb. 3.19, 3.20 D) lässt auf ein extrazelluläres Vorkommen schließen. Inwiefern die Ependymine an den Membranen gebunden, frei an den Membranen anliegend (intra- oder extramembranär) oder gebunden in der Extrazellulären Matrix [SCHWARZ *et al.* 1993; HYNES 2009] vorliegen, lässt sich mit der angewandten Methode (s. Kap. 2.2.7) nicht bestimmen: Der Komplex aus Antigen, den beiden über ihre Fab-Fragmente gebundenen Antikörpern (s. Kap. 2.1.4) und dem am Fc-Fragment über eine Zittrathülle konjugierten Immunogoldpartikel [persönliche Mitteilung D. Herbert, BBI] hat eine Ausdehnung von ca. 40 nm [HARRIS *et al.* 1997], wenn die Membranen senkrecht zur Schnittebene getroffen wurden. Eine auffällige Präferenz der Markierung zwischen den verschiedenen Membran-Arten (Axon, Synapsen, Dendriten, Glia-Zellen) konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Die Verankerung des Ependymins in die Membran erfolgt dabei vermutlich über eine Fettsäure, die kovalent an die Aminosäurekette der Ependymine gebunden werden kann, wie genetische Studien darlegen [SUÁREZ-CASTILLO & GARCÍA-ARRARÁS 2007].

Ebenso findet sich Ependymin an spezialisierten Membranen wie die der Myelin-Scheiden der Oligodendrozyten (vgl. Abb. 3.22 D) oder den **Synapsen**. So konnte von insgesamt 331 untersuchten Schnitten aus 53 Probenblöcken an sechs **S1-Synapsen** im Stratum marginale eine Ependymin-Markierung nachgewiesen werden (s. Kap. 3.6.2). Synapsen in anderen Schichten des Tectum opticum waren ausnahmslos ohne Markierung. SHASHOUA [1988-89] schlug ein Modell vor, bei dem sich die Ependymine in postsynaptischen Dornen einlagern und ausfallen. Elektronenmikroskopische Bilder sollten dies am Hippocampus der Ratte belegen [SHASHOUA 1991]. Eigene Untersuchungen zeigen jedoch an allen Ependymin-markierten Synapsen Goldpartikel an der *präsynaptischen* Seite der Membran (vgl. Abb. 3.24).

4.2.4 Regenerationsbedingte Anlagerung

Mehrere Studien am Optischen Nerv haben gezeigt, dass Ependymin an Regenerationsvorgängen beteiligt ist [BENOWITZ & LEWIS 1983; SCHMIDT & SHASHOUA 1988; THORMODSSON *et al.* 1988; SCHMIDT *et al.* 1991; THORMODSSON *et al.* 1992A]. Seine Wirkungsweise geht vermutlich über die Interaktion mit Laminin [SCHMIDT & SCHACHNER 1998], das verantwortlich für das Auswachsen der Axone der retinalen Ganglienzellen ist [HOPKINS *et al.* 1985; SCHMIDT *et al.* 1991]. Laminin wird ebenfalls von den Fibroblasten synthetisiert, die den Optischen Nerv umgeben [HASSELL *et al.* 1992; HIRSCH *et al.* 1995] und an der Regeneration beteiligt sind [THORMODSSON *et al.* 1992A].

Die **pyramidalen Neuronen** (Typ I; s. Kap. 3.5.5) sind häufig im Tectum opticum [MEEK & SCHELLART 1978], jedoch nicht gleichmäßig über das gesamte SFGS verteilt [LEGHISSA 1955]. Ependymin-Markierung an pyramidalen Neuronen wurde von SCHMIDT *et al.* [1992] und ROTHER *et al.* [1995] angesprochen. Im Gegensatz dazu wurden Markierungen an Neuronen von BENOWITZ & SHASHOUA [1977] und LAKOS *et al.* [1994] bestritten. In dieser Arbeit

wurde *ein* pyramidales Neuron stark markiert (vgl. Abb. 3.21 A/B). Überraschenderweise zeigte sich auch eine intensive Ependymin-Markierung des Zellkerns (vgl. Abb. 3.21 C). Alle anderen gefundenen Neurone zeigten sich dagegen unmarkiert (Daten nicht gezeigt). Nach Entfernung der Netzhaut werden bei degenerierten retinalen Axonen [LAUFER & VANEGAS 1974] pyramidale Zellen im contralateralen SFGS über Meerrettich-Peroxidase gefärbt [SCHMIDT 1979]. Des Weiteren zeigt sich nach Quetschung des Optischen Nerves eine erhöhte Synthese von Heparansulfat in bestimmten Zellen im SFGS [DOW *et al.* 1994]. Es ist daher möglich, dass sporadisch auftretende Ependymin-Markierungen in pyramidalen Neuronen regenerationsbedingt über die Bindung an Heparansulfat erfolgt (vgl. Bindung von Ependymin an Heparin [THORMODSSON *et al.* 1992B]).

Die **periventriculären Neurone** (Typ XIV und XV; s. Kap. 3.5.2) sind im Tectum opticum sehr zahlreich [MEEK & SCHELLART 1978]. Im Gegensatz zu SCHMIDT *et al.* [1990] und PRADEL *et al.* [1999] konnte in dieser Arbeit keine Ependymin-Markierung an diesen Neuronen festgestellt werden (vgl. Abb. 3.14). Periventriculäre Neurone haben eine direkte retinale Verbindung [KINOSHITA & ITO 2006] und erhalten ihre visuellen Informationen über Synapsen an ihrem Apikaldendriten via Glutamat im SFGS und Stratum opticum [KINOSHITA *et al.* 2005]. Da noch in juvenilen Fischen eine Differenzierung periventriculärer zu pyramidalen Neuronen erfolgt [SCHMIDT *et al.* 1992] und im Zuge dieser Reorganisation synaptischer Verbindungen Zelladhäsionsmoleküle beteiligt sind [DITYATEV *et al.* 2009], ist es möglich, dass sich an diese Zelladhäsionsmoleküle auch Ependymin anlagern kann, wie beispielsweise über das HNK-1 Epitop an Laminin [KÜNEMUND *et al.* 1988; SCHMIDT *et al.* 1991; HALL *et al.* 1993].

4.2.5 Markierungen des polyklonalen Antikörpers „Perseus“

Die polyklonalen Antikörper gegen Ependymin können eine Reihe von Ependymin-Epitopen erkennen [SCHMIDT *et al.* 1990]. Die Glykosylierungsvarianten (s. Kap. 1.2) sind untereinander vollständig kreuzreaktiv [SCHMIDT & SHASHOUA 1983]. Kreuzreaktivitäten mit zytoplasmatischen Proteinen im Gehirn von Mäusen, Ratten und Küken konnten nicht nachgewiesen werden [SHASHOUA 1977A]. Das hier verwendete Serum des Kaninchens „Perseus“ enthält Antikörper, die gegen Epitope von Ependyminen gerichtet sind, die in der zytoplasmatischen Fraktion vorlagen [PÜTZ 2009] und vor der Injektion enzymatisch deglykosiliert wurden [SCHMIDT 1989].

Ependymin-Antiseren markieren neben Ependyminen zum Teil auch Concanavalin A [KAYA 2010] und in geringem Maße auch Laminin [SCHMIDT *et al.* 1991]. Da Ependymin an Laminin über sein HNK-1 Epitop binden kann [MOHAN *et al.* 1990] ist eine Kreuzreaktivität mit Laminin in dieser Arbeit von untergeordneter Bedeutung.

Eine Markierung des Lektins **Concanavalin A** aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) [BECKER *et al.* 1975] mit dem Ependymin-Antikörper wurde erstmals von SCHMIDT & SHASHOUA [1981] untersucht. Dabei gingen sie von einem Molekulargewicht von 55 kDa aus. Concanavalin A hat jedoch je nach experimentellen Bedingungen verschiedene apparente Molekulargewichte [HERMAN *et al.* 1985; CHRISPEELS *et al.* 1986]. Concanavalin A hat Einfluss auf

| Accession-Nr. | Name des Proteins | Art | Ident. | Referenz |
|----------------|---|-----|--------|-------------------------------|
| AAP42145.1 | <i>interferon-inducible protein IFI58</i> | CA | 11/25 | ZHANG & GUI 2004 |
| AAW82330.1 | <i>glucagon-like peptide 1 receptor</i> | CA | 14/32 | YEUNG <i>et al.</i> 2002 |
| XP_001344731.2 | <i>very large inducible GTPase-1-like</i> | DR | 31/136 | KLAMP <i>et al.</i> 2003 |
| NP_001025233.1 | <i>apolipoprotein B, like</i> | DR | 16/56 | HERBOMEL <i>et al.</i> 2001 |
| CAX15427.1 | <i>LRBA</i> | DR | 30/122 | TSANG <i>et al.</i> 2009 |
| AAH68320.1 | <i>Stat3</i> | DR | 17/60 | OATES <i>et al.</i> 1999 |
| BAH47263.1 | <i>Stat3</i> | DR | 17/60 | OATES <i>et al.</i> 1999 |
| NP_001106982.1 | <i>interleucin-21 receptor</i> | DR | 10/33 | MONTELEONE <i>et al.</i> 2009 |

Tabelle 4.1: Sequenzvergleich: Übereinstimmende Aminosäuresequenzen einiger Gehirnproteine von Karpfenfischen (Cyprinidae) mit der Aminosäuresequenz von Concanavalin A. *Ident.* = identische Aminosäuren / Sequenzabschnitt. CA = *Carassius auratus*; DR = *Danio rerio*; LRBA = *novel protein similar to vertebrate LPS-responsive vesicle trafficking, beach and anchor containing*.

das Neuritenwachstum [SCHMIDT *et al.* 1991], die synaptische Übertragung [LIN & LEVITAN 1987] und kann mit Glykoproteinen unlösliche Aggregate bilden [GOLDSTEIN *et al.* 1969]. Viele neuromodulatorische Effekte bleiben selbst nach dem Auswaschen mit Salzlösungen bestehen [LIN & LEVITAN 1991] und ein Entweichen von Concanavalin A aus der Säule kann unter vielen Puffersystemen erfolgen [MARIKAR *et al.* 1992]. Concanavalin A bildet mit zusammen mit Ependymin Komplexe, die unterschiedliche Laufeigenschaften im Gel zeigen [KAYA 2010]. Ein Sequenzvergleich (BLASTP 2.2.24+; ALTSCHUL *et al.* 2005) auf Proteinebene ergab mehrere Übereinstimmungen der Aminosäuresequenz von Concanavalin A [CUNNINGHAM *et al.* 1975] mit Proteinen im Gehirn von Goldfischen oder nahen Verwandten (Tab. 4.1).

4.3 Ependymin als Stress-induziertes Onkogen?

Basierend auf den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen scheint die Ependymin-Synthese durch Faktoren ausgelöst zu werden, die allgemein unter dem eher unpräzisen Begriff „Stress“ zusammengefasst werden können. Säugetiere und Fische scheinen unterschiedlich auf Stress zu reagieren. Stress kann das Lernen bei Ratten erleichtern [YUEN *et al.* 2009], bei Goldfischen kann Stress jedoch einen gegenteiligen Effekt haben [SPIELER *et al.* 1999]. Daher sind Vergleiche von Goldfischen zu Säugetieren nur unter Vorbehalt zu treffen. So scheinen beide auch nicht gleich auf oxidativen Stress zu reagieren [NILSSON 1990]. Es finden sich einige Anhaltspunkte, die darauf hindeuten, dass Ependymin lediglich indirekte Auswirkungen auf das Lernen hat: Zum einen findet sich Ependymin wie in dieser Arbeit dargelegt nur sporadisch an Synapsen (vgl. auch SHASHOUA 1976A). Zum anderen hemmen Antikörper gegen Ependymin nicht die synaptische Erregungsübertragung [SCHMIDT & SHASHOUA 1988]. Außerdem liegen Erinnerungsverluste nicht immer an einer Störung der Gedächtnisbildung [GOLUB *et al.* 1972], und verabreichte Substanzen zeigen viele unspezifische Effekte [HERNANDEZ & ABEL 2008].

Eine Zunahme der Ependymin-Synthese ist unter folgenden Bedingungen festgestellt worden: Äußere Stressfaktoren wie Kälte [CHEN *et al.* 2008; LIU *et al.* 2008], die einen vermehrten Sauerstoff-Bedarf erfordert [LUSHCHAK & BAGNYUKOVA 2006], geänderte Umweltbedingungen [ROBERGE *et al.* 2006; LARSEN *et al.* 2007; SABOURAULT *et al.* 2009] und unterschiedliche Entwicklungsstadien [AUBIN-HORTH *et al.* 2005; ZHANG *et al.* 2009A], Dressurversuche und Isolation (s. Kap. 4.1.3), sowie andere Stressfaktoren wie Verletzungen [SUÁREZ-CASTILLO *et al.* 2004], Gewebeschädigungen [TSOI *et al.* 2004; VOLZ *et al.* 2006] und Krankheiten [NIMMICH *et al.* 2001; BOUCHUT *et al.* 2007] setzen vermutlich eine Signaltransduktion [MÜLLER & FRINGS 2009] über zyklisches Adenosinmonophosphat in Gang [SHASHOUA *et al.* 1992], die unter anderem Ependymin synthetisiert [TAN *et al.* 2008]. Ependymin könnte dann über die Extrazellulärflüssigkeit sezerniert werden (s. Kap. 4.2.3), um am Wirkungsort möglicherweise Rezeptor-gebunden und/oder über eine Fettsäure (beispielsweise über eine Palmitoylierung DUNPHY & LINDER 1998; SIMONS & TOOMRE 2000) eine Signaltransduktion zu vermitteln, die dann vermutlich den Transkriptionsfaktor AP-1 aktiviert [SHASHOUA *et al.* 2001]. AP-1 bindet mit seinen Untereinheiten an die DNA und bewirkt, dass verschiedene Gene abgelesen werden, darunter das Enzym **Superoxiddismutase** [RUI & KVIETYS 2005], dessen Genexpression wie von KASKA [2003] gezeigt durch Ependymin erhöht wird. Superoxiddismutasen entfernen reaktive Sauerstoffradikale [ALSCHER *et al.* 2002] und verhindern dabei den programmierten Zelltod, die Apoptose [GREENHALGH 1998].

Interessanterweise wurde festgestellt, dass reaktive Sauerstoffradikale auch als sekundäre Botenstoffe dienen [PAHL & BAEUERLE 1994; RHEE 1999]. Ihr Vorhandensein spielt unter anderem eine Rolle beim Lernen [KNAPP & KLANN 2002], bei dem das redox-empfindliche NF- κ B beteiligt ist [KISHIDA & KLANN 2007]. Ependymin scheint NF- κ B jedoch nicht zu aktivieren [ADAMS *et al.* 2003]. Beide können allerdings die Synthese von Superoxiddismutasen induzieren, die durch Umsetzung der freien Radikale zu Wasserstoffperoxid eine Senkung der intrazellulären Kalzium-Konzentration bewirken und dadurch die Apoptose verhindern [MATTSON *et al.* 1997; KISHIDA & KLANN 2007; SMITH *et al.* 2009]. Ependymin und NF- κ B gelten als entzündungsfördernde Faktoren [ZENG *et al.* 2009], weil die Wundheilung normalerweise mit der Apoptose eingeleitet wird [GREENHALGH 1998]. Ependymin könnte daher durch Hemmung der Apoptose Krebs fördern: Es wurde vermehrt in Darmkrebszellen nachgewiesen [NIMMICH *et al.* 2001]. Entzündungshemmende Wirkstoffe, die freie Sauerstoffradikale generieren, können durch die daraus resultierende Apoptose Darmkrebs am Ausbreiten hindern [GIARDINA *et al.* 1999]. Ein stabiles Gleichgewicht zwischen freien Sauerstoffradikalen und Superoxiddismutase ist für das Überleben der Zelle von Bedeutung. Dabei ist es von Zelle zu Zelle unterschiedlich, wann die freien Radikale ein Level übersteigen und durch Schädigung von regulatorischen Elementen die Apoptose umgangen werden kann, so dass schließlich Krebswachstum gefördert statt gehemmt wird [HALLIWELL 2007]. Ependymin könnte demnach als regulierender Faktor des oxidativen Stress' dienen.

So wie äußere Stress-Faktoren auf den Lernerfolg der Säugetiere und Fische verschieden einwirken können (s. oben), so zeigen sich auch Unterschiede im Stoffwechsel unter Sauerstoff-

freier Umgebung (Anoxie). Wenige Wirbeltiere haben die Fähigkeit zur **anaeroben Glykolyse** unter Anoxie entwickelt, darunter die Karpfen und Goldfische [JOHANSSON *et al.* 1997]. Während die Anoxia-intoleranten Gehirnzellen von Säugern die Superoxiddismutase unter Sauerstoffarmut vermehrt synthetisieren [SHASHOUA *et al.* 2004], um bei erneutem Sauerstoffanstieg die Zelle vor reaktiven Sauerstoffradikalen zu schützen, scheint eine erhöhte Synthese dieses Enzyms bei Goldfischen nicht notwendig [LUSHCHAK *et al.* 2001]. Ependymin gewährleistet durch seine hemmende Wirkung auf die Apoptose offenbar das Überleben der Gehirnzellen im Karpfen unter sauerstoffarmen bzw. -freien Bedingungen [SMITH *et al.* 2009].

Nach neuesten Studien wird Ependymin auch abhängig von geschlechtsspezifischen Hormonen unterschiedlich exprimiert. Das Gleichgewicht zwischen **Testosteron** und **Östrogenen** scheint dabei ein entscheidender Faktor zu sein [HOFFMANN *et al.* 2006], denn eine Blockierung des Enzyms zur Umwandlung von Testosteron in 17β -Estradiol lässt mehr Ependymin in weiblichen Goldfischen entstehen [ZHANG *et al.* 2009B]. Nehmen dagegen männliche Ellritzen externes 17α -Ethinylestradiol auf, so wird Ependymin ebenfalls hochreguliert [MARTYNIUK *et al.* 2010]. Außerdem wurde festgestellt, dass durch Fischfütterung mit Östrogen-haltigem Sojafutter [REINLI & BLOCK 1996] die Ependymin-Synthese hochreguliert wird [MURRAY *et al.* 2010]. Interessanterweise kann Sojafütterung Darmentzündungen hervorrufen [BAKKE-MCKELLEP *et al.* 2000]. Subdominante Zebraärblinge, die im Gegensatz zu dominanten Tieren vermutlich weniger Testosteron aufweisen [SNEDDON *et al.* 2005; EISENEGGER *et al.* 2010], haben mehr Ependymin und einen höheren Stress-Level [persönliche Mitteilung L. U. Sneddon]. Jedoch weisen männliche Lachse, die im Gegensatz zu ihren gleichgeschlechtlichen Altersgenossen an ihrem Geburtsort verbleiben und zyklusbedingt früher erwachsen werden, einen höheren Ependymin-Gehalt auf [AUBIN-HORTH *et al.* 2005, 2009]. Der molekulare Zusammenhang mit den Ependyminen bleibt zu entschlüsseln (Abb. 4.1).

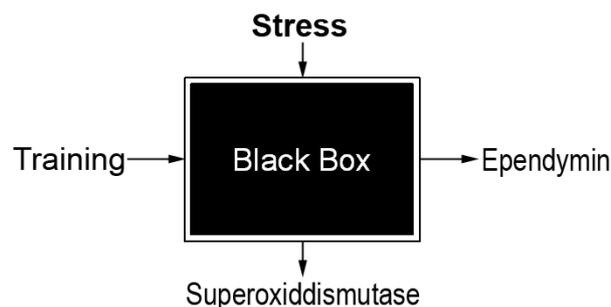


Abbildung 4.1: Der molekulare Mechanismus von Ependymin ist noch nicht entschlüsselt.

5 Literaturverzeichnis

- ABO, T., & BALCH, C. M. 1981. A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *J Immunol*, **127**, 1024–1029.
- ADAMS, D. S., & SHASHOUA, V. E. 1994. Cloning and sequencing the genes encoding goldfish and carp ependymin. *Gene*, **141**, 237–241.
- ADAMS, D. S., KIYOKAWA, M., GETMAN, M. E., & SHASHOUA, V. E. 1996. Genes encoding giant danio and golden shiner ependymin. *Neurochem Res*, **21**, 377–384.
- ADAMS, D. S., HASSON, B., BOYER-BOITEAU, A., EL-KHISHIN, A., & SHASHOUA, V. E. 2003. A peptide fragment of ependymin neurotrophic factor uses protein kinase C and the mitogen-activated protein kinase pathway to activate c-Jun N-terminal kinase and a functional AP-1 containing c-Jun and c-Fos proteins in mouse NB2a cells. *J Neurosci Res*, **72**, 405–416.
- AGRANOFF, B. W., & KLINGER, P. D. 1964. Puromycin effect on memory fixation in the goldfish. *Science*, **146**, 952–953.
- AL-AKEL, A. S., GUTHRIE, D. M., & BANKS, J. R. 1986. Motor responses to localized electrical stimulation of the tectum in the freshwater perch (*Perca fluviatilis*). *Neuroscience*, **19**, 1381–1391.
- ALSCHER, R. G., ERTURK, N., & HEATH, L. S. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot*, **53**, 1331–1341.
- ALTSCHUL, S. F., WOOTTON, J. C., GERTZ, E. M., AGARWALA, R., MORGULIS, A., SCHÄFFER, A. A., & YU, Y.-K. 2005. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J*, **272**, 5101–5109.
- ANDREWS, D. W., & JOHNSON, A. E. 1996. The translocon: more than a hole in the ER membrane? *Trends Biochem Sci*, **21**, 365–369.
- 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. *DNA Cell Biol*, **20**, 625–635.

- ASA, D., GANT, T., ODA, Y., & BRANDLEY, B. K. 1992. Evidence for two classes of carbohydrate binding sites on selectins. *Glycobiology*, **2**, 395–399.
- AUBIN-HORTH, N., LANDRY, C. R., LETCHER, B. H., & HOFMANN, H. A. 2005. Alternative life histories shape brain gene expression profiles in males of the same population. *Proc Biol Sci*, **272**, 1655–1662.
- AUBIN-HORTH, N., LETCHER, B. H., & HOFMANN, H. A. 2009. Gene-expression signatures of Atlantic salmon's plastic life cycle. *Gen Comp Endocrinol*, **163**, 278–284.
- BÄCHLE, D. 2004. *Cyclische Peptide als Glykomimetika für die L2/HNK-1-Erkennungssequenz: Synthese und Oberflächenplasmonresonanzstudien*. Dissertation, Universität Bielefeld.
- BAKKE-MCKELLEP, A. M., PRESS, C. MCL, BAEVERFJORD, G., KROGDAHL, Å., & LANDSVERK, T. 2000. Changes in immune and enzyme histochemical phenotypes of cells in the intestinal mucosa of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with soybean meal-induced enteritis. *J Fish Dis*, **23**, 115–127.
- BARRETT, A. J., KEMHAVI, A. A., BROWN, M. A., KIRSCHKE, H., KNIGHT, C. G., TAMAI, M., & HANADA, K. 1982. L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem J*, **201**, 189–198.
- BECKER, J. W., REEKE, G. N., WANG, J. L., CUNNINGHAM, B. A., & EDELMAN, G. M. 1975. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. *J Biol Chem*, **250**, 1513–1524.
- BECKER, T., WULLIMANN, M. F., BECKER, C. G., BERNHARDT, R. R., & SCHACHNER, M. 1997. Axonal regrowth after spinal cord transection in adult zebrafish. *J Comp Neurol*, **377**, 577–595.
- BEHREND, E. R., & BITTERMAN, M. E. 1962. Avoidance-conditioning in the goldfish: exploratory studies of the CS-US interval. *Am J Psychol*, **75**, 18–34.
- BENDAYAN, M., & ZOLLINGER, M. 1983. Ultrastructural localization of antigenic sites on osmium-fixed tissues applying the protein A-gold technique. *J Histochem Cytochem*, **31**, 101–109.
- BENOWITZ, L. I., & LEWIS, E. R. 1983. Increased transport of 44,000- to 49,000-dalton acidic proteins during regeneration of the goldfish optic nerve: a two-dimensional gel analysis. *J Neurosci*, **3**, 2153–2163.
- BENOWITZ, L. I., & SHASHOUA, V. E. 1977. Localization of a brain protein metabolically linked with behavioral plasticity in the goldfish. *Brain Res*, **136**, 227–242.

- BERG, L. S. 1932. Über *Carassius carassius* und *C. gibelio*. *Zool Anz*, **98**, 15–18.
- BERNARDS, J. A. 1972. Comparative physiological aspects of water and salt regulation. *Folia Med Neerl*, **15**, 42–50.
- BERNSTEIN, J. J. 1964. Relation of spinal cord regeneration to age in adult goldfish. *Exp Neurol*, **9**, 161–174.
- BEYER, I. 1976. Gruppenlernen und Einzellernen bei Schwarmfischen (Rotfeder; *Scardinius erythrophthalmus* L.). *Behav Ecol Sociobiol*, **1**, 245–263.
- BONE, Q., & DENTON, E. J. 1971. The osmotic effects of electron microscope fixatives. *J Cell Biol*, **49**, 571–581.
- BOUCHUT, A., COUSTAU, C., GOURBAL, B., & MITTA, G. 2007. Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: new candidate genes evidenced by a suppressive subtractive hybridization approach. *Parasitology*, **134**, 575–588.
- BRAY, R. N., & HIXON, M. A. 1978. Night-shocker: predatory behavior of the pacific electric ray (*Torpedo californica*). *Science*, **200**, 333–334.
- BULLOCK, G. R. 1984. The current status of fixation for electron microscopy. *J Microsc*, **133**, 1–15.
- CABEZAS, J. A. 1994. The origins of glycobiology. *Biochem Educ*, **22**, 3–7.
- CHEN, S. C. 1956. A history of the domestication and the factors of the varietal formation of the common goldfish, *Carassius auratus*. *Scientia Sinica*, **5**, 287–321.
- CHEN, Z., CHENG, C.-H. C., ZHANG, J., CAO, L., CHEN, L., ZHOU, L., JIN, Y., YE, H., DENG, C., DAI, Z., XU, Q., HU, P., SUN, S., SHEN, Y., & CHEN, L. 2008. Transcriptomic and genomic evolution under constant cold in Antarctic notothenioid fish. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 12944–12949.
- CHOU, D. K., ILYAS, A. A., EVANS, J. E., COSTELLO, C., QUARLES, R. H., & JUNGALWALA, F. B. 1986. Structure of sulfated glucuronyl glycolipids in the nervous system reacting with HNK-1 antibody and some IgM paraproteins in neuropathy. *J Biol Chem*, **261**, 11717–11725.
- CHRISPEELS, M. J., HARTL, P. M., STURM, A., & FAYE, L. 1986. Characterization of the endoplasmic reticulum-associated precursor of concanavalin a. *J Biol Chem*, **261**, 10021–10024.
- COOK, G. M. W. 1986. Cell surface carbohydrates: molecules in search of a function? *J Cell Sci Suppl*, **4**, 45–70.

- COSS, R. G., & GLOBUS, A. 1978. Spine stems on tectal interneurons in jewel fish are shortened by social stimulation. *Science*, **200**, 787–790.
- CUELLO, A. C., PRIESTLEY, J. V., & SOFRONIEW, M. V. 1983. Immunocytochemistry and neurobiology. *Q J Exp Physiol*, **68**, 545–578.
- CUNNINGHAM, B. A., WANG, J. L., WAXDAL, M. J., & EDELMAN, G. M. 1975. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. II. Amino acid sequence of cyanogen bromide fragment F3. *J Biol Chem*, **250**, 1503–1512.
- DALBEY, R. E., & VON HEIJNE, G. 1992. Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes—a new protease family. *Trends Biochem Sci*, **17**, 474–478.
- DALVA, M. B., MCCLELLAND, A. C., & KAYSER, M. S. 2007. Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nat Rev Neurosci*, **8**, 206–220.
- DAVIS, R. E., & AGRANOFF, B. W. 1966. Stages of memory formation in goldfish: evidence for an environmental trigger. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **55**, 555–559.
- DELL, A. 2002. Structures of glycoprotein glycans. *Aust J Chem*, **55**, 27–37.
- DELLA VALLE, M. C., SLEAT, D. E., SOHAR, I., WEN, T., PINTAR, J. E., JADOT, M., & LOBEL, M. 2006. Demonstration of lysosomal localization for the mammalian ependymin-related protein using classical approaches combined with a novel density shift method. *J Biol Chem*, **281**, 35436–35445.
- DENZER, D., & LAUDIEN, H. 1987. Stress induced biosynthesis of a 31 kd-glycoprotein in goldfish brain. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **86**, 555–559.
- D'ILARIO, L., & MARTINELLI, A. 2006. Toluidine blue: aggregation properties and structural aspects. *Model Simulat Mater Sci Eng*, **14**, 581–595.
- DITYATEV, A., BUKALO, O., & SCHACHNER, M. 2009. Modulation of synaptic transmission and plasticity by cell adhesion and repulsion molecules. *Neuron Glia Biol*, **4**, 197–209.
- DOW, K. E., LEVINE, R. L., SOLC, M. A., DASILVA, O., & RIOPELLE, R. J. 1994. Axonal transport of proteoglycans in regenerating goldfish optic nerve. *Exp Neurol*, **126**, 129–137.
- DUFFY, C., TEYLER, T. J., & SHASHOUA, V. E. 1981. Long-term potentiation in the hippocampal slice: evidence for stimulated secretion of newly synthesized proteins. *Science*, **212**, 1148–1151.
- DUNPHY, J. T., & LINDER, M. E. 1998. Signalling functions of protein palmitoylation. *Biochim Biophys Acta*, **1436**, 245–261.
- DUNPHY, W. G., & ROTHMAN, J. E. 1985. Compartmental organization of the Golgi stack. *Cell*, **42**, 13–21.

- DWEK, R. A. 1996. Glycobiology: toward understanding the function of sugars. *Chem Rev*, **96**, 683–720.
- DYER, J. R. 1956. Use of periodate oxidations. *Methods Biochem Anal*, **3**, 111–152.
- EISENEGGER, C., NAEF, M., SNOZZI, R., HEINRICHS, M., & FEHR, E. 2010. Prejudice and truth about the effect of testosterone on human bargaining behaviour. *Nature*, **463**, 356–359.
- ERICKSON, P. A., ANDERSON, D. H., & FISHER, S. K. 1987. Use of uranyl acetate en bloc to improve tissue preservation and labeling for post-embedding immunoelectron microscopy. *J Electron Microscop Tech*, **5**, 303–314.
- FAULK, W. P., & TAYLOR, G. M. 1971. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry*, **8**, 1081–1083.
- FJERDINGSTAD, E. J., & SHASHOUA, V. E. 1974. Seasonal changes in goldfish learning? *Science*, **183**, 1321.
- FRANZ, V. 1912. Das Kleinhirn der Knochenfische. *Zool Jahrb Abt Anat*, **32**, 401–464.
- GABIUS, H. J. 2000. Biological information transfer beyond the genetic code: the sugar code. *Naturwissenschaften*, **87**, 108–121.
- GANSS, B., & HOFFMANN, W. 1993. Calcium binding to sialic acids and its effect on the conformation of ependymins. *Eur J Biochem*, **217**, 275–280.
- GANSS, B., & HOFFMANN, W. 2009. Calcium-induced conformational transition of trout ependymins monitored by tryptophan fluorescence. *Open Biochem J*, **3**, 14–17.
- GIARDINA, C., BOULARES, H., & INAN, M. S. 1999. NSAIDs and butyrate sensitize a human colorectal cancer cell line to TNF- α and Fas ligation: the role of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*, **1448**, 425–438.
- GOLDSTEIN, I. J., SO, L. L., YANG, Y., & CALLIES, Q. C. 1969. Protein-carbohydrate interaction. XIX. The interaction of concanavalin A with IgM and the glycoprotein phytohemagglutinins of the waxbean and the soybean. *J Immunol*, **103**, 695–698.
- GOLUB, M. S., CHEAL, M. L., & DAVIS, R. E. 1972. Effects of electroconvulsive shock and puromycin on operant responding in goldfish. *Physiol Behav*, **8**, 573–578.
- GREEN, P. J., TAMATANI, T., WATANABE, T., MIYASAKA, M., HASEGAWA, A., KISO, M., YUEN, C. T., STOLL, M. S., & FEIZI, T. 1992. High affinity binding of the leucocyte adhesion molecule L-selectin to 3'-sulphated-Le(a) and -Le(x) oligosaccharides and the predominance of sulphate in this interaction demonstrated by binding studies with a series of lipid-linked oligosaccharides. *Biochem Biophys Res Commun*, **188**, 244–251.

- GREENHALGH, D. G. 1998. The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*, **30**, 1019–1030.
- GREGORIO-KING, C. C., MCLEOD, J. L., COLLIER, F. McL., COLLIER, G. R., BOLTON, K. A., VAN DER MEER, G. J., APOSTOLOPOULOS, J., & KIRKLAND, M. A. 2002. MERP1: a mammalian ependymin-related protein gene differentially expressed in hematopoietic cells. *Gene*, **286**, 249–257.
- GROVER, B. G., & SHARMA, S. C. 1981. Organization of extrinsic tectal connections in goldfish (*Carassius auratus*). *J Comp Neurol*, **196**, 471–488.
- HALL, H., LIU, L., SCHACHNER, M., & SCHMITZ, B. 1993. The L2/HNK-1 carbohydrate mediates adhesion of neural cells to laminin. *Eur J Neurosci*, **5**, 34–42.
- HALL, H., DEUTZMANN, R., TIMPL, R., VAUGHAN, L., SCHMITZ, B., & SCHACHNER, M. 1997. HNK-1 carbohydrate-mediated cell adhesion to laminin-1 is different from heparin-mediated and sulfatide-mediated cell adhesion. *Eur J Biochem*, **246**, 233–242.
- HALLIWELL, B. 2007. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J*, **401**, 1–11.
- HALTIWANGER, ROBERT S, & LOWE, JOHN B. 2004. Role of glycosylation in development. *Annu Rev Biochem*, **73**, 491–537.
- HARRIS, L. J., LARSON, S. B., HASEL, K. W., & MCPHERSON, A. 1997. Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry*, **36**, 1581–1597.
- HASSELL, J. R., SCHRECENGOST, P. K., RADA, J. A., SUNDARRAJ, N., SOSSI, G., & THOFT, R. A. 1992. Biosynthesis of stromal matrix proteoglycans and basement membrane components by human corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **33**, 547–557.
- HEBB, D. O. 1949. *Organization of behavior. A neuropsychological theory*. John Wiley & Sons, New York.
- HERBOMEL, P., THISSE, B., & THISSE, C. 2001. Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. *Dev Biol*, **238**, 274–288.
- HERMAN, E. M., SHANNON, L. M., & CHRISPEELS, M. J. 1985. Concanavalin A is synthesized as a glycoprotein precursor. *Planta*, **165**, 23–29.
- HERNANDEZ, P. J., & ABEL, T. 2008. The role of protein synthesis in memory consolidation: progress amid decades of debate. *Neurobiol Learn Mem*, **89**, 293–311.
- HERRE, W. 1990. Betrachtungen an Schädeln von Goldfischen (*Carassius gibelio f. auratus*). *Z Zool Syst Evolutionsforsch*, **28**, 137–151.

- HERRERO, L., RODRÍGUEZ, F., SALAS, C., & TORRES, B. 1998. Tail and eye movements evoked by electrical microstimulation of the optic tectum in goldfish. *Exp Brain Res*, **120**, 291–305.
- HERTER, K. 1948. Zur Psychologie und Sinnesphysiologie der Fische. *Blick in die Wissenschaft*, **1**, 86–89.
- HESSE, G. W., HOFSTEIN, R., & SHASHOUA, V. E. 1984. Protein release from hippocampus in vitro. *Brain Res*, **305**, 61–66.
- HIRSCH, S., CAHILL, M. A., & STUERMER, C. A. 1995. Fibroblasts at the transection site of the injured goldfish optic nerve and their potential role during retinal axonal regeneration. *J Comp Neurol*, **360**, 599–611.
- HOFFMANN, J. L., TORONTALI, S. P., THOMASON, R. G., LEE, D. M., BRILL, J. L., PRICE, B. B., CARR, G. J., & VERSTEEG, D. J. 2006. Hepatic gene expression profiling using Genechips in zebrafish exposed to 17 α -ethynylestradiol. *Aquat Toxicol*, **79**, 233–246.
- HOFFMANN, W. 1992. Goldfish ependymins: cerebrospinal fluid proteins of meningeal origin. *Prog Brain Res*, **91**, 13–17.
- HOFFMANN, W. 1994. Ependymins and their potential role in neuroplasticity and regeneration: calcium-binding meningeal glycoproteins of the cerebrospinal fluid and extracellular matrix. *Int J Biochem*, **26**, 607–619.
- HOFFMANN, W., & SCHWARZ, H. 1996. Ependymins: meningeal-derived extracellular matrix proteins at the blood-brain barrier. *Int Rev Cytol*, **165**, 121–158.
- HOLTMANN, B. 2002. *Biochemie molekularer Mechanismen der Gedächtnisbildung nach einer Belohnungsdressur an Cypriniden*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- HOPKINS, J. M., FORD-HOLEVINSKI, T. S., MCCOY, J. P., & AGRANOFF, B. W. 1985. Laminin and optic nerve regeneration in the goldfish. *J Neurosci*, **5**, 3030–3038.
- HÖRNER, J. L., LONGO, N., & BITTERMAN, M. E. 1961. A shuttle box for fish and a control circuit of general applicability. *Am J Psychol*, **74**, 114–120.
- HUNTER, J. R., & WISBY, W. J. 1964. Net avoidance behavior of carp and other species of fish. *J Fish Res Board Can*, **21**, 613–633.
- HYDÉN, H., & EGYHÁZI, E. 1962. Nuclear RNA changes of nerve cells during a learning experiment in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **48**, 1366–1373.
- HYDÉN, H., & LANGE, P. W. 1970. Brain-cell protein synthesis specifically related to learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **65**, 898–904.
- HYNES, R. O. 2009. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, **326**, 1216–1219.

- ITO, H., BUTLER, A. B., & EBBESSON, S. O. 1980. An ultrastructural study of the normal synaptic organization of the optic tectum and the degenerating tectal afferents from retina, telencephalon, and contralateral tectum in a teleost, *Holocentrus rufus*. *J Comp Neurol*, **191**, 639–659.
- JACKSON, D. J., WÖRHEIDE, G., & DEGNAN, B. M. 2007. Dynamic expression of ancient and novel molluscan shell genes during ecological transitions. *BMC Evol Biol*, **7**, 160–176.
- JOHANSSON, D., NILSSON, G. E., & DØVING, K. B. 1997. Anoxic depression of light-evoked potentials in retina and optic tectum of crucian carp. *Neurosci Lett*, **237**, 73–76.
- JUNGALWALA, F. B. 1994. Expression and biological functions of sulfoglucuronyl glycolipids (SGGLs) in the nervous system—a review. *Neurochem Res*, **19**, 945–957.
- KARNOVSKY, M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Pages 137A–138A of: Abstracts of the Fifth Annual Meeting of the American Society for Cell Biology*.
- KASKA, J. 2003. *Ependymin mechanism of action: full length EPN vs peptide CMX-8933*. Diplomarbeit, Worcester Polytechnic Institute, Worcester, MA, USA.
- KAVALIERS, M. 1981. Schooling behavior of fish: an opiate-dependent activity? *Behav Neural Biol*, **33**, 397–401.
- KAYA, C. 2010. *Untersuchung der Metallionenbindung an gehirnspezifischen Glycoproteinen*. Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- KELLENBERGER, E., RYTER, A., & SÉCHAUD, J. 1958. Electron microscope study of DNA-containing plasms – II. Vegetative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological states. *J Biophys Biochem Cytol*, **4**, 671–678.
- KIERNAN, J. A. 2000. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. *Microsc Today*, **8**, 8–12.
- KINOSHITA, M., & ITO, E. 2006. Roles of periventricular neurons in retinotectal transmission in the optic tectum. *Prog Neurobiol*, **79**, 112–121.
- KINOSHITA, M., FUKAYA, M., TOJIMA, T., KOJIMA, S., ANDO, H., WATANABE, M., URANO, A., & ITO, E. 2005. Retinotectal transmission in the optic tectum of rainbow trout. *J Comp Neurol*, **484**, 249–259.
- KISHIDA, K. T., & KLANN, E. 2007. Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal*, **9**, 233–244.
- KLAMP, T., BOEHM, U., SCHENK, D., PFEFFER, K., & HOWARD, J. C. 2003. A giant GTPase, very large inducible GTPase-1, is inducible by IFNs. *J Immunol*, **171**, 1255–1265.

- KNAPP, L. T., & KLANN, E. 2002. Role of reactive oxygen species in hippocampal long-term potentiation: contributory or inhibitory? *J Neurosci Res*, **70**, 1–7.
- KÖHLER, D. 1976. The interaction between conditioned fish and naive schools of juvenile carp (*Cyprinus Carpio*, *Pisces*). *Behav Processes*, **1**, 237–275.
- KÖNIGSTORFER, A., STERRER, S., & HOFFMANN, W. 1989a. Biosynthesis of ependymins from goldfish brain. *J Biol Chem*, **264**, 13689–13692.
- KÖNIGSTORFER, A., STERRER, S., ECKERSKORN, C., LOTTSPPEICH, F., SCHMIDT, R., & HOFFMANN, W. 1989b. Molecular characterization of an ependymin precursor from goldfish brain. *J Neurochem*, **52**, 310–312.
- KÖNIGSTORFER, A., STERRER, S., & HOFFMANN, W. 1990. Ependymins are expressed in the meninx of goldfish brain. *Cell Tissue Res*, **261**, 59–64.
- KORNFELD, R., & KORNFELD, S. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*, **54**, 631–664.
- KRISHNA, R. G., & WOLD, F. 1993. Post-translational modification of proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **67**, 265–298.
- KRUSE, J., MAILHAMMER, R., WERNECKE, H., FAISSNER, A., SOMMER, I., GORIDIS, C., & SCHACHNER, M. 1984. Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1. *Nature*, **311**, 153–155.
- KÜNEMUND, V., JUNGALWALA, F. B., FISCHER, G., CHOU, D. K., KEILHAUER, G., & SCHACHNER, M. 1988. The L2/HNK-1 carbohydrate of neural cell adhesion molecules is involved in cell interactions. *J Cell Biol*, **106**, 213–223.
- KYTE, J., & DOOLITTLE, R. F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, **157**, 105–132.
- LAHLOU, B., HENDERSON, I. W., & SAWYER, W. H. 1969. Sodium exchanges in goldfish (*Carassius auratus* L.) adapted to a hypertonic saline solution. *Comp Biochem Physiol*, **28**, 1427–1433.
- LAKOS, S. F., THORMODSSON, F. R., & GRAFSTEIN, B. 1994. Immunolocalization of exoglycoproteins (“ependymins”) in the goldfish brain. *Neurochem Res*, **19**, 1401–1412.
- LARSEN, P. F., NIELSEN, E. E., WILLIAMS, T. D., HEMMER-HANSEN, J., CHIPMAN, J. K., KRUHØFFER, M., GRØNKJÆR, P., GEORGE, S. G., DYRSKJØT, L., & LOESCHCKE, V. 2007. Adaptive differences in gene expression in European flounder (*Platichthys flesus*). *Mol Ecol*, **16**, 4674–4683.

- LAUDIEN, H., FREYER, J., ERB, R., & DENZER, D. 1986. Influence of isolation stress and inhibited protein biosynthesis on learning and memory in goldfish. *Physiol Behav*, **38**, 621–628.
- LAUFER, M., & VANEGAS, H. 1974. The optic tectum of a perciform teleost. III. Electron microscopy of degenerating retino-tectal afferents. *J Comp Neurol*, **154**, 97–115.
- LEE, R. M. K. W., MCKENZIE, R., KOBAYASHI, K., GARFIELD, R. E., FORREST, J. B., & DANIEL, E. E. 1982. Effects of glutaraldehyde fixative osmolarities on smooth muscle cell volume, and osmotic reactivity of the cells after fixation. *J Microsc*, **125**, 77–88.
- LEENAARS, M., & HENDRIKSEN, C. F. M. 2005. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR J*, **46**, 269–279.
- LEGHISSA, S. 1955. La struttura microscopica e la citoarchitettura del tetto ottico dei pesci teleostei. *Z Anat Entwicklungsgesch*, **118**, 427–463.
- LEHLE, L., STRAHL, S., & TANNER, W. 2006. Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew Chem Int Ed*, **45**, 6802–6818.
- LIN, S. S., & LEVITAN, I. B. 1987. Concanavalin A alters synaptic specificity between cultured *Aplysia* neurons. *Science*, **237**, 648–650.
- LIN, S. S., & LEVITAN, I. B. 1991. Concanavalin A: a tool to investigate neuronal plasticity. *Trends Neurosci*, **14**, 273–277.
- LINNÉ, C. 1758. *Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. **10**. edn. Holmiæ (Laurentii Salvii).
- LIPMAN, N. S., JACKSON, L. R., TRUDEL, L. J., & WEIS-GARCÍA, F. 2005. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J*, **46**, 258–268.
- LIS, H., & SHARON, N. 1998. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem Rev*, **98**, 637–674.
- LIU, Z., LI, R. W., & WALDBIESER, G. C. 2008. Utilization of microarray technology for functional genomics in ictalurid catfish. *J Fish Biol*, **72**, 2377–2390.
- LUITEN, P. G. 1981. Afferent and efferent connections of the optic tectum in the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Brain Res*, **220**, 51–65.
- LUSHCHAK, V., & BAGNYUKOVA, T. V. 2006. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **144**, 283–289.

- LUSHCHAK, V. I., LUSHCHAK, L. P., MOTA, A. A., & HERMES-LIMA, M. 2001. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **280**, R100–R107.
- MACKINTOSH, N. J. 1971. Reward and aftereffects of reward in the learning of goldfish. *J Comp Physiol Psychol*, **76**, 225–232.
- 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. *J Neurosci Res*, **8**, 331–342.
- MANERY, J. F. 1966. Effects of Ca ions on membranes. *Fed Proc*, **25**, 1804–1810.
- MARIKAR, Y., ZACHARIAH, B., & BASU, D. 1992. Leaching of concanavalin A during affinity chromatographic isolation of cell surface glycoproteins from human fetal neurons and glial cells. *Anal Biochem*, **201**, 306–310.
- MARKTSCHIEFFEL, P. 1989. *Mikroheterogenität und Glycosylierung monomerer und dimerer Ependymine (spezifische Glycoproteine des Goldfischgehirns) und biochemische Eigenschaften verwandter Proteine in anderen Spezies*. Diplomarbeit, Johann-Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt am Main.
- MARTYNIUK, C. J., KROLL, K. J., DOPERALSKI, N. J., BARBER, D. S., & DENSLOW, N. D. 2010. Environmentally relevant exposure to 17 α -ethinylestradiol affects the telencephalic proteome of male fathead minnows. *Aquat Toxicol*, **98**, 344–353.
- MATTSON, M. P., GOODMAN, Y., LUO, H., FU, W., & FURUKAWA, K. 1997. Activation of NF- κ B protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. *J Neurosci Res*, **49**, 681–697.
- MCGAUGH, J. L. 1966. Time-dependent processes in memory storage. *Science*, **153**, 1351–1358.
- MEEK, J. 1983. Functional anatomy of the tectum mesencephali of the goldfish. An explorative analysis of the functional implications of the laminar structural organization of the tectum. *Brain Res*, **287**, 247–297.
- MEEK, J., & SCHELLART, N. A. M. 1978. A golgi study of goldfish optic tectum. *J Comp Neurol*, **182**, 89–122.
- METKA, K., & NADA, P. 1992. The role of exocytosis in the apocrine secretion of milk lipid globules in mouse mammary gland during lactogenesis. *Biol Cell*, **75**, 211–216.
- MOHAN, P. S., CHOU, D. K., & JUNGALWALA, F. B. 1990. Sulfoglucuronyl glycolipids bind laminin. *J Neurochem*, **54**, 2024–2031.

- MOLIN, S.-O., NYGREN, H., & DOLONIUS, L. 1978. A new method for the study of glutaraldehyde-induced crosslinking properties in proteins with special reference to the reaction with amino groups. *J Histochem Cytochem*, **26**, 412–414.
- MONTELEONE, G., PALLONE, F., & MACDONALD, T. T. 2009. Interleukin-21 (IL-21)-mediated pathways in T cell-mediated disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, **20**, 185–191.
- MOREMEN, K. W., TRIMBLE, R. B., & HERSCOVICS, A. 1994. Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway. *Glycobiology*, **4**, 113–125.
- MOVAT, H. Z., & FERNANDO, N. V. 1962. The fine structure of connective tissue. I. The fibroblast. *Exp Mol Pathol*, **1**, 509–534.
- MÜLLER, W., & FRINGS, S. 2009. *Signaltransduktion und Signalpropagation*. 4. edn. IN: *Tier- und Humanphysiologie*. 301–312. Springer Verlag, Berlin.
- MÜLLER-SCHMID, A., RINDER, H., LOTTSPEICH, F., GERTZEN, E. M., & HOFFMANN, W. 1992. Ependymins from the cerebrospinal fluid of salmonid fish: gene structure and molecular characterization. *Gene*, **118**, 189–196.
- MÜLLER-SCHMID, A., GANSS, B., GORR, T., & HOFFMANN, W. 1993. Molecular analysis of ependymins from the cerebrospinal fluid of the orders Clupeiformes and Salmoniformes: no indication for the existence of an euteleost infradivision. *J Mol Evol*, **36**, 578–585.
- MÜNZNER, G. 2007. *Wirkung einer operanten Konditionierung auf die Expression eines Zelladhäsionsmolekül im Goldfischgehirn*. Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- MURRAY, H. M., LALL, S. P., RAJASELVAM, R., BOUTILIER, L. A., BLANCHARD, B., FLIGHT, R. M., COLOMBO, S., MOHINDRA, V., & DOUGLAS, S. E. 2010. A nutrigenomic analysis of intestinal response to partial soybean meal replacement in diets for juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, L. *Aquaculture*, **298**, 282–293.
- N. N. 2005. *Physikalisch-chemische Beschaffenheit des von den Stadtwerken Gießen AG verteilten Trinkwassers*. Tech. rept. Stadtwerke Gießen AG, Gießen.
- NELSON, T. J., & ALKON, D. L. 1989. Specific protein changes during memory acquisition and storage. *Bioessays*, **10**, 75–79.
- NEWMAN, G. R. 1987. Use and abuse of LR White. *Histochem J*, **19**, 118–120.
- NEWMAN, G. R., & HOBOT, J. A. 1987. Modern acrylics for post-embedding immunostaining techniques. *J Histochem Cytochem*, **35**, 971–981.
- NEWMAN, G. R., JASANI, B., & WILLIAMS, E. D. 1983. A simple post-embedding system for the rapid demonstration of tissue antigens under the electron microscope. *Histochem J*, **15**, 543–555.

- NIELSON, A. J., & GRIFFITH, W. P. 1979. Tissue fixation by osmium tetroxide. *J Histochem Cytochem*, **27**, 997–999.
- NILSSON, G. E. 1990. Long-term anoxia in crucian carp: changes in the levels of amino acid and monoamine neurotransmitters in the brain, catecholamines in chromaffin tissue, and liver glycogen. *J Exp Biol*, **150**, 295–320.
- NIMMICH, I., ERDMANN, S., MELCHERS, U., CHTARBOVA, S., FINKE, U., HENTSCH, S., HOFFMANN, I., OERTEL, M., HOFFMANN, W., & MÜLLER, O. 2001. The novel ependymin related gene UCC1 is highly expressed in colorectal tumor cells. *Cancer Lett*, **165**, 71–79.
- NORDLANDER, R. H. 1993. Cellular and subcellular distribution of HNK-1 immunoreactivity in the neural tube of *Xenopus*. *J Comp Neurol*, **335**, 538–551.
- OATES, A. C., WOLLBERG, P., PRATT, S. J., PAW, B. H., JOHNSON, S. L., HO, R. K., POSTLETHWAIT, J. H., ZON, L. I., & WILKS, A. F. 1999. Zebrafish *stat3* is expressed in restricted tissues during embryogenesis and *stat1* rescues cytokine signaling in a *STAT1*-deficient human cell line. *Dev Dyn*, **215**, 352–370.
- O'BENAR, J. D. 1976. Electrophysiology of neural units in goldfish optic tectum. *Brain Res Bull*, **1**, 529–541.
- OLSEN, B. R., & PROCKOP, D. J. 1974. Ferritin-conjugated antibodies used for labeling of organelles involved in the cellular synthesis and transport of procollagen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**, 2033–2037.
- ORTÍ, G., & MEYER, A. 1996. Molecular evolution of ependymin and the phylogenetic resolution of early divergences among euteleost fishes. *Mol Biol Evol*, **13**, 556–573.
- ØVERLI, Ø., POTTINGER, T. G., CARRICK, T. R., ØVERLI, E., & WINBERG, S. 2002. Differences in behaviour between rainbow trout selected for high- and low-stress responsiveness. *J Exp Biol*, **205**, 391–395.
- PAHL, H. L., & BAEUERLE, P. A. 1994. Oxygen and the control of gene expression. *Bioessays*, **16**, 497–502.
- PELZ, G. R. 1987. Der Giebel: *Carassius auratus gibelio* oder *Carassius auratus auratus*. *Nat Mus*, **117**, 118–129.
- PIRONT, M.-L., & SCHMIDT, R. 1988. Inhibition of long-term memory formation by anti-ependymin antisera after shock-avoidance learning in goldfish. *Brain Res*, **442**, 53–62.
- PORALLA, J., & NEUMEYER, C. 2006. Generalization and categorization of spectral colors in goldfish. II. Experiments with two and six training wavelengths. *J Comp Physiol A*, **192**, 469–479.

- PRADEL, G., SCHACHNER, M., & SCHMIDT, R. 1999. Inhibition of memory consolidation by antibodies against cell adhesion molecules after active avoidance conditioning in zebrafish. *J Neurobiol*, **39**, 197–206.
- PÜTZ, S. 2009. *Vergleichende Immunfluoreszenzstudie zur Verteilung von ependyminartigen Zelladhäsionsmolekülen im Gehirn von Goldfisch und Hausmaus*. Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- RAAFLAUB, J. 1956. Applications of metal buffers and metal indicators in biochemistry. *Methods Biochem Anal*, **3**, 301–325.
- RADEMACHER, T. W., PAREKH, R. B., & DWEK, R. A. 1988. Glycobiology. *Annu Rev Biochem*, **57**, 785–838.
- RAYMOND, P. A., & EASTER, S. S. 1983. Postembryonic growth of the optic tectum in goldfish. *J Neurosci*, **3**, 1077–1091.
- REINLI, K., & BLOCK, G. 1996. Phytoestrogen content of foods - a compendium of literature values. *Nutr Cancer*, **26**, 123–148.
- REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*, **17**, 208–212.
- RHEE, S. G. 1999. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med*, **31**, 53–59.
- RICHARDSON, J. S., RICHARDSON, D. C., TWEEDY, N. B., GERNERT, K. M., QUINN, T. P., HECHT, M. H., ERICKSON, B. W., YAN, Y., MCCLAIN, R. D., & DONLAN, M. E. 1992. Looking at proteins: representations, folding, packing, and design. Biophysical Society National Lecture, 1992. *Biophys J*, **63**, 1186–1209.
- RIEDERER, B. M. 1989. Antigen preservation tests for immunocytochemical detection of cytoskeletal proteins: influence of aldehyde fixatives. *J Histochem Cytochem*, **37**, 675–681.
- RINDER, H., BAYER, T. A., GERTZEN, E. M., & HOFFMANN, W. 1992. Molecular analysis of the ependymin gene and functional test of its promoter region by transient expression in *Brachydanio rerio*. *DNA Cell Biol*, **11**, 425–432.
- RITTER, S. 2010. *Untersuchung möglicher Zusammenhänge zwischen physiologischen Stressreaktionen und der Expression von gehirnspezifischen Zelladhäsionsmolekülen*. Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- ROBERGE, C., EINUM, S., GUDERLEY, H., & BERNATCHEZ, L. 2006. Rapid parallel evolutionary changes of gene transcription profiles in farmed Atlantic salmon. *Mol Ecol*, **15**, 9–20.

- RODRIGUEZ, F., DURAN, E., VARGAS, J. P., TORRES, B., & SALAS, C. 1994. Performance of goldfish trained in allocentric and egocentric maze procedures suggests the presence of a cognitive mapping system in fishes. *Anim Learn Behav*, **22**, 409–420.
- ROTHER, S. 1992. *Expression und ultrastrukturelle Verteilung eines verhaltensassoziierten Glykoprotein (Ependymin) im Goldfischgehirn*. Dissertation, Johann-Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt am Main.
- ROTHER, S., SCHMIDT, R., BRYSCH, W., & SCHLINGENSIEPEN, K.-H. 1995. Learning-induced expression of menigeal ependymin mRNA and demonstration of ependymin in neurons and glial cells. *J Neurochem*, **65**, 1456–1464.
- ROYLE, L., DWEK, R. A., & RUDD, P. M. 2006. *Determinating the structure of oligosaccharides N- and O-linked to glycoproteins*. **Suppl. 43** edn. IN: J. COLIGAN, B. DUNN, D. SPEICHER, P. WINGFIELD (eds.): *Current Protocols in Protein Science.*, 12.6.1-12.6.45. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- RUBEN, S., & EBNER, R. 1999. *Human ependymin*. US Patent WO 99/36565. World Intellectual Property Organization, Genf, CH.
- RUI, T., & KVIETYS, P. R. 2005. NF κ B and AP-1 differentially contribute to the induction of Mn-SOD and eNOS during the development of oxidant tolerance. *FASEB J*, **19**, 1908–1910.
- SABATINI, D. D., BENSCH, K., & BARNETT, R. B. 1963. Cytochemistry and electron microscopy. *J Cell Biol*, **17**, 19–58.
- SABOURAULT, C., GANOT, P., DELEURY, E., ALLEMAND, D., & FURLA, P. 2009. Comprehensive EST analysis of the symbiotic sea anemone, *Anemonia viridis*. *BMC Genomics*, **10**, 333–344.
- SAVAGE, G. E. 1968. Temporal factors in avoidance learning in normal and forebrainless goldfish (*Carassius auratus*). *Nature*, **218**, 1168–1169.
- SCHACHNER, M., & MARTINI, R. 1995. Glycans and the modulation of neural-recognition molecule function. *Trends Neurosci*, **18**, 183–191.
- SCHAEFER, V. J., & HARKER, D. 1942. Surface replicas for use in the electron microscope. *J Appl Phys*, **13**, 427–433.
- SCHMIDT, J. T. 1979. The laminar organization of optic nerve fibres in the tectum of goldfish. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **205**, 287–306.
- SCHMIDT, J. T., & FREEMAN, J. A. 1980. Electrophysiologic evidence that retinotectal synaptic transmission in the goldfish is nicotinic cholinergic. *Brain Res*, **187**, 129–142.

- 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. *J Neurobiol*, **37**, 659–671.
- SCHMIDT, J. T., & SHASHOUA, V. E. 1988. Antibodies to ependymin block the sharpening of the regenerating retinotectal projection in goldfish. *Brain Res*, **446**, 269–284.
- 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. *J Neurobiol*, **22**, 40–54.
- SCHMIDT, R. 1983. Long term memory and morphological distribution of involved proteins in goldfish brain. *Verh Anat Ges*, **77**, 725–726.
- SCHMIDT, R. 1986. *Biochemical participation of glycoproteins in memory consolidation after two different training paradigms in goldfish*. IN: H. MATTHIES (ed.): *Learning and Memory. Mechanisms of Information - Storage in the Nervous System*. Advances in Biosciences **59**, 213–222. Pergamon Press, Oxford.
- SCHMIDT, R. 1987. Changes in subcellular distribution of ependymins in goldfish brain induced by learning. *J Neurochem*, **48**, 1870–1878.
- SCHMIDT, R. 1989. Glycoproteins involved in long-lasting plasticity in the teleost brain. *Prog Zool*, **37**, 327–339.
- SCHMIDT, R. 1995. Cell-adhesion molecules in memory formation. *Behav Brain Res*, **66**, 65–72.
- SCHMIDT, R. 2004. *Learning and memory, neurochemical aspects*. IN: G. ADELMAN AND B. SMITH (eds.): *Encyclopedia of Neuroscience, 3rd edition. CD version*. Elsevier, Amsterdam and New York.
- SCHMIDT, R., & LAPP, H. 1987. Regional distribution of ependymins in goldfish brain measured by radioimmunoassay. *Neurochem Int*, **10**, 383–390.
- SCHMIDT, R., & MAKIOLA, E. 1991. Calcium and zinc ion binding properties of goldfish brain ependymin. *Life Sci Adv*, **10**, 161–171.
- SCHMIDT, R., & SHASHOUA, V. E. 1981. A radioimmunoassay for ependymins β and γ : two goldfish brain proteins involved in behavioral plasticity. *J Neurochem*, **36**, 1368–1377.
- SCHMIDT, R., & SHASHOUA, V. E. 1983. Relationships between goldfish brain glycoproteins participating in functional plasticity of the central nervous system. *J Neurochem*, **40**, 652–660.

- SCHMIDT, R., LÖFFLER, F., MÜLLER, H. W., & SEIFERT, W. 1986. Immunological cross-reactivity of cultured rat hippocampal neurons with goldfish brain proteins synthesized during memory consolidation. *Brain Res*, **386**, 245–257.
- SCHMIDT, R., ROTHER, S., & SCHWERDTFEGER, W. K. 1990. *Glycoproteins of the extracellular matrix mediate plasticity in the CNS*. IN: W. K. SCHWERDTFEGER AND P. GERMROTH (eds.): *The forebrain in nonmammals: new aspects of structure and development.*, 17–28. Springer Verlag, Berlin.
- SCHMIDT, R., ROTHER, S., SCHLINGENSIEPEN, K.-H., & BRYSCH, W. 1992. Neuronal plasticity depending on a glycoprotein synthesized in goldfish leptomeninx. *Prog Brain Res*, **91**, 7–12.
- 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. *J Neurochem*, **65**, 1465–1471.
- SCHMITZ, B., SCHACHNER, M., ITO, Y., NAKANO, T., & OGAWA, T. 1994. Determination of structural elements of the L2/HNK-1 carbohydrate epitope required for its function. *Glycoconj J*, **11**, 345–352.
- SCHNEIDER, M. R., & PAUS, R. 2010. Sebocytes, multifaceted epithelial cells: lipid production and holocrine secretion. *Int J Biochem Cell Biol*, **42**, 181–185.
- SCHWARTING, G. A., JUNGALWALA, F. B., CHOU, D. K., BOYER, A. M., & YAMAMOTO, M. 1987. Sulfated glucuronic acid-containing glycoconjugates are temporally and spatially regulated antigens in the developing mammalian nervous system. *Dev Biol*, **120**, 65–76.
- SCHWARZ, H., MÜLLER-SCHMID, A., & HOFFMANN, W. 1993. Ultrastructural localization of ependymins in the endomeninx of the rainbow trout: possible association with collagen fibrils of the extracellular matrix. *Cell Tiss Res*, **273**, 417–425.
- SCHWERTE, T., AXELSSON, M., NILSSON, S., & PELSTER, S. 1997. Effects of vagal stimulation on swimbladder blood flow in the european eel *Anguilla anguilla*. *J Exp Biol*, **200**, 3133–3139.
- SGONINA, K. 1939. Vergleichende Untersuchungen über die Sensibilisierung und den bedingten Reflex. *Z Tierpsychol*, **3**, 224–247.
- SHARMA, C. B., LEHLE, L., & TANNER, W. 1981. N-glycosylation of yeast proteins. Characterization of the solubilized oligosaccharyl transferase. *Eur J Biochem*, **116**, 101–108.
- SHARON, N., & LIS, H. 1989. Lectins as cell recognition molecules. *Science*, **246**, 227–234.
- SHASHOUA, V. E. 1968. RNA changes in goldfish brain during learning. *Nature*, **217**, 238–240.

- SHASHOUA, V. E. 1970. RNA metabolism in goldfish brain during acquisition of new behavioral patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **65**, 160–167.
- SHASHOUA, V. E. 1973. Seasonal changes in the learning and activity patterns of goldfish. *Science*, **181**, 572–574.
- SHASHOUA, V. E. 1976a. Brain metabolism and the acquisition of new behaviors. I. Evidence for specific changes in the pattern of protein synthesis. *Brain Res*, **111**, 347–364.
- SHASHOUA, V. E. 1976b. Identification of specific changes in the pattern of brain protein synthesis after training. *Science*, **193**, 1264–1266.
- SHASHOUA, V. E. 1977a. Brain protein metabolism and the acquisition of new behaviors. II. Immunological studies of the α , β and γ proteins of goldfish brain. *Brain Res*, **122**, 113–124.
- SHASHOUA, V. E. 1977b. Brain protein metabolism and the acquisition of new patterns of behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 1743–1747.
- SHASHOUA, V. E. 1977c. *Ependymins β : a brain protein metabolically linked with behavioral plasticity in goldfish*. IN: S. ROBERTS, A. LAJTHA AND W. H. GISPEN (eds.): *Mechanisms, regulation and special functions of protein synthesis in the brain*. 331–342. Elsevier, Amsterdam.
- SHASHOUA, V. E. 1981. Extracellular fluid proteins of goldfish brain: studies of concentration and labeling patterns. *Neurochem Res*, **6**, 1129–1147.
- SHASHOUA, V. E. 1982. *Molecular and cell biological aspects of learning: toward a theory of memory*. IN: S. FEDOROFF AND L. HERTZ (eds.): *Advances in Cellular Neurobiology*. **3**, 97–141. Academic Press, Inc., New York.
- SHASHOUA, V. E. 1985. The role of brain extracellular proteins in neuroplasticity and learning. *Cell Mol Neurobiol*, **5**, 183–207.
- SHASHOUA, V. E. 1988. Monomeric and polymeric forms of ependymin: a brain extracellular glycoprotein implicated in memory consolidation processes. *Neurochem Res*, **13**, 649–655.
- SHASHOUA, V. E. 1988-89. The role of ependymin in the development of long lasting synaptic changes. *J Physiol (Paris)*, **83**, 232–239.
- SHASHOUA, V. E. 1991. Ependymin, a brain extracellular glycoprotein, and CNS plasticity. *Ann N Y Acad Sci*, **627**, 94–114.
- SHASHOUA, V. E., & MOORE, M. E. 1978. Effect of antisera to β and γ goldfish brain proteins on the retention of a newly acquired behavior. *Brain Res*, **148**, 441–449.

- 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. *Biochem Biophys Res Commun*, **138**, 902–909.
- SHASHOUA, V. E., HESSE, G. W., & MILINAZZO, B. 1990. Evidence for the in vivo polymerization of ependymin: a brain extracellular glycoprotein. *Brain Res*, **522**, 181–190.
- SHASHOUA, V. E., NOLAN, P. M., SHEA, T. B., & MILINAZZO, B. 1992. Dibutyl cyclic AMP stimulates expression of ependymin mRNA and the synthesis and release of the protein into the culture medium by neuroblastoma cells (NB2a/d1). *J Neurosci Res*, **32**, 239–244.
- SHASHOUA, V. E., ADAMS, D., & BOYER-BOITEAU, A. 2001. CMX-8933, a peptide fragment of the glycoprotein ependymin, promotes activation of AP-1 transcription factor in mouse neuroblastoma and rat cortical cell cultures. *Neurosci Lett*, **312**, 103–107.
- SHASHOUA, V. E., ADAMS, D. S., VOLODINA, N. V., & LI, H. 2004. New synthetic peptides can enhance gene expression of key antioxidant defense enzymes in vitro and in vivo. *Brain Res*, **1024**, 34–43.
- SHEPARD, N., & MITCHELL, N. 1976. Simultaneous localization of proteoglycan by light and electron microscopy using Toluidine Blue O: a study of epiphyseal cartilage. *J Histochem Cytochem*, **24**, 621–629.
- SIMONS, K., & TOOMRE, D. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 31–39.
- SMITH, R. W., CASH, P., ELLEFSEN, S., & NILSSON, G. E. 2009. Proteomic changes in the crucian carp brain during exposure to anoxia. *Proteomics*, **9**, 2217–2229.
- SNEDDON, L. U., MARGARETO, J., & COSSINS, A. R. 2005. The use of transcriptomics to address questions in behaviour: production of a suppression subtractive hybridisation library from dominance hierarchies of rainbow trout. *Physiol Biochem Zool*, **78**, 695–705.
- SPIELER, R. E., NELSON, C. A., HUSTON, J. P., & MATTIOLI, R. 1999. Post-trial administration of H1 histamine receptor blocker improves appetitive reversal learning and memory in goldfish, *Carassius auratus*. *Neurosci Lett*, **277**, 5–8.
- SRINIVASAN, M., SEDMAK, D., & JEWELL, S. 2002. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol*, **161**, 1961–1971.
- STAHL, B., STEUP, M., KARAS, M., & HILLENKAMP, F. 1991. Analysis of neutral oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, **63**, 1463–1466.

- STEIN, J. M., & LUZIO, J. P. 1991. Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack on human neutrophils. The sorting of endogenous plasma-membrane proteins and lipids into shed vesicles. *Biochem J*, **274** (Pt 2), 381–386.
- STERRER, S., KÖNIGSTORFER, A., & HOFFMANN, W. 1990. Biosynthesis and expression of ependymin homologous sequences in zebrafish brain. *Neuroscience*, **37**, 277–284.
- STINSON, W. W., RICHTER, K. M., & SCHILLING, J. A. 1974. The fine structure of experimentally induced connective tissue complexes in the human. *Ann Surg*, **180**, 51–66.
- STIRLING, J. W. 1990. Immuno- and affinity probes for electron microscopy: a review of labeling and preparation techniques. *J Histochem Cytochem*, **38**, 145–157.
- STREISINGER, G., WALKER, C., DOWER, N., KNAUBER, D., & SINGER, F. 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, **291**, 293–296.
- STRUB, K., MOSS, J., & WALTER, P. 1991. Binding sites of the 9- and 14-kilodalton heterodimeric protein subunit of the signal recognition particle (SRP) are contained exclusively in the *Alu* domain of SRP RNA and contain a sequence motif that is conserved in evolution. *Mol Cell Biol*, **11**, 3949–3959.
- STRUCK, D. K., LENNARZ, W. J., & BREW, K. 1978. Primary structural requirements for the enzymatic formation of the N-glycosidic bond in glycoproteins. Studies with alpha-lactalbumin. *J Biol Chem*, **253**, 5786–5794.
- SUÁREZ-CASTILLO, E. C., & GARCÍA-ARRARÁS, J. E. 2007. Molecular evolution of the ependymin protein family: a necessary update. *BMC Evol Biol*, **7**, 23–42.
- SUÁREZ-CASTILLO, E. C., MEDINA-ORTÍZ, W. E., ROIG-LÓPEZ, J. L., & GARCÍA-ARRARÁS, J. E. 2004. Ependymin, a gene involved in regeneration and neuroplasticity in vertebrates, is overexpressed during regeneration in the echinoderm *Holothuria glaberima*. *Gene*, **334**, 133–143.
- TAN, S.-L., MOHD-ADNAN, A., MOHD-YUSOF, N. Y., FORSTNER, M. R. J., & WAN, K.-L. 2008. Identification and analysis of a prepro-chicken gonadotropin releasing hormone II (preprocGnRH-II) precursor in the Asian seabass, *Lates calcarifer*, based on an EST-based assessment of its brain transcriptome. *Gene*, **411**, 77–86.
- TAYLOR, J. S., BRAASCH, I., FRICKEY, T., MEYER, A., & VAN DE PEER, Y. 2003. Genome duplication, a trait shared by 22000 species of ray-finned fish. *Genome Res*, **13**, 382–390.
- TERZAKIS, J. A. 1968. Uranyl acetate, a stain and a fixative. *J Ultrastruct Res*, **22**, 168–184.
- THORMODSSON, F., ANTONIAN, E., & GRAFSTEIN, B. 1988. Extracellular glykoproteins of the goldfish optic tectum are labelled by intraocular Injection of 3H-proline. *Page 805 of: Society for Neuroscience*, vol. 14. 18th Annual Meeting Toronto, Canada.

- THORMODSSON, F. R., ANTONIAN, E., & GRAFSTEIN, B. 1992a. Extracellular proteins of goldfish optic tectum labeled by intraocular injection of ^3H -Proline. *Exp Neurol*, **117**, 260–268.
- THORMODSSON, F. R., PARKER, T. S., & GRAFSTEIN, B. 1992b. Immunochemical studies of extracellular glycoproteins (X-GPs) of goldfish brain. *Exp Neurol*, **118**, 275–283.
- TSANG, W. H., SHEK, K. F., LEE, T. Y., & CHOW, K. L. 2009. An evolutionarily conserved nested gene pair - *Mab21* and *Lrba/Nbea* in metazoan. *Genomics*, **94**, 177–187.
- TSIEN, R. Y. 1980. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*, **19**, 2396–2404.
- TSOI, S. C. M., EWART, K. V., PENNY, S., MELVILLE, K., LIEBSCHER, R. S., BROWN, L. L., & DOUGLAS, S. E. 2004. Identification of immune-relevant genes from atlantic salmon using suppression subtractive hybridization. *Mar Biotechnol*, **6**, 199–214.
- UYENO, T., & SMITH, G. R. 1972. Tetraploid origin of the karyotype of catostomid fishes. *Science*, **175**, 644–646.
- VANEGAS, H., LAUFER, M., & AMAT, J. 1974. The optic tectum of a perciform teleost. I. General configuration and cytoarchitecture. *J Comp Neurol*, **154**, 43–60.
- VOLZ, D. C., HINTON, D. E., LAW, J. MCHUGH, & KULLMAN, S. W. 2006. Dynamic gene expression changes precede dioxin-induced liver pathogenesis in medaka fish. *Toxicol Sci*, **89**, 524–534.
- VON FRISCH, K. 1942. Über einen Schreckstoff der Fischhaut und seine biologische Bedeutung. *Z vergl Physiol*, **29**, 46–145.
- VON HEIJNE, G. 1983. Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur J Biochem*, **133**, 17–21.
- VULLO, A., & FRASCONI, P. 2004. Disulfide connectivity prediction using recursive neural networks and evolutionary information. *Bioinformatics*, **20**, 653–659.
- WALTER, P., IBRAHIMI, I., & BLOBEL, G. 1981. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol*, **91**, 545–550.
- 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. *Cell Tissue Res*, **281**, 349–358.
- WELLER, T. H., & COONS, A. H. 1954. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated *in vitro*. *Proc Soc Exp Biol Med*, **86**, 789–794.

- WULLIMANN, M.F., RUPP, B., & REICHERT, H. 1996. *Neuroanatomy of the zebrafish brain - a topological atlas*. M. F. WULLIMANN (ed.) Birkhäuser Verlag, Berlin.
- YAMASHIMA, T., YAMASHITA, J., & TAKAHASHI, T. 1990. Pulmonary surfactant-like multi-lamellar bodies in human arachnoid villi. *J Hirnforsch*, **31**, 795–802.
- YEUNG, C.-M., MOJSOV, S., MOK, P.-Y., & CHOW, B. K. C. 2002. Isolation and structure-function studies of a glucagon-like peptide 1 receptor from goldfish *Carassius auratus*: identification of three charged residues in extracellular domains critical for receptor function. *Endocrinology*, **143**, 4646–4654.
- YUEN, E. Y., LIU, W., KARATSOREOS, I. N., FENG, J., MCEWEN, B. S., & YAN, Z. 2009. Acute stress enhances glutamatergic transmission in prefrontal cortex and facilitates working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 14075–14079.
- YURCHENCO, P. D., CHENG, Y. S., & COLOGNATO, H. 1992. Laminin forms an independent network in basement membranes. *J Cell Biol*, **117**, 1119–1133.
- ZENG, K., THOMPSON, K. E., YATES, C. R., & MILLER, D. D. 2009. Synthesis and biological evaluation of quinic acid derivatives as anti-inflammatory agents. *Bioorg Med Chem Lett*, **19**, 5458–5460.
- ZEUSCHNER, D., GEERTS, W. J. C., VAN DONSELAAR, E., HUMBEL, B. M., SLOT, J. W., KOSTER, A. J., & KLUMPERMAN, J. 2006. Immuno-electron tomography of ER exit sites reveals the existence of free COPII-coated transport carriers. *Nat Cell Biol*, **8**, 377–383.
- ZHANG, D., XIONG, H., MENNIGEN, J. A., POPESKU, J. T., MARLATT, V. L., MARTYNIUK, C. J., CRUMP, K., COSSINS, A. R., XIA, X., & TRUDEAU, V. L. 2009a. Defining global neuroendocrine gene expression patterns associated with reproductive seasonality in fish. *PLoS One*, **4**, e5816–e5826.
- ZHANG, D., POPESKU, J. T., MARTYNIUK, C. J., XIONG, H., DUARTE-GUTERMAN, P., YAO, L., XIA, X., & TRUDEAU, V. L. 2009b. Profiling neuroendocrine gene expression changes following fadrozole-induced estrogen decline in the female goldfish. *Physiol Genomics*, **38**, 351–361.
- ZHANG, Y.-B., & GUI, J.-F. 2004. Identification and expression analysis of two IFN-inducible genes in crucian carp (*Carassius auratus* L.). *Gene*, **325**, 43–51.
- ZOLLT, D. 2009. *Untersuchung der Ependymin-mRNA Synthese bei der Gedächtniskonsolidierung mittels radioaktiver in-situ Hybridisierung*. Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen.

6 Anhang

Automatische Befehlsfolgen (Makros) des Programms **analySIS**

I: Makros zur Zählung der Goldpartikel in einem definierten Bildausschnitt

```
KontrastMaximieren();
ShadingKorrektur();
Op.Display=1;
ROIsDefinieren$();
Op.Display=3;
GrauSchwellwerteSetzen$(Schwellwerte:=NULL, AutoName:=NULL);
Detektieren();
RahmenROIErgebnisse();
shSetSelection(0, SH_SEL_ROW, 1);
Kopieren();
Op.Display=1;
```

V_Faerbungen.sfm – Shading-Korrektur: Störungsursache Multiplikativ, Korrekturbild aus Quelle 1, Vorbehandlung mit NxN Mittelwertfilter - Iterationen 10 - Größe 3, Automatische Skalierung mit Überlaufanteil 0,1%; Schwellenwerte: manuell gesetzt; Detektion: Ausschluss von Partikeln - Minimum: 15 Pixel (Stratum periventriculare: 5 Pixel) - Löcher füllen - Benutzte Bereiche, Konnektivität der Pixel nur Seitenkanten (4), Randpartikel abschneiden, Suchbereich ROIs bzw. Rahmen.

```
Op.Display=1;
ROIsDefinieren$();
```

```
Op.Display=1;
Op.Dest=2;
KontrastMaximieren();
```

```
Op.Display=2;
Op.Dest=3;
ShadingKorrekturDefinieren(DateiName:="Shad MQ1-5-3N-01");
ShadingKorrektur();
```

```
Op.Display=3;
viewSetZoom(0,1);
```

```
Op.Display=3;
GrauSchwellwerteSetzen$(Schwellwerte:=NULL, AutoName:=NULL);
```

```
Op.Display=3;
Op.Dest=4;
GrauBildBinarisieren(Schwellwerte:=NULL, Phase:=0);
```

```
Op.Display=4;
Op.Dest=5;
Invertieren();
```

```

Op.Display=5;
Op.Dest=6;
BildKonvertierenBinärNach8Bit();

Op.Display=6;
{
    HTHRESHOLD hThr=thrLoad("Sw254");
    thrSave(hThr, NULL);
    thrDestroy(&hThr);
}
{
    #define DM_IGNORE        INVALID_DBL
    #ifnsym PARAMRANGE
    typedef struct tagParamRange
    {
        int    iID;
        double dRangeMin;
        double dRangeMax;
    } PARAMRANGE, * LPPARAMRANGE;
    #endif
    PARAMRANGE PartRange [] = {
        {M_PARTNO, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
        {M_CLASS, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
        {M_AREA, 80, 500},
        {101, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
    };
    PARAMRANGE ClassRange [] = {
        {M_CLASS_ID, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
        {M_CLASS_NUM, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
    };
    PARAMRANGE ROIsRange [] = {
        {M_ROI_NUM, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
        {M_AREA, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
    };
    anaSetMeasurementVectorEx (PartRange,
        sizeof (PartRange) / sizeof (PARAMRANGE),
        ANA_PARTICLE_SET);
    anaSetMeasurementVectorEx (ClassRange,
        sizeof (ClassRange) / sizeof (PARAMRANGE),
        ANA_CLASSALL_SET);
    anaSetMeasurementVectorEx (ROIsRange,
        sizeof (ROIsRange) / sizeof (PARAMRANGE),
        ANA_ROIALL_SET);
}
DetektionDefinieren(ROIs:=1, Rand:=ANA_BORDER_INCLUDE,
    Einschlüsse:=FALSE, MinPixel:=3, Min:=0, Max:=DBL_MAX,
    Einheit:="nm", Konnektivität:=ANA_CON_ADJBORDERS,
    BenutzeBereiche:=TRUE);
PartikelKlassifizieren(Kriterium:=101, Klasse:="Elongation",
    MinPixel:=100, PartikelStil:=0, BezeichnungsTyp:=0,
    BezeichnungsFarbe:=0, BezeichnungsNameAnzeigen:=FALSE,
    BezeichnungsEinheitAnzeigen:=TRUE);
Detektieren();
Partikelergebnisse();
docMinimize();
RahmenROIergebnisse();
shSetSelection(0, SH_SEL_ROW, 1);

```

```

Kopieren();
docMinimize();

Op.Display=6;
Op.Dest=1;
OverlayKopieren();

Op.Display=1;
AdjustImageZoom(101);

```

Einfache Partikeldetektion1m A.sfm – Shading-Korrektur: Störungsursache Multiplikativ, Korrekturbild aus Quelle 1, Vorbehandlung mit NxN Mittelwertfilter - Iterationen 5 - Größe 3, Automatische Skalierung mit Überlaufanteil 0,1 %; Schwellenwerte: manuell gesetzt; Detektion: Ausschluss von Partikeln - Minimum: 3 Pixel - Löcher füllen - Benutzte Bereiche, Konnektivität der Pixel nur Seitenkanten (4), Randpartikel eingeschlossen, Suchbereich Rahmen, Klassifizierung nach Merkmal Elongation: 1. Klasse bis 1,99 - 2. Klasse 2-3,49 - 3. Klasse über 3,5.

II. Makro zur Bestimmung der Goldpartikel, die auf den Membranen liegen

```

//MIT F5 STARTEN
Op.Display=1;
Op.Dest=2;
KontrastMaximieren();

Op.Display=2;
Op.Dest=3;
ShadingKorrekturDefinieren(DateiName:="Shad MQ1-5-3N-01");
ShadingKorrektur();

GrauSchwellwerteSetzen$(Schwellwerte:=NULL, AutoName:=NULL);

Op.Display=3;
Op.Dest=4;
GrauBildBinarisieren(Schwellwerte:=NULL, Phase:=0);

Op.Display=4;
Op.Dest=5;
Invertieren();

Op.Display=1;
Op.Dest=6;
Mittelwert();

Op.Display=6;
Op.Dest=7;
KontrastOptimieren(UntererÜberlauf:=2, ObererÜberlauf:=2);

Op.Display=7;
Op.Dest=8;
Trenner(Name:="Tr D0-5-50wg");

{
  HTHRESHOLD hThr=thrLoad("Sw65534");
  thrSave(hThr, NULL);
  thrDestroy(&hThr);
}

Op.Display=8;
Op.Dest=9;

```

```

GrauBildBinarisieren(Schwellwerte:=NULL, Phase:=0);

Op.Display=9;
Op.Dest=10;
fltSetBorderMode(FLT_BORDER_MIRROR);
bmpSetDimension(10,1024,1024,1);
HGLOBAL hStruct;
DWORD dwNewPixel, dwPreviousPixel;
WORD wSrc = Op.Source;
WORD wDst = Op.Dest;
dwNewPixel = 1L;
dwPreviousPixel = morSetBorderPixel(&dwNewPixel, sizeof (DWORD));
hStruct = morLoadStructEx ("Ero H3-3-aRs");
morErode( wSrc, wDst, hStruct);
morDestroyStruct (&hStruct);
morSetBorderPixel(&dwPreviousPixel, sizeof (DWORD));

Op.Display=5;
Op.Source2=10;
Op.Dest=11;
imgCalcExpression("Src1|Src2",,,, TRUE, TRUE);

Op.Display=11;
Op.Dest=12;
BildKonvertierenBinärNach8Bit();

{
    HTHRESHOLD hThr=thrLoad("Sw254");
    thrSave(hThr, NULL);
    thrDestroy(&hThr);
}

{
#define DM_IGNORE      INVALID_DBL
#define PARAMRANGE
typedef struct tagParamRange
{
    int    iID;
    double dRangeMin;
    double dRangeMax;
} PARAMRANGE, * LPPARAMRANGE;
#endif
PARAMRANGE PartRange [] = {
    {M_PARTNO, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
    {M_CLASS, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
    {M_AREA, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
    {101, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
    };
PARAMRANGE ClassRange [] = {
    {M_CLASS_ID, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
    {M_CLASS_NUM, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
    };
PARAMRANGE ROIsRange [] = {
    };
anaSetMeasurementVectorEx (PartRange,
    sizeof (PartRange) / sizeof (PARAMRANGE),
    ANA_PARTICLE_SET);

```

```

anaSetMeasurementVectorEx (ClassRange,
    sizeof (ClassRange) / sizeof (PARAMRANGE),
    ANA_CLASSALL_SET);
anaSetMeasurementVectorEx (ROIsRange,
    sizeof (ROIsRange) / sizeof (PARAMRANGE),
    ANA_ROIALL_SET);
}
//ENTSPRICHT DATEI: "Mes"

DetektionDefinieren(ROIs:=0, Rand:=ANA_BORDER_INCL50,
    Einschlüsse:=FALSE, MinPixel:=10, Min:=0, Max:=DBL_MAX,
    Einheit:="nm", Konnektivität:=ANA_CON_ADJBORDERS,
    BenutzeBereiche:=TRUE);
//ENTSPRICHT DATEI: "Det10Lf4R50"
PartikelKlassifizieren(Kriterium:=0, Klasse:="",
    MinPixel:=100, PartikelStil:=0, Bezeichnungstyp:=0,
    Bezeichnungsfarbe:=0, BezeichnungNameAnzeigen:=FALSE,
    BezeichnungseinheitAnzeigen:=FALSE);
Detektieren();
Klassenergebnisse$();
docMinimize();
//=MEMBRANPARTIKEL

Op.Display=5;
Op.Dest=13;
BildKonvertierenBinärNach8Bit();

{
    HTHRESHOLD hThr=thrLoad("Sw254");
    thrSave(hThr, NULL);
    thrDestroy(&hThr);
}

{
#define DM_IGNORE        INVALID_DBL
#define PARAMRANGE
typedef struct tagParamRange
{
    int    iID;
    double dRangeMin;
    double dRangeMax;
} PARAMRANGE, * LPPARAMRANGE;
#endif
PARAMRANGE PartRange [] = {
    {M_PARTNO, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
    {M_CLASS, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
    {M_AREA, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
    {101, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
    };
PARAMRANGE ClassRange [] = {
    {M_CLASS_ID, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
    {M_CLASS_NUM, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
    };
PARAMRANGE ROIsRange [] = {
    };
anaSetMeasurementVectorEx (PartRange,
    sizeof (PartRange) / sizeof (PARAMRANGE),

```

```

    ANA_PARTICLE_SET);
    anaSetMeasurementVectorEx (ClassRange,
        sizeof (ClassRange) / sizeof (PARAMRANGE),
        ANA_CLASSALL_SET);
    anaSetMeasurementVectorEx (ROIsRange,
        sizeof (ROIsRange) / sizeof (PARAMRANGE),
        ANA_ROIALL_SET);
}
//ENTSPRICHT DATEI: "MesFLELO"

DetektionDefinieren(ROIs:=0, Rand:=ANA_BORDER_INCL50,
    Einschlüsse:=FALSE, MinPixel:=10, Min:=0, Max:=DBL_MAX,
    Einheit:="nm", Konnektivität:=ANA_CON_ADJBORDERS,
    BenutzeBereiche:=TRUE);
//ENTSPRICHT DATEI: "Det10Lf4R50"
PartikelKlassifizieren(Kriterium:=101, Klasse:="Elongation",
    MinPixel:=100, PartikelStil:=0, BezeichnungTyp:=0,
    Bezeichnungsfarbe:=0, BezeichnungNameAnzeigen:=FALSE,
    BezeichnungseinheitAnzeigen:=FALSE);
Detektieren();
Klassenergebnisse$();
docMinimize();
Partikelergebnisse();
docMinimize();
//=ALLE PARTIKEL - KLASSENGRENZEN: 1=1-1,99; 2=2-3,49; 3=3,5-20

Op.Display=10;
Op.Dest=14;
BildKonvertierenBinärNach8Bit();

{
    HTHRESHOLD hThr=thrLoad("Sw254");
    thrSave(hThr, NULL);
    thrDestroy(&hThr);
}

{
    #define DM_IGNORE        INVALID_DBL
    #ifnsym PARAMRANGE
    typedef struct tagParamRange
    {
        int    iID;
        double dRangeMin;
        double dRangeMax;
    } PARAMRANGE, * LPPARAMRANGE;
    #endif
    PARAMRANGE PartRange [] = {
        {M_PARTNO, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
        {M_CLASS, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
        {M_AREA, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
        {101, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
    };
    PARAMRANGE ClassRange [] = {
        {M_CLASS_ID, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
        {M_CLASS_NUM, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
        {M_CLASS_ROIFRAC, DM_IGNORE, DM_IGNORE},
    };
}

```

```

PARAMRANGE ROIsRange [] = {
    };
anaSetMeasurementVectorEx (PartRange,
    sizeof (PartRange) / sizeof (PARAMRANGE),
    ANA_PARTICLE_SET);
anaSetMeasurementVectorEx (ClassRange,
    sizeof (ClassRange) / sizeof (PARAMRANGE),
    ANA_CLASSALL_SET);
anaSetMeasurementVectorEx (ROIsRange,
    sizeof (ROIsRange) / sizeof (PARAMRANGE),
    ANA_ROIALL_SET);
}
//ENTSPRICHT DATEI: "MesFLANT"

DetektionDefinieren(ROIs:=0, Rand:=ANA_BORDER_INCLUDE,
    Einschlüsse:=TRUE, MinPixel:=3, Min:=0, Max:=DBL_MAX,
    Einheit:="Pixel", Konnektivität:=ANA_CON_ADJBORDERS,
    BenutzeBereiche:=TRUE);
//ENTSPRICHT DATEI: "Det3Lf4R50" MIT RAND EINBEZIEHEN
PartikelKlassifizieren(Kriterium:=0, Klasse:="",
    MinPixel:=100, PartikelStil:=0, BezeichnungsTyp:=M_AREA,
    BezeichnungsFarbe:=0, BezeichnungsNameAnzeigen:=FALSE,
    BezeichnungsEinheitAnzeigen:=TRUE);
Detektieren();
Klassenergebnisse$();
docMinimize();
//=MEMBRANANTEIL

Op.Display=9;
Op.Dest=15;
CmdRGBAnpassungAusführen(DateiName:="RGBVario",
    MaskeInvertieren:=FALSE);

Op.Display=15;
Op.Dest=16;
BittiefeIn24BitÄndern();

Op.Display=1;
Op.Dest=17;
BittiefeIn24BitÄndern();

Op.Display=16;
Op.Source2=17;
Op.Dest=18;
imgCalcExpression("Src1&Src2",,,, TRUE, TRUE);

Op.Display=18;
PartikelZeichnen();

docActivate("MembranpartikelMW.sfm");
Schließen(Bestätigen:=TRUE);

```

MembranpartikelMWm.sfm – Shading-Korrektur: Störungsursache Multiplikativ, Korrekturbild aus Quelle 1, Vorbehandlung mit NxN Mittelwertfilter - Iterationen 5 - Größe 3, Automatische Skalierung mit Überlaufanteil 0,1 %; Schwellenwerte: manuell gesetzt; Trenner: Grenztyp dunkel, Sigma 0, Glätten 5, Fein/Grob 50, Ergebnis in weiß/grau; Morphologischer Filter: Erosion mit Form Hex. Gitter, Größe 3, Iterationen 3, Außenrand am Rand spiegeln; Image Calculation: | = ODER, & = UND; Detektion: Ausschluss von Partikeln - Minimum: 10 Pixel - Löcher füllen - Benutzte Bereiche, Konnektivität der Pixel nur Seitenkanten (4), 50 % der Randpartikel eingeschlossen, Suchbereich Rahmen.

Ich *danke* Herrn Schmidt für unzählige Dinge, die weit über die Bereitstellung dieses wunderbaren Themas hinausgehen.

Bei Herrn Dorresteijn *bedanke* ich mich für die prompte Zusage sich zu einer unvermittelt vorbeischauenden Doktorarbeit als Gutachter anzubieten.

Ich *danke* vor allem Michael vom I. Physikalischen Institut für die spektakuläre Messung des Emissionsspektrums, Elise für die bereitwillige Translation mathematischer Hieroglyphen, sowie Martin für sein immerwährendes Geschenk, dass Textverarbeitung Spaß machen kann.

Einen großen *Dank* spreche ich Herrn Hardt für seine spontanen Unterstützungen in verzweifelten und sehr verzweifelten Lagen aus.

Dave *danke* ich für seine kameradschaftliche und konstruktive Diskussionsbereitschaft.

Allen einstigen und jetzigen Mitwirkenden der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit *danke* ich für ihre Menschlichkeit in turbulenten Zeiten.

Meiner werten Frau Heike *danke* ich für ihre fortwährende Unterstützung und Zuversicht für meine Doktorarbeit.

Ich *danke* Gott dem Herrn und meiner Mutter, die mich zu dem gemacht haben, was ich heute bin. Beide haben mich auf meinen Pfaden stets unterstützt, so dass ich deren Rückhalt immer gewiss sein werde.

Ceren. Es würden Jahre verstreichen Dir zu *danken*. Oder nur den Bruchteil einer Sekunde.

Mein besonderer *Dank* gilt nicht zuletzt dem Teufel, der mich dazu verleitet hat, über meine Ängste zu springen und am Rande des Möglichen zu wachsen.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, dass alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Quellen übernommen wurden, als solche kenntlich gemacht sind und dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Gießen, den 22. März 2011