

Biochemie molekularer Mechanismen der Gedächtnisbildung nach
einer Belohnungsdressur an Cypriniden

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 08 - Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Justus-Liebig-Universität
Gießen

von
Bernd Holtmann
aus Georgsmarienhütte

Gießen 2002

Danksagung

Herrn Prof. Dr. R. Schmidt danke ich für die Überlassung des Themas und die stete Diskussionsbereitschaft sowie für die andauernde, freundliche und kompetente Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. W. Clauß danke ich für seine Beschäftigung mit der vorliegenden Arbeit.

Ich bedanke mich bei Cornelia für ihre vielseitige und liebevolle Unterstützung sowie ihre Geduld während der Fertigstellung dieser Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Martin Hardt für seine ständige Diskussionsbereitschaft sowie seine moralische Unterstützung. Dankbar bin ich auch Birgit Meyer für die emsige Hilfe bei der Erstellung der RIAs. Beiden danke ich für die Entfaltung eines angenehmen Betriebsklimas.

Der spezielle inneruniversitäre Dank geht an Herrn Weigand für seine Unterstützung bei technischen Fragen und an Herrn Euler und die Mitarbeiter der Elektronikwerkstatt sowie an Herrn Peppler für die fachkundige Erstellung der automatisierten Versuchsanlage.

Frank Lauterbach und der Familie Exner danke ich ganz besonders für die liebevolle Aufnahme und Unterstützung sowie den letzten Motivationsschub bei der Fertigstellung der Arbeit. Mein spezieller Dank geht an Nicola für die fachkundige Sachkenntnis in grammatikalischen und orthografischen Fragen.

Der spezielle außeruniversitäre Dank geht an Hannelore, Kai, Madita, Brutus und Corvus Brandhorst für ihre moralische Unterstützung und inspirierende Ablenkung.

Ich danke auch Herrn Caspar Rottmann für die großzügige Bereitstellung des Schreibutensils.

Die Sachmittel des Projektes wurden freundlicherweise von der DFG zur Verfügung gestellt.

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Das Versuchstier	1
1.2 Konditionierung	2
1.3 Gedächtnisformen	5
1.4 Zelladhäsionsmoleküle, Ependymin und Gedächtnisbildung	7
1.5 Rekonsolidierung	11
1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	12
2. Material und Methoden	14
2.1 Chemikalien	14
2.2 Haltung	15
2.3 Konditionierung	15
2.3.1 Eingewöhnung	16
2.3.2 Belohnungsdressur	17
2.3.3 Rotdressur	19
2.3.4 Automatisierung der futterbelohnten Farbunterscheidungsdressur	22
2.3.5 Erinnerungstest und Quantifizierung der Erinnerung	24

2.4	Injektionen	25
2.4.1	Puromycin-Injektionen	25
2.4.2	Antikörper-Injektionen	27
2.5	Ependyminisolierung und -aufreinigung	27
2.5.1	Gehirnentnahme	27
2.5.2	Isolierung der Extrazellulärflüssigkeit (ECF).	28
2.5.3	Gewinnung der cytoplasmatischen Fraktion.	28
2.5.4	Chromatographische Trennung	28
2.5.5	Gelelektrophorese	29
2.5.6	Puffer und Lösungen	30
2.6	Ependymin-Antiseren.	32
2.7	Bestimmung des Ependymingehaltes mittels Radioimmunoassay (RIA)	33
2.7.1	Protein-Jodierung	33
2.7.2	Vorbereitung der Proben für den RIA	35
2.7.3	Ansatz des RIA	36
2.8	Proteinbestimmung nach Lowry	38
2.9	Versuche zur Kälteeinwirkung auf den cerebralen Ependymingehalt	38
2.10	Versuche zur Kartierung der Gehirnaktivität bei der Farbdressur mit [¹⁴ C]-2-Desoxyglukose	39
2.11	Statistische Auswertung	41

3.	Ergebnisse	43
3.1	Verhaltensversuche	43
3.1.1	Lernverhalten	43
3.1.2	Unterschiede in der Erlernbarkeit der Farbunterscheidungsdressuren	43
3.1.3	Einfluss von injiziertem Puromycin auf die Gedächtnisbildung	45
3.1.4	Einfluss von Injektionen mit anti-Ependymin-Antikörpern auf die Gedächtnisbildung	47
3.1.5	Erinnerungsdauer nach Erlernen der Farbunterscheidungsdressur	52
3.2	Umverteilung des Ependymins nach dem Lernen	53
3.2.1	Ependymingehalt der Extrazellulärflüssigkeit (ECF) 5,5 Stunden nach der Farbunterscheidungsdressur	54
3.2.2	Ependymingehalt der cytoplasmatischen Fraktion 5,5 Stunden nach der Farbunterscheidungsdressur	55
3.2.3	Ependymingehalt der Extrazellulärflüssigkeit (ECF) 9 Stunden nach der Farbunterscheidungsdressur	56
3.2.4	Ependymingehalt der cytoplasmatischen Fraktion 9 Stunden nach der Farbunterscheidungsdressur	56
3.2.5	Kälteeinfluss auf den Ependymingehalt	58
3.3	Stoffwechselaktivität des Gehirns während der Farbunterscheidungsdressur	59
4.	Diskussion	66
4.1	Das visuelle System der Teleostier	66
4.2	Beteiligung cerebraler Strukturen am Erlernen der futterbelohnten Farbunterscheidungsdressur.	71
4.3	Der Goldfisch als Objekt der Verhaltens- und Gedächtnisforschung	77

4.4	Farbensehen bei Goldfischen	80
4.5	Wirkung von injiziertem Puromycin nach der operanten Farbunterscheidungsdressur	82
4.5.1	Wirkung von injiziertem Puromycin auf die Gedächtniskonsolidierung	82
4.5.2	Wirkung von injiziertem Puromycin auf Erinnerungsprozesse (Rekonsolidierungshypothese)	85
4.6	Wirkung von injizierten anti-Ependymin-Antikörpern auf die Gedächtnis- konsolidierung	86
4.7	Ependymin-Turnover	89
4.7.1	ECF- und cytoplasmatische Ependymingehalte nach einer futterbelohnten Farbunterscheidungsdressur	89
4.7.2	ECF- und cytoplasmatische Ependymingehalte nach Abkühlungs- experimenten	93
4.8	Stresseinflüsse auf die Gedächtnisbildung	94
4.9	Ausblicke und offene Fragen.	97
5.	Zusammenfassung	99
6.	Literaturverzeichnis	101

Abkürzungsverzeichnis

AP1	activating protein-1
BO	Bulbus olfactorius
CAM	cell adhesion molecule
CB	Cerebellum
CR	conditioned reaction
CREB	cAMP responsive-element binding
CS	conditioned stimulus
DL	dorso-lateraler Teil des Telencephalon
DLT	Nucleus dorsolateralis tegmenti
DM	dorso-medialer Teil des Telencephalon
ECF	Extrazellulärflüssigkeit
HNK	human natural killer cell
IEG	immediate early gene
IgG	Immunoglobulin G
LF	Lobus facialis
LV	Lobus vagi
MAG	myelin-associated glycoprotein
ME	Medulla
mRNA	messenger-RNA
NCAM	neural cell adhesion molecule
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NPSM	Nucleus pretectalis superficialis magnocellularis
NS	neutral stimulus
OT	Tectum opticum
PPA	parvozellulärer präoptischer Nucleus
PSA	Polysialinsäuren
RV	rhombencephaler Ventrikel
SAC	Stratum album centrale
SE	Stratum ependymale
SFGS	Stratum fibrosum et griseum superficiale
SGC	Stratum griseum centrale
SM	Stratum marginale
SO	Stratum opticum

SPV	Stratum periventriculare
TE	Telencephalon
TG	Tegmentum
TL	Torus longitudinalis
TS	Torus semicircularis
RIA	Radioimmunoassay
UR	unconditioned reaction
US	unconditioned stimulus
VC	Valvula cerebelli
VE	tectaler Ventrikel
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1 Das Versuchstier

Der Goldfisch (*Carassius auratus auratus* LINNÉ 1758) wurde in China schon vor mehr als 1000 Jahren aus der orangefarbenen Varietät des Giebels (*Carassius auratus gibelio* BLOCH 1783), auch Silberkarausche genannt, gezüchtet. Die ursprüngliche Verbreitung des Giebels ist Ostasien, vom Amur bis Hinterindien, wobei er heutzutage durch Aussetzen in Ost-, Mittel- und Nordeuropa verbreitet ist (PENCES & TÖLG, 1993; RIEHL & BAENSCH, 1996). Lebensraum des Giebels sind Moore, Sümpfe, Seen und die Totarme von Flüssen. So ist auch die Fähigkeit des Goldfisches, ausgedehnte Anoxien zu tolerieren (WALKER & JOHANSEN, 1977; JOHANSSON, et al. 1997) als Adaptation an den Lebensraum seines Vorfahren zu erklären. Die ersten chinesischen Goldfische kamen 1691 nach Europa, 1850 kamen die ersten Goldfische nach Amerika. Als beliebter Zierfisch ist der Goldfisch nahezu über die ganze Welt verbreitet. Der Goldfisch wurde in den letzten Jahrzehnten nicht nur als Zierfisch sondern auch als wichtiges Versuchstier in Medizin und Biologie gehalten. Aufgrund seiner guten Lernfähigkeit und der einfachen Haltungsbedingungen eignet sich der Goldfisch ausgezeichnet für Verhaltensexperimente zur Gedächtnisbildung (vgl. AGRANOFF & KLINGER, 1964; AGRANOFF et al., 1965).



Abb. 1. Der Goldfisch.

1.2. Konditionierung

DUDEL und Mitarbeiter definieren Lernen als die Fähigkeit, das Verhalten aufgrund individueller Erfahrung so zu verändern, dass es veränderten Situationen besser angepasst ist (DUDEL et al., 1996). LORENZ (1969, 1973) bezeichnet Lernen als adaptive Verhaltensmodifikation. Die durch Lernprozesse bewirkten Verhaltensänderungen sind adaptiv und tragen zum Überleben des Individuums bei. Für das Tier (auch den Menschen) bedeutet Lernen, dass Ereignisse in einen Ursache-Wirkungs-Zusammenhang gebracht werden. Ereignisse erhalten zusätzliche Bedeutung durch Assoziationen und dieser Informationsgewinn steht auch noch nach langen Zeitintervallen dem Tier (Menschen) als Gedächtnis zur Verhaltenssteuerung zur Verfügung (DUDEL et al., 1996).

Assoziative Lernvorgänge werden den einfachen, nicht assoziativen Lernvorgängen Habituation und Sensitivierung gegenübergestellt. Bei der Habituation lernt ein Tier, dass ein Stimulus keine relevante Bedeutung hat. So lernen z. B. Stare, dass das wiederholte Auslösen von Schussgeräten in Weinbergen für sie keine Folgen hat, und lassen sich dadurch dann nicht mehr vertreiben. Bei der Sensitivierung werden die Tiere "aufmerksam" auf Reize, die sonst als unwesentlich eingestuft werden (REICHERT, 1990). Beispielsweise kann bei der Meeresschnecke *Aplysia* der durch schwache taktile Reizung ausgelöste Kiemenrückziehreflex in Amplitude und Zeitverlauf verstärkt werden, wenn er nach einer starken Reizung des Kopfes erfolgt (REICHERT, 1990). Bei der Habituation und der Sensitivierung entstehen aber weder neue Bedeutungsverknüpfungen zwischen verschiedenen Reizen noch zwischen Reizen und Reaktionen (MCFARLAND, 1989).

Neue Bedeutungsverknüpfungen entstehen dagegen bei der klassischen und der operanten Konditionierung. Bei der klassischen Konditionierung oder Pawlow-Konditionierung (PAWLOW, 1927, 1928) wird eine Assoziation zwischen dem konditionierten Stimulus (conditioned stimulus = CS) und dem unkonditionierten Stimulus (unconditioned stimulus = US) gebildet. Dabei wird der ursprünglich neutrale Stimulus (neutral stimulus = NS) in der Konditionierung zum konditionierten Stimulus (CS), und die unkonditionierte Reaktion (unconditioned reaction = UR) zur konditionierten Reaktion (conditioned reaction = CR) (MCFARLAND, 1989). Nachfolgend wird also eine Assoziation zwischen dem konditionierten Stimulus (CS) und der Reaktion gebildet (UR = CR). In einem typischen Experiment zeigte PAWLOW, dass ein Hund, dem man mehrmals Futter begleitet von Klingelzeichen anbot,

auf das Klingelzeichen allein mit Speichelfluss reagierte. Der Hund hatte also eine Assoziation zwischen dem Klingelzeichen und dem Futter gebildet, wobei das ursprünglich neutrale Klingelzeichen (NS) zum konditionierten Stimulus (CS) wurde, und der Hund nun mit Speichelfluss, der konditionierten Reaktion (CR) reagierte. Folgendes Schema lässt sich also beispielhaft darstellen:

1)	(Klingel)	NS	→	UR	(Speichelsekretion)
2)	(Futter)	US	→	UR	(Speichelsekretion)
3)	(Klingel)	NS, (Futter) US	→	UR	(Speichelsekretion)
4)	(Klingel)	CS	→	CR = UR	(Speichelsekretion)

ad 1) die Klingel allein löst keine Speichelsekretion aus

ad 2) das Anbieten von Futter löst Speichelsekretion aus

ad 3) Klingel und anschließendes Futteranbieten lösen Speichelsekretion aus

ad 4) die Klingel allein löst Speichelsekretion aus

Der konditionierte Stimulus (CS) wird in der Akquisitionsphase zum Prädiktor für das Tier, dass heißt, er kündigt dem Tier das Erscheinen des unkonditionierten Stimulus (US) an. Der unkonditionierte Stimulus kann auch als Verstärker aufgefasst werden, weil er für das Tier eine Bedeutung hat (verstärkende Wirkung des Futters für ein hungriges Tier = verstärkende Wirkung des US). Es kommt entweder ein bestrafender oder ein belohnender Verstärker in Betracht. Wird ein Konditionierungsexperiment mit belohnenden Verstärkern durchgeführt, handelt es sich um eine appetitive Konditionierung. Als belohnende Verstärker können u. a. Futter oder auch Paarungspartner eingesetzt werden. Wird ein bestrafender Verstärker eingesetzt, wird die Konditionierung als aversive Konditionierung bezeichnet. Als bestrafende Verstärker können z. B. Elektroschocks eingesetzt werden.

Nicht alle Reize können frei miteinander assoziiert werden, sondern es bestehen diesbezüglich Lerndispositionen. Z. B. erlernen Ratten die Assoziation eines Tones mit Elektroschocks oder die eines Geschmacks mit Übelkeit, erlernen aber nie die Assoziation eines Tones mit Übelkeit (GARCIA et al., 1974). Tiere sind somit artspezifisch auf die Bildung bestimmter CS-US-Assoziationen vorbereitet (ALCOCK, 1993). In klassischen Konditionierungen lassen sich auch vegetative Reaktionen (z. B. Pupilleneinstellungen, Herzschlag- und Atemfrequenz) als konditionierte Reaktionen mit Signalreizen assoziieren. Mittels Elektroschocks lassen sich beispielsweise curarisierte Goldfische auf das

Aufleuchten eines roten Lichtsignals konditionieren und reagieren darauf hin mit einer Abnahme der Atemfrequenz (SCHLUMPF & DAVIS, 1985; XU & DAVIS, 1992; XU, 1997) oder der Herzschlagfrequenz (BEAUCHAMP & ROWE, 1977).

Ein Charakteristikum der klassischen Konditionierung ist die zeitliche Paarung oder Kontiguität der Assoziation zwischen dem konditionierten Stimulus (CS) und dem unkonditionierten Stimulus (US), wobei der CS dem US vorausgehen muss.

Neben der klassischen Konditionierung als assoziativer Lernform existiert die operante Konditionierung (MCFARLAND, 1989). Die operante Konditionierung wird von verschiedenen Autoren auch als instrumentelles Lernen bezeichnet (HINDE, 1973; MCFARLAND, 1989). Erste Beschreibungen operanten Lernens stammen von THORNDIKE (1911), der Katzen beobachtete, die sich aus Käfigen befreiten. Führte eine dieser Aktionen zum Erfolg, wurde sie beim zweiten Einsperren sicherer und schneller durchgeführt. SKINNER (1938) entwarf die Skinner-Box, in der eine Ratte das Herunterdrücken eines Hebels lernte, um sich eine Futterbelohnung zu verschaffen.

Bei der operanten Konditionierung bildet das Tier eine Assoziation zwischen einer Verhaltensaktion und dem Verstärker (z. B. einer Belohnung). Die Verhaltensaktion kann aus jeder Verhaltensweise bestehen, die eine Belohnung bewirkt, wie z. B. dem Durchlaufen eines Labyrinthes oder dem Drücken eines Hebels. Die Belohnung kann beim operanten Konditionieren als das Ereignis definiert werden, das die Frequenz der Reaktion steigert (HINDE, 1973). Ein operantes Konditionierungsexperiment kann auch erweitert werden. So lernt z. B. eine Ratte auf die Gabe verschiedener Stimuli hin, ein bestimmtes Verhalten zu zeigen. Sie kann beispielsweise mit Futter belohnt werden, wenn sie nach Aufleuchten eines roten Lämpchens einen Hebel herunterdrückt, erhält aber einen Elektroschock, wenn sie nach Aufleuchten eines grünen Lämpchens den Hebel herunterdrückt. Dabei wird folgende Reiz-Reaktionskette etabliert:

S_2 (Farbe) \rightarrow R (Hebel drücken) \rightarrow S_1 (z. B. Futter o. Stromstoß)

(S_1 = Verstärker; S_2 = Stimulus; R = konditionierte Reaktion)

Im Gegensatz zur klassischen Konditionierung muss ein Tier in einer operanten Konditionierung agieren, bevor ein verstärkender Stimulus wirkt (MCFARLAND, 1989). Mehrere operante Konditionierungsexperimente an Goldfischen sind im Zusammenhang mit der Gedächtnisforschung entwickelt worden. WOOLF und Mitarbeiter (WOOLF et al., 1974) entwickelten ein operantes Floßtraining, wobei dem Goldfisch ein Styroporfloß an der Basis der Bauchflossen befestigt wurde. Der Fisch musste nun lernen, trotz des Auftrieb erzeugenden Floßes aufrecht zu schwimmen (s. auch SHASHOUA & MOORE, 1978; SHASHOUA, 1985; SCHMIDT, 1987). LAUDIEN und Mitarbeiter entwickelten eine futterbelohnte Farbdressur, bei der zwei Futterstellen Rot oder Grün beleuchtet werden konnten. Nur an der rotbeleuchteten erhielt der Fisch Futter (vgl. LAUDIEN, 1975, 1977; SCHARPEKANT, 1979; SCHARPEKANT & LAUDIEN, 1980; LAUDIEN et al., 1986). NEUMEYER (1988) entwickelte mit Hilfe von Futterbelohnungen durchgeführte Farbdressurexperimente, mit denen spektrale Empfindlichkeitsmaxima bei Goldfischen detektiert werden konnten. Dazu wurden Goldfische auf eine Farbe dressiert und mussten im Test dann zwischen zweien auswählen.

Da für einen Goldfisch bei den beiden zuletzt erwähnten Farbdressuren bei nur zwei Wahlmöglichkeiten die Zufallswahrscheinlichkeit einer richtigen Wahl bei 50 % lag, sollte für die Gedächtnisuntersuchungen der vorliegenden Arbeit eine Farbdressur entwickelt werden, die folgende Bedingungen erfüllt: Sie sollte stressarm sein und die Wahrscheinlichkeit einer richtigen Wahl sollte geringer, also die Aufgabe für den Fisch schwieriger sein, so dass man exaktere Ergebnisse in Erinnerungsversuchen erhält.

Zusammenfassungen zum klassischen und operanten Konditionierungslernen liefern HINDE (1973), MCFARLAND (1989) und WASSERMAN und MILLER (1997).

1.3 Gedächtnisformen

Lernen führt laut DUDEL und Mitarbeitern (DUDEL et al., 1996) zu Veränderungen in der Verschaltung des Nervensystems, und das Gedächtnis ist das Andauern dieser Veränderungen über die Zeit sowie ihr Wirksamwerden zu einem späteren Zeitpunkt. Erlerntes steht somit zum Abrufen bereit. Die Einspeicherung von Gedächtnisinhalten erfolgt in mehreren Stufen. Stimuli, die vom sensorischen Apparat des Tieres (Menschen) aufgenommen werden, werden in einen sensorischen Speicher aufgenommen und für einige Sekunden erhalten. Während dieser Zeit findet in einem Lernvorgang die Assoziation mit

anderen Reizen und/oder mit inneren Zuständen des Tieres statt. Ein Teil der Information wird anschließend im Kurzzeitgedächtnis abgespeichert, das durch seine begrenzte Speicherkapazität und die Störanfälligkeit gegenüber anderen Ereignissen und amnestischen Einwirkungen, wie Elektroschocks, Anaesthetie und Unterkühlung, charakterisiert ist. Das Kurzzeitgedächtnis von Invertebraten und Vertebraten basiert nach Auffassung von STORK und WELZL (1999) auf transienten Modifikationen vorhandener Moleküle, hauptsächlich Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Enzymen, Rezeptoren und Ionenkanälen. Folglich kommt es zu Veränderungen an Proteinen der Synapse, wodurch die Effizienz der synaptischen Transmission modifiziert wird (AGRANOFF et al., 1999).

Im Gegensatz zum Kurzzeitgedächtnis ist die Bildung des Langzeitgedächtnisses von der *de novo* Proteinsynthese abhängig. Die Informationsübertragung vom Kurzzeitgedächtnis auf das Langzeitgedächtnis kann durch RNA- und Proteinsynthese-Inhibitoren verhindert werden (DAVIS & SQUIRE, 1984; DUDAI, 1996; AGRANOFF et al., 1999). Die Bildung des Langzeitgedächtnisses (Konsolidierung) beinhaltet langandauernde Veränderungen der synaptischen Effizienz und morphologische Veränderungen der zuvor aktivierten Neurone. Es kommt zu strukturellen Rearrangements von Synapsen (TISCHMEYER & GRIMM, 1999) und zu einer komplexen Folge zellulärer Vorgänge, wie der Aktivierung von Second-Messenger-Kaskaden, der posttranslationalen Modifikation von Proteinen und der Regulierung der Gen-Expression (DEZAZZO & TULLY, 1995; BAILEY et al., 1996; SCHUMAN, 1997). Auf diese Weise wird ein zunächst dynamisches Engramm in ein strukturelles überführt. Dieser Vorgang wird als Konsolidierung bezeichnet (Übersicht: MCGAUGH, 2000).

Die an Lernvorgängen beteiligte Proteinsynthese läuft wahrscheinlich in zwei Phasen ab (GOELET et al., 1986; DUDAI, 1996). Die Analyse von Zeitverläufen der Blockierbarkeit eines Gedächtnisses durch Drogen und bei Mutanten während der ersten Stunden nach dem Training lässt mehrere Wellen der Proteinsynthese vermuten (ROSE, 1995; DUDAI, 1996).

In Studien mit Zellkulturen (GREENBERG et al., 1986; MILBRANDT, 1987) konnte ein Puls anwachsender Gentranskription beobachtet werden, der innerhalb von Minuten nach neuronaler Stimulation und Aktivität einsetzt (CLAYTON, 2000). Dieses Phänomen einer schnellen genomischen Antwort auf eine Stimulation wird als "immediate early gene" (IEG) Aktivierung (GOELET et al., 1986; DUDAI, 1996), neuerdings auch als genomisches Aktionspotential (CLAYTON, 2000) bezeichnet. Die Induktion von IEGs geschieht innerhalb von

Minuten und ist vorübergehend. Produkte der IEGs sind Transkriptionsfaktoren wie c-Fos, c-Jun oder Jun-B. Diese Proteine regulieren im Zellkern die Transkription von "Target-Genes". Transkriptionsfaktoren binden z. B. an die (activating protein-1) AP-1-Konsensusstelle, die sich im Promotor vieler Gene befindet, oder bilden Komplexe mit Transkriptionsfaktoren, wie z. B. CREB (Überblick: TISCHMEYER & GRIMM, 1999). Die Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses nach einer Vermeidendressur bei Ratten benötigt z. B die Expression von C/EBP ("CCAAT enhancer binding protein transcription factor"), eines Transkriptionsfaktors (TAUBENFELD et al., 2001). Die Blockierung der CREB-Expression bei Ratten verhindert die Gedächtnisbildung (GUZOWSKI & MCGAUGH, 1997). IEGs schalten "late response genes" an, die Zielgene, deren Produkte in einer späteren Welle der Proteinsynthese synthetisiert werden. Dabei handelt es sich sehr wahrscheinlich um Effektormoleküle, die an der Modifikation der synaptischen Struktur beteiligt sind (STORK & WELZL, 1999).

1.4 Zelladhäsionsmoleküle, Ependymin und Gedächtnisbildung

Zu den durch IEGs eingeschalteten Effektormolekülen gehören u. a. Zelladhäsionsmoleküle (CAMs), wie NCAM, L1 und Cadherin (Übersicht: ROSE, 1995 a, 1995 b; FIELDS & ITOH, 1996; SCHACHNER & MARTINI, 1995; SCHACHNER, 1997; RØNN et al., 1998; RØNN et al., 2000). CAMs spielen bei der neuronalen Regeneration und der durch Lernen induzierten neuronalen Plastizität, die dem Lernen und Gedächtnis zu Grunde liegt, eine wichtige Rolle. So beeinflussen anti-L1-Antikörper und anti-NCAM-Antikörper das räumliche Lernen bei Ratten (ARAMI et al., 1996). Anti-L1-Antikörper-Injektionen produzieren bei Hühnern während bestimmter Zeitfenster Defizite in einer diskriminativen Aufgabe (TIUNOVA et al., 1998). Cadherin-11-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Langzeitpotenzierung (MANABE et al., 2000), ein Paradigma, das als Mechanismus für lernbezogene Anpassungen der synaptischen Aktivität oder auch als ein Teilmechanismus der Gedächtniskonsolidierung angesehen wird. Eine Drosophila Mutante mit defekter α -Integrinexpression zeigt Gedächtnisdefizite in einer Geruchskonditionierung. Ausgestattet mit einem Hitzeschockpromotor für die α -Integrinexpression zeigen die Tiere drei Stunden nach Erwärmung auf 37°C ein normales Gedächtnis (GROTEWIEL, 1998).

Eine wichtige Rolle bei der Gedächtniskonsolidierung von Karpfenfischen (Cypriniden) in einer aktiven Meidedressur spielt das L1.1, ein Zelladhäsionsmolekül der Immunoglobulin-Superfamilie. Zebrafische, denen eine Stunde nach der Verhaltensakquisition ein spezifischer anti-L1.1-Antikörper intracerebroventrikulär injiziert wird, zeigen eine gestörte Gedächtniskonsolidierung. Im zwei Tage später durchgeführten Test machen sie mehr Fehler und erinnern sich schlechter als unbehandelte Kontrolltiere (PRADEL, 1999; PRADEL et al., 2000). In situ-Hybridisierungen mittels digoxigeninmarkierter mRNA-Sonden zeigten einen lerninduzierten Anstieg der L1.1 und NCAM mRNA Expression im Tectum opticum, dem Mittelhirndach, drei Stunden nach der Verhaltensakquisition einer aktiven Meidedressur beim Zebrafisch (PRADEL, 1999; PRADEL et al., 2000). Desweiteren konnte, verglichen mit untrainierten Fischen oder Fischen, die die Dressur nicht erlernten, mit Hilfe der [¹⁴C]-2-Desoxyglukose-Methode ein verstärkter Energiestoffwechsel in diesem Hirngebiet während der Akquisition der aktiven Meidedressur festgestellt werden (PRADEL, 1999; PRADEL et al., 2000).

Ein Protein, das nach verschiedenen Lernvorgängen beim Goldfisch deutlich hochreguliert wird, ist das Ependymin, das Bestandteil der extrazellulären Matrix ist (SHASHOUA, 1976; SCHMIDT, 1987). SHASHOUA (1976) berichtet von drei Proteinen, die bei Fischen nach erfolgreichem Floßtraining vermehrt synthetisiert wurden. Zwei dieser Proteine wurden Ependymine genannt, da sie in ersten Untersuchungen in ependymalen Zellen lokalisiert worden waren (BENOWITZ & SHASHOUA, 1977; SHASHOUA, 1977). Als alleiniger Syntheseort des Ependymins wurden aber später reticuläre Fibroblasten der Leptomeninx identifiziert (KÖNIGSTORFER et al., 1990; ROTHER et al., 1990).

Das klonierte und sequenzierte prepro-Ependymin besitzt die für sekretorische Proteine charakteristische Signalsequenz mit einer Erkennungsstruktur für Signalpeptidase am N-terminalen Ende und zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen (KÖNIGSTORFER et al., 1989). Beim 31 kDa Ependymin trägt eine N-Glykosylierungsstelle Kohlenhydratseitenketten, beim 37 kDa Ependymin tragen beide Stellen Kohlenhydratseitenketten (SCHMIDT et al., 1990). Mittlerweile wurden die Ependymine zahlreicher anderer Fischarten sequenziert, so die vom Zebrafisch (*Brachydanio rerio*) (STERRER et al., 1990; RINDER et al., 1992), vom Karpfen (*Cyprinus carpio*) (ADAMS & SHASHOUA, 1994), von den Salmoniden Atlantik-Lachs (*Salmo salar*) und Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) (MÜLLER-SCHMID et al. 1992) und vom Hering (*Clupea harengus*) und Hecht (*Esox lucius*) (MÜLLER-SCHMID et al. 1993). ORTI und MEYER (1996) sequenzierten die Ependymine von insgesamt 19 Fischarten aus

den Ordnungen Characiformes (Salmier), Siluriformes (Welse) und Gymnotiformes (Messerfische). Ependymin wurde in dieser und auch in weiteren Studien zur Fischsystematik und –evolution als phylogenetischer Marker verwendet (MÜLLER-SCHMID et al., 1993; ORTI & MEYER, 1996; LYONS-WEILER & HOELZER, 1997). ORTI und MEYER (1996) schlussfolgern, dass der phylogenetische Informationsgehalt der Ependyminsequenzen überraschend hoch und ausreichend ist, die meisten basalen Stammbaumverzweigungen zu entdecken.

Um quantitative Veränderungen des Ependymingehaltes im ZNS zu messen, wurde ein empfindlicher Radioimmunoassay entwickelt (SCHMIDT & SHASHOUA, 1981). Mit 14% Anteil an der extrazellulären Gehirnflüssigkeit (ECF) stellt Ependymin einen wesentlichen Anteil am Proteingehalt dieser Fraktion im Goldfisch dar (SCHMIDT & SHASHOUA, 1981). Ependymin wird nach der Verhaltensakquisition synthetisiert und sezerniert (SHASHOUA, 1979; SCHMIDT, 1987, 1989; SHASHOUA & HESSE, 1989), wobei der Sekretion eine temporäre Abnahme der Konzentration in der extrazellulären Hirnflüssigkeit vorrausgeht (SCHMIDT, 1987; SHASHOUA & HESSE, 1989). Eine temporäre Abnahme des extrazellulären Ependyminpools um 8% bzw. 19% vier Stunden nach der Verhaltensakquisition ließ sich nach operanter (SCHMIDT, 1987) bzw. klassischer Konditionierung (SHASHOUA & HESSE, 1989) ermitteln. Nach fünf Stunden war eine maximal erhöhte Ependyminkonzentration in der cytoplasmatischen Fraktion zu erkennen. Anschließend ließ sich eine Sekretion von Ependymin in die ECF nachweisen. Hierbei wurde das Maximum neun Stunden nach der Verhaltensakquisition erreicht. Das sezernierte Ependymin bindet an verschiedene Neuronenpopulationen im Tectum opticum, wie die Typ I- und Typ XIV Neurone (SCHMIDT, 1989, 1997; ROTHER et al., 1995). Die Typ I Neurone erhalten Input von den retinalen Ganglienzellen und den Marginalfasern, welche Information über Zeitbestimmungen erwarteter Ereignisse liefern (MEEK, 1981).

Die Beteiligung des Ependymins an Lernvorgängen konnte auch durch Inhibierungsexperimente nachgewiesen werden. Anti-Ependymin-Antikörper (SHASHOUA & MOORE, 1978; PIRONT & SCHMIDT, 1988; PRADEL et al., 1999) und anti-sense-Oligodesoxynucleotidsonden gegen die Ependymin mRNA (SCHMIDT et al., 1995) verhindern die Gedächtniskonsoolidierung nach einer aktiven Meidedressur. Ependymin spielt auch eine wichtige Rolle bei Regenerationsvorgängen am Sehnerv des Goldfisches. Fische, denen unilateral ein Sehnerv durchtrennt wurde und die 21 Tage später intraventrikulär anti-Ependymin-Antikörper erhielten, zeigten gegenüber Kontrollen eine verringerte Verschärfung der

rezeptiven Felder im Tectum opticum (SCHMIDT & SHASHOUA, 1988). Weiterhin ist Ependymin ein Substrat für das Auswachsen von Neuriten. Ependymin wurde auf Objektträger aufgetragen und als Substrat für von retinalen Ganglienzellen auswachsende Axone des Goldfisches getestet (SCHMIDT et al., 1991). Hierbei zeigte sich Ependymin als gutes Substrat, auf dem Axone besser auswachsen, als auf Polylysin oder Concanavalin A. Wurde ein anti-Ependymin-Antikörper streifig auf die ependyminbeschichteten Objektträger gegeben, vermieden die auswachsenden Axone die Antikörperschicht und wuchsen auf dem Ependymin. SCHMIDT (1995) postuliert, dass über den extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationsabfall im Bereich aktivierter Synapsen Ependymin polymerisiert werden könne und somit ein Substrat für die strukturelle Umwandlung zuvor aktivierter Neurone bilde. Die Bindung von Ca^{2+} ist für Ependymine aus Goldfisch und Regenbogenforelle nachgewiesen (SCHMIDT & MAKIOLA, 1991; GANß & HOFFMANN, 1993). Ependymin polymerisiert in der Abwesenheit von Ca^{2+} in vitro (SHASHOUA, 1988; TANG et al., 1999) und in vivo (SHASHOUA et al., 1990).

Inzwischen wurde die Ependyminsequenz in beiden Studien zur Erfassung des menschlichen Genomes beim Menschen nachgewiesen (LANDER et al., 2001; VENTER et al., 2001). NIMMICH und Mitarbeiter fanden ein Protein in Tumorzellen des Dickdarms, das große Sequenzhomologie mit Fisch-Ependymin aufweist (NIMMICH et al., 2001). APOSTOLOPOULOS und Mitarbeiter fanden dem Ependymin sequenzähnliche Proteine beim Menschen in verschiedenen Geweben wie Hirn, Herz, Skelettmuskel und verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien und beschrieben diese als "mammalian ependymin-related proteins" (MERP-1) (APOSTOLOPOULOS et al., 2001). GREGORIO-KING und Mitarbeiter entdeckten außerdem Transkripte des MERP-1 in CD 34^{+} -Vorläuferzellen und beobachteten die höchste MERP-1 Expression im Gehirn, Herz und Skelettmuskel. MERP-1 enthält ein N-terminales hydrophobes Signalpeptid, vier potentielle N-Glykosylierungstellen und besitzt ein Molekulargewicht von 35,9 kDa. Die Autoren postulieren, dass dieses Protein im Gegensatz zum Fisch-Ependymin ein Transmembranprotein sei, dessen extrazellulärer Teil Ca^{2+} -bindende Eigenschaften besitze (GREGORIO-KING et al., 2002). Zusätzlich konnten von APOSTOLOPOULOS und Mitarbeitern zwei "mouse ependymin-related proteins" (mu-MERP-1, mu-MERP-2) und ein "monkey ependymin-related protein" (mo-MERP-1) analysiert und beschrieben werden (APOSTOLOPOULOS et al., 2001; GREGORIO-KING et al., 2002).

Eine weitere wichtige Funktion von Ependymin könnte in der Kontrolle der Transkription liegen. Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass ein Fragment des Ependymins

den AP-1 Transkriptionsfaktor (s. 1.3) aktiviert (SHASHOUA et al., 2001) und somit möglicherweise die Funktion eines IEGs einnimmt.

1.5 Rekonsolidierung

Einige neuere Studien widersprechen der ursprünglichen Konsolidierungshypothese, nach der ein konsolidiertes Langzeitgedächtnis gefestigt ist und Eingriffen nicht mehr zugänglich ist (vgl. PRZYBYSLAWSKI & SARA, 1997; SARA et al., 1999; SARA, 2000). Vielmehr erfolgt nach Auffassung dieser Autoren nach Abrufen eines Gedächtnisinhaltes eine erneute Einspeicherung, ein Vorgang der als Rekonsolidierung bezeichnet wird. Hierbei nimmt das Gedächtnis wieder einen labilen Zustand ein, der proteinsyntheseabhängig ist. So wirken auf das gerade abgerufenene Gedächtnis die gleichen Proteinsynthesehemmer, die die Gedächtniskonsolidierung blockieren können (ABEL & LATTAL, 2001). Auf Rekonsolidierungsvorgänge deuteten manche ältere Arbeiten in der Vergangenheit bereits hin. (vgl. MISANIN et al., 1968; QUATERMAIN & MCEWEN, 1970). Prozesse, die auch der anfänglichen Verhaltensakquisition zugrunde liegen, laufen ebenfalls nach der Reaktivierung eines Gedächtnisses während der Rekonsolidierung ab (PRZYBYSLAWSKI & SARA, 1997; SARA et al., 1999; SARA, 2000). Gedächtniseinspeichern, Erinnern und die Rekonsolidierung haben manche Prozesse gemeinsam (MANSUY et al., 1998). Das Gedächtnis geht nach der Reaktivierung in eine labile Phase über und muss erneut konsolidiert werden (PRZYBYSLAWSKI & SARA, 1997; LITVIN & ANOKHIN, 2000). Ergebnisse, die auf Rekonsolidierungsprozesse hinweisen, wurden mittlerweile in zahlreichen Dressuren mit assoziativen Lernparadigmen festgestellt (SEKIGUCHI et al., 1997; PRZYBYSLAWSKI & SARA, 1997; SARA et al., 1999; LITVIN & ANOKHIN, 2000; NADER et al., 2000; TAUBENFELD et al., 2001). LITVIN und ANOKHIN (2000) trainierten Hühnerküken in einer passiven Meideaufgabe, mit bitterem Methylantranilat überzogene Perlen zu meiden. Den Tieren wurde zwei, 24 oder 48 Stunden später Cycloheximid verabreicht, und fünf Minuten später wurden sie erneut trainiert (Erinnerungssituation). Im Test, der eine halbe Stunde bis 48 Stunden nach der Erinnerungssituation durchgeführt wurde, zeigten die Küken eine Amnesie (LITVIN & ANOKHIN, 2000). NADER und Mitarbeiter konnten an Ratten zeigen, dass deren bereits konsolidiertes Angstgedächtnis bei Abruf in eine Rekonsolidierungsphase überging, die durch Anisomycin-Injektionen verhindert werden konnte (NADER et al., 2000). Die Tiere erwiesen sich im

weiteren Test als amnestisch. Tiere, die zum gleichen Zeitpunkt Anisomycin erhielten, deren Gedächtnis aber nicht abgerufen wurde, zeigten im weiteren Test keine Amnesie.

1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ein belohntes, assoziatives Verhaltensparadigma sollte entwickelt werden, bei dem Stresseinflüsse auf die Tiere möglichst vernachlässigbar klein gehalten werden, da von manchen Arbeitsgruppen die Proteinsyntheseabhängigkeit der Gedächtniskonsolidierung bei einer belohnten Positivdressur in Zweifel gezogen wurde und als Stressartefakt bei Negativdressuren gedeutet wurde (vgl. LAUDIEN, 1975, 1977; SCHARPEKANT, 1979; SCHARPEKANT & LAUDIEN, 1980; LAUDIEN et al., 1986). Goldfische lassen sich sehr gut auf Farben dressieren (NEUMEYER, 1988). Daher sollte eine futterbelohnte Farbunterscheidungsdressur entwickelt werden, die in relativ kurzer Zeit für den Fisch zu erlernen und gut zu erinnern ist. Auf diese Weise stünde eine ausreichende Anzahl von lernenden Tieren für die biochemischen Untersuchungen in relativ kurzer Zeit zur Verfügung und Eingriffe in Vorgänge der Gedächtnisbildung könnten genauestens erkennbar gemacht werden. Mit Injektionen des Proteinsynthesehemmers Puromycin sollte festgestellt werden, ob die Gedächtniskonsolidierung nach einer appetitiven operanten Dressur ebenso proteinsyntheseabhängig ist, wie nach einer aktiven Meidedressur. Desweiteren sollte geprüft werden, ob das Abrufen des bereits gebildeten Gedächtnisses bei übertrainierten Fischen ebenfalls proteinsyntheseabhängig ist. Auf diese Weise kann der Frage nachgegangen werden, ob das Abrufen und Wiedereinspeichern eines nach der Farbdressur gebildeten und bereits konsolidierten Langzeitgedächtnisses proteinsyntheseabhängig ist, also eine Rekonsolidierung des Langzeitgedächtnisses stattfindet und das konsolidierte Gedächtnis zum Abrufen wieder in einen labilen proteinsyntheseabhängigen Zustand übergeht (vgl. NADER et al., 2000; SARA, 2000). Neben intracerebralen Injektionen nach der Verhaltensakquisition mit Puromycin, können Injektionen mit einem Ependymin-Antikörper Auskunft über eine mögliche Beteiligung dieses Substratadhäsionsmoleküls auch nach belohnter operanter Farbunterscheidungsdressur geben. Da nach der Verhaltensakquisition einer aktiven Meidedressur der höchste Ependymingehalt nach fünf Stunden in der cytoplasmatischen Fraktion und nach neun Stunden in der ECF festgestellt worden war (SCHMIDT, 1987; SHASHOUA & HESSE, 1989), sollte ein ähnliches Zeitfenster nach Erlernen der Belohnungsdressur gewählt werden. Dadurch kann man möglichst substantielle Ergebnisse

zum Ependymin Gehalt der Fraktionen erhalten und eventuell Zeitverläufe der Ependyminverteilung und -synthese der beiden unterschiedlichen Lernparadigmen mittels Radioimmunoassay vergleichen. Zur Quantifizierung des Ependymin Gehaltes der zwei Fraktionen sollte der von SCHMIDT und SHASHOUA (1981) entwickelte Radioimmunoassay für die vorliegende Arbeit reproduziert werden. Da kürzlich von der Arbeitsgruppe TANG (TANG et al., 1999) festgestellt wurde, dass die Transkription von Ependymin kälteinduziert ansteigt, sollte zusätzlich untersucht werden, ob der Ependymin Gehalt durch Kälte beeinflussbar ist.

Da nach dem Erlernen einer aktiven Meidedressur mit Hilfe der [^{14}C]-2-Desoxyglukose-Methode eine Stoffwechselerhöhung im Tectum opticum, dem assoziativen Hirnzentrum bei Fischen, festgestellt worden war (PRADEL et al., 1997, 2000), sollten quantitative [^{14}C]-2-Desoxyglukose-Messungen über eine Beteiligung unterschiedlicher Hirngebiete am Erlernen der belohnten operanten Farbunterscheidungsdressur Auskunft geben.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma, Deisenhofen
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromophenolblau	Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Concanavalin-A, Sephadex gebunden	Biorad, München
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg
[U- ¹⁴ C]-2-Desoxyglukose	Amersham, Braunschweig
Eisessig	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz	Sigma, Deisenhofen
Gelatine	Biorad, München
Gluthation, reduziert	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Sigma, Deisenhofen
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Roth, Karlsruhe
2-Methylbutan (Isopentan)	Roth, Karlsruhe
α-Methylmannopyranosid	Sigma, Deisenhofen
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natrium-di-hydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumjodid (Na [¹²⁵ I])	Amersham, Braunschweig
Natriumtartrat	Merck, Darmstadt
Puromycindihydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin (BSA).	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Biorad, München

N-Tosyl-2-phenylalanin-chloromethylketon (TPCK)	Sigma, Deisenhofen
Tricainmethansulfonat (MS 222)	Sandoz, Basel
Trichloressigsäure	Sigma, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Ziege-anti-Kaninchen IgG	Sigma, Deisenhofen

2.2 Haltung

Sämtliche Lernexperimente wurden an Goldfischen (*Carrassius auratus auratus*) durchgeführt. Goldfische beiderlei Geschlechts wurden von der Firma Aquaristik Huber, Cölbe-Schönstadt, bezogen. Nach Anlieferung der Fische wurden diese zwei Wochen an die neue Umgebung gewöhnt. Die Haltung der Tiere erfolgte in einem mit 21 °C klimatisierten Raum in 80 l Becken zu Schwärmen von ca. 25 Tieren, wobei ein natürlicher Tag-Nacht Rhythmus eingehalten wurde. Die Tiere wurden einmal täglich mit Goldfischflockenfutter (Sera Goldi) der Firma Sera, Heinsberg, gefüttert. Alle zwei Wochen wurde 1/3 des alten Aquarienwassers durch Frischwasser ersetzt. Das durchschnittliche Körpergewicht der Versuchstiere betrug am Tag der Hirnentnahme 6,3 g (n = 20) bei einer durchschnittlichen Körperlänge von 50 - 70 mm. Es wurden ausschließlich gesunde Tiere für die Versuche verwendet.

2.3 Konditionierung

Die Untersuchungen zur Gedächtnisbildung wurden mittels einer neuentwickelten futterbelohnten operanten Farbunterscheidungsdressur durchgeführt. In der Farbunterscheidungsdressur musste der Fisch lernen, aus einer Auswahl von vier Futterboxen sofort diejenige anzuschwimmen, in der eine gegenüber den anderen drei Futterboxen andersfarbige Leuchtdiode eingeschaltet war. Nur dort erhielt der Fisch eine Futterbelohnung aus einem Aquarienschlauch.

2.3.1 Eingewöhnung

Vor der eigentlichen Belohnungsdressur (s. 2.3.2) mussten die Fische lernen, die dort als Positivverstärker eingesetzte Futterpaste aus den zur Fütterung eingesetzten Aquarienschläuchen (Ø 6 mm) zu entnehmen. Bei dieser Eingewöhnung handelte es sich neben der Belohnungsdressur um einen eigenständigen operanten Konditionierungsvorgang. Deswegen mussten die Goldfische vor Erlernen der neuen Aufgabe das Fressen der aus dem Schlauch hervorquellenden Futterpaste beherrschen. Die in der Belohnungsdressur eingesetzten Plexiglaskästen (Futterboxen) wurden auch zur Eingewöhnung verwendet. Handelsübliche Aquarienschläuche wurden in die Plexiglaskästen durch eine Bohrung in der Rückwand eingeführt (s. auch Abb. 3 unter 2.3.3). In der Vorderwand der Plexiglasbox war eine Öffnung von 5 × 5 cm vorhanden, durch die der Fisch Zugang zur Futterbox, und damit zum Futterschlauch hatte. Um an diesen zu gelangen, musste der Goldfisch mit der Hälfte des Körpers in die Futterbox schwimmen, ein Vorgang, der für einen Goldfisch die Überwindung eines Hindernisses bedeutet.

In der Eingewöhnung wurden Goldfische in Gruppen von je 10 Tieren alle zwei Tage in das quadratische Versuchsbecken gesetzt, in dem sich zwei Futterboxen diagonal in je einer Ecke gegenüberstanden. Vor Versuchsbeginn wurde in den Schlauch jeder Futterbox mittels einer Spritze eine Futterpaste eingesaugt. Die Futterpaste bestand aus 1 g handelsüblichem Trockenfutter (Sera Goldi, Sera, Heinsberg) aufgelöst in 100 ml Wasser, das nach Aufkochen mit Hilfe eines Blattes Gelatine (1,67 g, Ruf, Quakenbrück) eingedickt wurde. Das Futter hatte dann eine gelatinöse Konsistenz. Um ein schnelleres Auffinden des Futters in der Vordressur zu gewährleisten, kam hier mittels farbiger Blattgelatine (Oetker, Bielefeld; Farbstoffe: Cholingelb, Azorubinrot) gefärbtes Futter zum Einsatz, das die Fische besser wahrnehmen konnten, wenn es am Schlauchende herausquoll. In der eigentlichen Farbdressur kam aber nur farbloses Futter zum Einsatz. Der Futternachschub für die Goldfische wurde durch Injektionen von Futterpaste in die Schläuche mittels Spritzen, die an den Schlauchenden angebracht waren, gewährleistet. Schwamm ein Fisch zufällig vor die Öffnung einer Futterbox, so wurde vom Experimentator ein auffälliges, ca. 1 cm langes Stück Futterpaste aus dem in die Futterbox führenden Schlauch herausgedrückt. Die Fische sollten lernen unmittelbar nach dem Einbringen in das Versuchsbecken zu den Futterboxen hinzuschwimmen und Futter zu entnehmen. Damit ca. 50 % der Tiere die Futterentnahme aus dem Schlauch erlernten, mussten sie vier Wochen lang jeden zweiten

Tag trainiert werden. Um die Motivation für diese Aufgabe sowie für die spätere Anforderung in der Belohnungsdressur hoch zu halten, erhielten die Fische zwei Wochen vor Beginn der jeweiligen Versuche kein Futter mehr, waren aber trotz Futterdeprivation in guter Verfassung. Goldfische, die das Fressen aus dem Schlauch so beherrschten, dass sie innerhalb der ersten Sekunden nach dem Einsetzen in das Versuchsbecken zu den Schläuchen schwammen, wurden weiter in der futterbelohnten Farbdressur verwendet. Zusätzlich zum Lernvorgang an die Art der Futtergabe gewöhnten sich die Tiere auch an das für die Farbdressur verwendete Versuchsbecken.

2.3.2 Belohnungsdressur

In diesem operanten Konditionierungsexperiment wurden die Fische unter Einsatz eines positiven Verstärkers (Futter) darauf trainiert, einen Farbstimulus, bestehend aus rotem und grünem bzw. aus blauem und grünem Licht zu unterscheiden, und das Erscheinen des Stimulus mit der richtigen Verhaltensaktion zu beantworten. Hierbei kam folgende Versuchsanordnung zum Einsatz (Abb. 2).

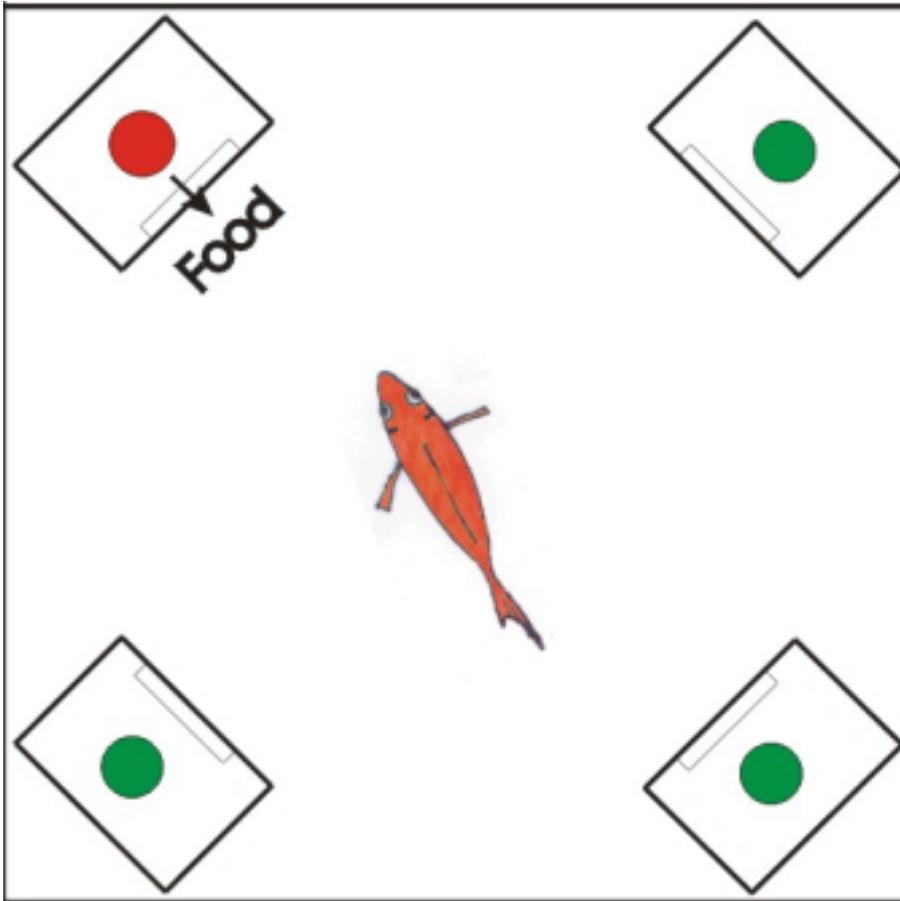


Abb. 2: Schemazeichnung der Farbdressur (Rotdressur). In jeder Ecke des Versuchsbeckens befand sich eine Plexiglasbox, in der über einem Futterschlauch eine Wechselleuchtdiode angebracht war. Während einer Trainingsrunde leuchtete innerhalb einer Box das rote Licht (Zielbox; $\Delta+$), innerhalb der drei anderen Boxen das grüne Licht ($\Delta-$). Nur in der Box, in der das rote Lämpchen eingeschaltet war, erhielt der Fisch Futter und wurde auf diese Weise darauf trainiert, die Zielbox unmittelbar anzuschwimmen (richtige Verhaltensaktion). In der darauf folgenden Trainingsrunde wurde jeweils das rote Licht einer anderen Box eingeschaltet. Der Fisch musste diese daraufhin als erste anschwimmen, was als richtige Verhaltensaktion gewertet wurde.

Im Versuchsbecken befand sich in jeder Ecke eine Plexiglassäule (Futterbox), in der in einem Reagenzglas eine Wechselleuchtdiode (rot/grün, bzw. blau/grün der Wellenlänge rot = 700 nm, grün = 565 nm, blau = 430 nm) installiert war. In jeder Plexiglassäule befand sich unterhalb der Leuchtdiode ein Schlauch (\varnothing 6 mm), in den ein zweiter Polyethylenschlauch (\varnothing 1 mm) geführt werden konnte. Mit Hilfe einer an diesem Schlauch befestigten Spritze konnten den Fischen 1-2 mm lange Portionen der Futterpaste ad libitum verabreicht werden.

Je nach Experiment wurden die Fische auf rotes, grünes oder blaues Licht dressiert. Sie erhielten also je nach Farbdressur eine Futtergabe entweder nur bei Anschwimmen des roten oder des grünen oder des blauen Lichtsignals, wobei Rot gegenüber Grün (Rotdressur; eine Futterbox mit rotem, die anderen drei mit grünem Signal), Grün gegenüber Rot (Gründressur, eine Futterbox mit grünem, die anderen drei mit rotem Signal) oder Blau gegenüber Grün (Blaudressur, eine Futterbox mit blauem, die anderen drei mit grünem Signal) erlernt werden sollte. Ein Trainingsdurchlauf (s. Beispiel Rotdressur) wurde damit begonnen, dass ein vortrainierter Goldfisch (s. 2.3.1) in das Trainingsbecken gesetzt wurde.

2.3.3 Rotdressur

Mit Beginn des Trainings (Zeitpunkt 0 in der ersten Trainingsrunde) leuchtete innerhalb einer Box das rote Licht (Zielbox, $\Delta+$), innerhalb der anderen drei Boxen das grüne Licht ($\Delta-$) (Abb. 2). Während der Dauer dieser Trainingsrunde erhielt der Fisch nur in der Zielbox ($\Delta+$) Futter. Nach definierten Zeitintervallen (s. u.) wurde mit Hilfe eines Schalters während der nächsten Trainingsrunde das rote Lichtsignal in einer anderen der vier Futterboxen eingeschaltet. Hatte der Fisch eine Farbe als Stimulus erlernt, der belohnt wurde, so schwamm er bei Lichtwechsel (= neue Trainingsrunde) die richtige Futterbox (Zielbox) an, um Futter zu entnehmen (= richtige Verhaltensantwort) (Abb. 3).

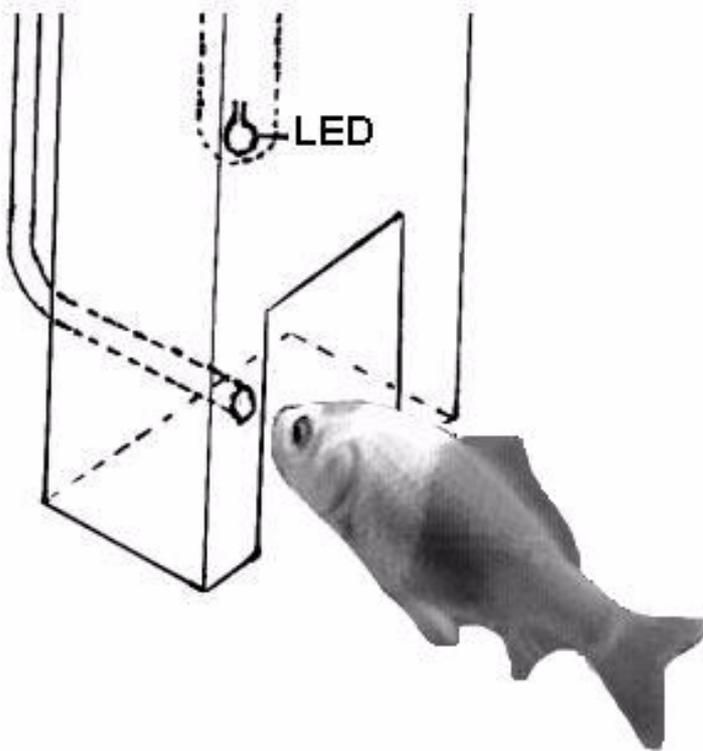


Abb. 3: Futterentnahme durch einen Goldfisch an der Zielbox.

In welcher Box in den jeweils folgenden Trainingsrunden das rote Licht eingeschaltet wurde, war rein zufällig. Bei einer Trainingsrundendauer von drei Minuten innerhalb eines Zeitrahmens von 45 Minuten hatte der Fisch 15 Runden zur Verfügung, um das Lernkriterium zu erreichen. Der Fisch musste dazu in fünf von sechs aufeinander folgenden Trainingsrunden die mit dem roten Signal versehene Futterbox als erste anschwimmen und dort am Futterschlauch Futter entnehmen. Lernte ein Fisch innerhalb der vorgegebenen 45 Minuten, wurde er als "Lerner" klassifiziert, und dann das Training abgebrochen. Erreichte der Fisch das Kriterium in der festgesetzten Zeit nicht, wurde er als "Nichtlerner" eingestuft. Einige Fische, die das Lernkriterium erreicht hatten, wurden alle drei Tage erneut trainiert, damit sie später als Kontrolltiere eingesetzt werden konnten ("übertrainierte" Fische). Derartige Tiere wurden benötigt, um Einwirkungen auf die Gedächtniskonsolidierung von Wirkungen auf ein bereits gebildetes und konsolidiertes Gedächtnis unterscheiden zu können. Nach 10 Trainingsdurchläufen erreichten diese Tiere ein Lernniveau von durchschnittlich 93 % richtigen Verhaltensantworten (14 richtige Verhaltensreaktionen innerhalb von 15 Trainingsrunden). Während der Trainingsversuche wurde eine Lernkurve

zur grafischen Darstellung des Lernvorganges erstellt. Dabei wurde, vom Schnittpunkt Ordinate/Abszisse ausgehend, für jedes Fressen des Fisches aus den Schläuchen ein Punkt in die rechte Abszissenrichtung eingetragen, wobei ein Fressen am Schlauch der futterbelohnten Zielbox (= richtige Verhaltensantwort) in der Ordinatenebene nach oben, ein Fressversuch an den Schläuchen der falschen Boxen nach unten eingetragen wurde. Außerdem wurde oberhalb der Kurve eingetragen, ob die jeweils erste Verhaltensreaktion innerhalb einer neuen Trainingsrunde richtig oder falsch war. Die Abbildungen 4 und 5 zeigen die für Lerner und Nichtlerner typischen Lernkurven.

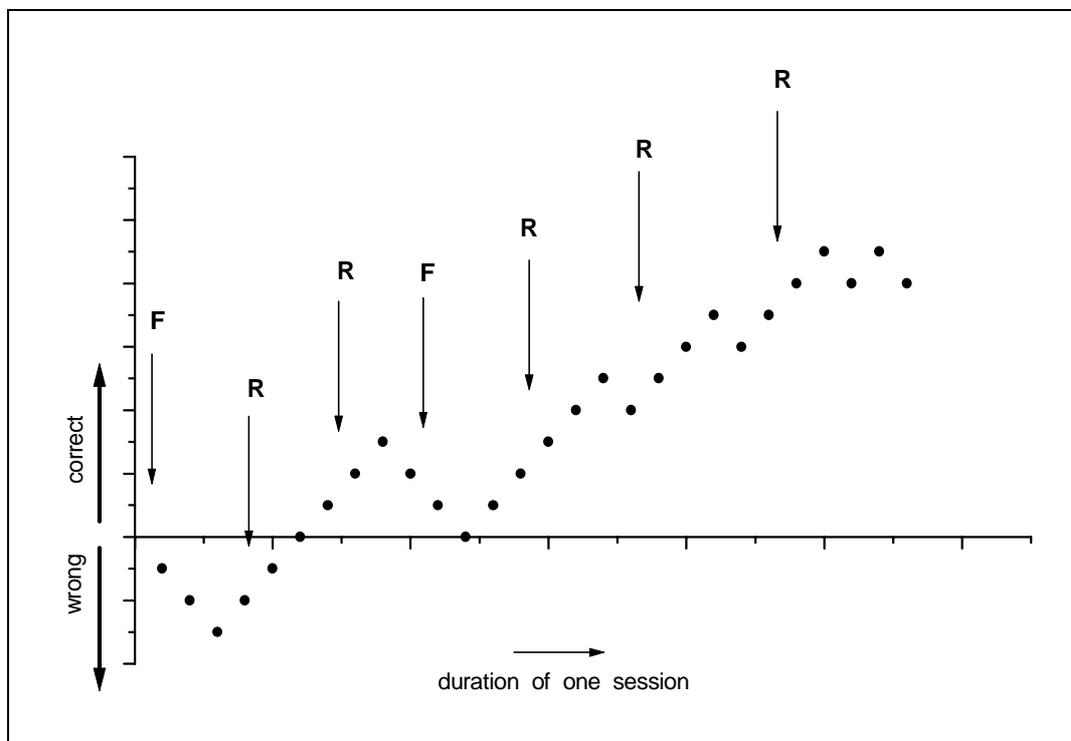


Abb. 4. Typische Lernkurve eines Lerners. Ein aufsteigender Punkt zeigt ein Fressen am Futterschlauch der richtigen, futterbelohnten Zielbox, ein absteigender Punkt ein Fressversuch an einer der falschen Boxen. Die Pfeile zeigen den Beginn einer neuen Trainingsrunde an, wobei nun die Futterbox einer anderen Ecke des Versuchsbeckens als Zielbox diente, das heißt mit dem roten Signal versehen war. Die Buchstaben über den Pfeilen zeigen, ob die erste Verhaltensaktion bei Beginn der neuen Trainingsrunde falsch (**F**) oder richtig (**R**) war. Letztlich zählten nur diese nach Beginn einer neuen Trainingsrunde zuerst gezeigten Verhaltensantworten. Obiger Fisch hatte also nach sieben Trainingsrunden das Lernkriterium erreicht.

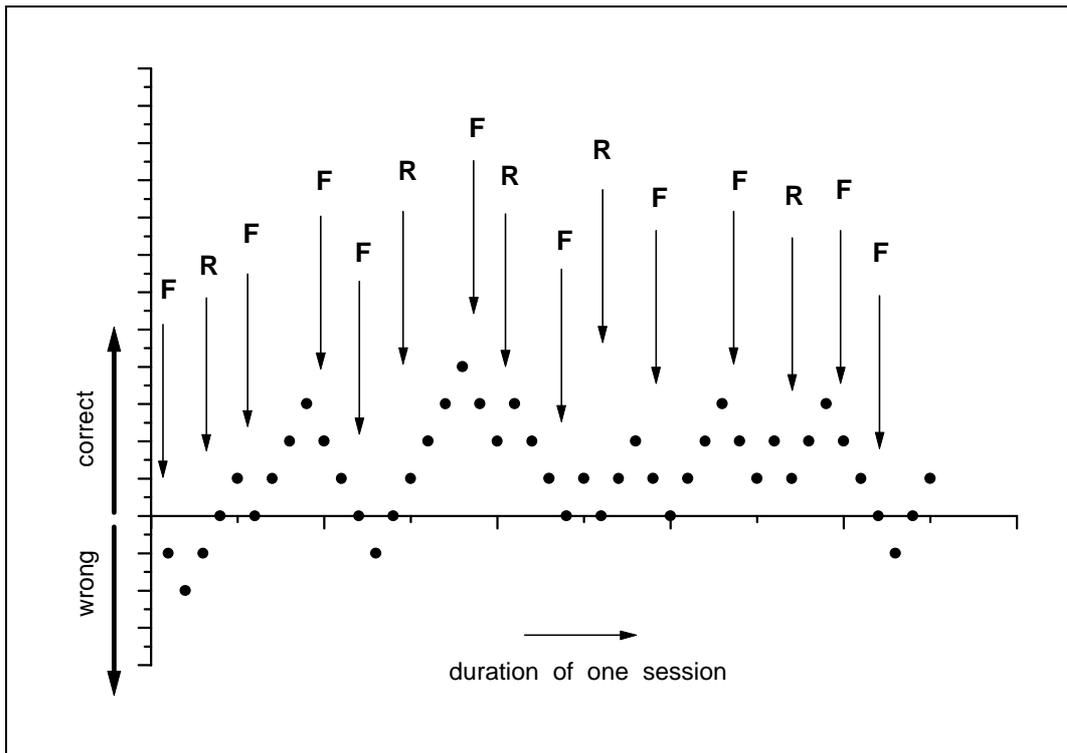


Abb. 5. Typische Lernkurve eines Nichtlernalters. Zur Erklärung s. Abb. 4. Obiger Fisch zeigte nur fünf richtige Verhaltensaktionen innerhalb der 15 Trainingsrunden. Als Nichtlerner wurden Fische qualifiziert, die das Lernkriterium nicht erreichten und immer wieder an einer der falschen Boxen zu fressen versuchten.

2.3.4 Automatisierung der futterbelohnten Farbunterscheidungsdressur

Um den zeitlichen Aufwand, der für das Farbtraining der Goldfische benötigt wurde, zu minimieren, die freigewordene Zeit für biochemische Versuche zur Verfügung zu haben und um eine Beeinflussung der Tiere durch den Experimentator auszuschließen, wurde während der vorliegenden Arbeit eine automatisierte Versuchsanlage der operanten Farbunterscheidungsdressur entwickelt. Der Grundaufbau der Dressur mit den vier Futterboxen glich dem in Abb. 2 dargestellten (Abb. 6). Zur Ansteuerung der Trainingsapparatur diente ein von der Elektronikwerkstatt entwickeltes PC-gesteuertes Interface und dazu entworfene Software. Die jeweilige Lichtfarbe der Wechselleuchtdioden in den Futterboxen wurde dabei von einem Zufallsgenerator gesteuert. Technisch realisiert wurde die automatisierte Rot- und Blaudressur. Die Futtergaben wurden durch vor die Schlauchöffnung plazierte Lichtschranken über einen Mikroprozessor gesteuert. Schwamm

ein Fisch in die richtige futterbelohnte Box, so löste er automatisch eine Futtergabe aus. Diese erfolgte über elektrische Pumpen, in deren Halterungen die futtergefüllten Spritzen eingespannt wurden. Der PC gab während eines Trainingsdurchlaufs die Gesamtzahl von 15 Trainingsrunden vor, und addierte für jeden Zyklus richtige und falsche Verhaltensreaktionen auf, die ebenfalls über die Lichtschranken registriert wurden. Nach Erreichen von 15 Trainingsrunden oder dem Lernkriterium wurde das Programm automatisch beendet und ein Testprotokoll erstellt. Mit Hilfe des Interfaces konnte die Länge der gegebenen Trainingsrunden von 0,5 bis zu drei Minuten Dauer eingestellt werden. Auch das Computerprogramm wurde mit Hilfe eines Startknopfes am Interface gestartet. Eine weitere wichtige Funktion des Interfaces war es, jeden einzelnen der vier Motoren per Hand anzusteuern. Diese Funktion benötigte man, um die Spritzen nach dem Beladen mit der Futterpaste in die Motorenhalterung einzuspannen. Die automatisierte Trainingsapparatur wies aber noch "Kinderkrankheiten" auf. Hatte z. B. ein Fisch die Lichtschranke ausgelöst, so dauerte die automatische Gabe der Futterpaste zu lange, so dass der Fisch oft schon wieder außerhalb der Futterbox war. Aus diesem Grund wurden die meisten Versuche der vorliegenden Arbeit mit der manuellen Version der Versuchsapparatur durchgeführt.

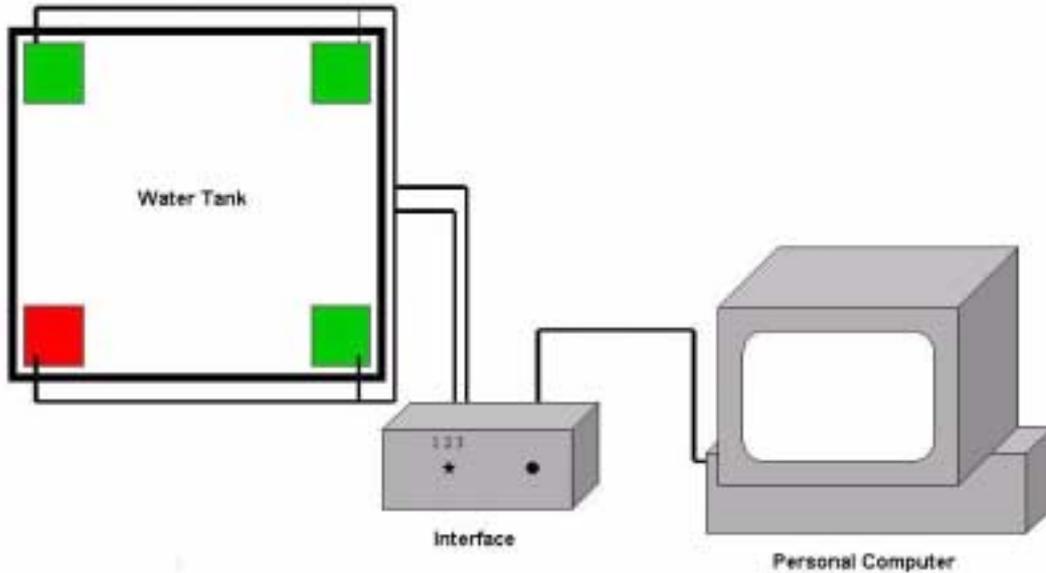


Abb. 6. Übersicht über die automatisierte Trainingsapparatur. Die Farbe der Leuchtdioden (Grün/Rot) in den Futterboxen wurde mit Hilfe eines Zufallsgenerators gesteuert. Die Futtergabe wurde durch den Einsatz von Lichtschranken über einen Mikroprozessor gesteuert. Mit dem Interface konnte die Dauer der Trainingsrunden eingestellt werden. Die Software generierte automatisch ein Testprotokoll.

2.3.5 Erinnerungstest und Quantifizierung der Erinnerung

Drei Tage nach dem Erlernen der Farbunterscheidung wurden die Goldfische, die das Lernkriterium erfüllt hatten, nochmals der Farbunterscheidungssituation unterzogen, um ihre Erinnerung zu testen. Dabei wurde die Häufigkeit richtiger Verhaltensantworten im Test mit der Häufigkeit richtiger Verhaltensantworten im Training verglichen. Um die Häufigkeit richtiger Verhaltensaktionen eines Fisches im Test mit der im Training zu vergleichen, wurde die Häufigkeit richtiger Verhaltensaktionen auf die maximal mögliche Gesamtzahl an Runden im Training und Test hochgerechnet (15). Ein Fisch, der z. B. im Training fünf von zehn Trainingsrunden richtig absolviert hatte, machte bezogen auf 15 Runden also 7,5 richtige Verhaltensaktionen. Zeigte der gleiche Fisch drei Tage später im Test in fünf von sechs Runden richtige Verhaltensantworten (im Test jetzt als Testrunden bezeichnet), so machte er bezogen auf 15 mögliche Testrunden 12,5 richtige Verhaltensaktionen, war also im Test erfolgreicher als im Training und zeigte somit Erinnerung. Auf diese Weise konnte auch die Erinnerungsfähigkeit von Fischen verschieden behandelter Versuchsgruppen im Test miteinander verglichen werden.

2.4 Injektionen

2.4.1 Puromycin-Injektionen

Um zu beurteilen, ob Puromycin-Injektionen auch nach dem Erlernen einer belohnten operanten Konditionierungsaufgabe die Gedächtniskonsolidierung beeinflussen oder blockieren, die Gedächtniskonsolidierung folglich proteinsyntheseabhängig ist (vgl. AGRANOFF & KLINGER, 1964), wurden die Goldfische 30 Minuten nach Erreichen des Lernkriteriums, mit MS 222 (Tricainmethansulfonat; 0,1 % in Wasser gelöst) betäubt und anschließend unter Zuhilfenahme von Gummibändern in den Spalt eines nassen Schaumstoffkissens eingespannt. Mit Hilfe einer 0,6 mm Injektionskanüle wurde unter leichtem Druck und Drehbewegungen vorsichtig ein Loch in die Mitte der herzförmigen Zeichnung auf dem Schädel des Tieres gebohrt. Das Zentrum der herzförmigen Zeichnung entspricht dem Schnittpunkt des Cerebellum und der beiden optischen Tecta. Unter einem Binokular wurden mit einer 10 µl Hamilton-Spritze zwei Gruppen von Fischen nach dem Erlernen der operanten Farbunterscheidungsdressur Injektionen mit dem Proteinsyntheseblocker Puromycin gesetzt. Puromycin hemmt die Proteinsynthese durch einen vorzeitigen Kettenabbruch und die Freisetzung unvollständiger Polypeptidketten, weil es als Analogon der Aminoacyl-tRNA wirkt (STRYER, 1995).

Eine Gruppe von Lernern und eine Gruppe von übertrainierten Tieren erhielt 30 Minuten nach dem ersten Training (Lerner) bzw. dem 10. Training (übertrainierte Fische) Puromycin-Injektionen (170 µg Puromycin /10 µl 0,9 % NaCl) in den tectalen Ventrikel. Die angegebene Konzentration entsprach der von DAVIES und AGRANOFF (1964) bei Goldfischen nach einer Meidedressur verwendeten Dosis. Weiterhin konnte auf diese Weise der Frage nachgegangen werden, ob das Abrufen und Wiedereinspeichern eines nach der Farbdressur gebildeten und bereits konsolidierten Langzeitgedächtnisses proteinsyntheseabhängig ist und somit eine Rekonsolidierung des Langzeitgedächtnisses stattfindet.

In Vorversuchen wurde der optimale Injektionswinkel und die Einstichtiefe der Hamiltonkanüle mit Hilfe von Methylenblau-Injektionen festgelegt. Die optimale Einstichtiefe lag bei 4,5 mm für Fische von 6 - 8 cm Länge. Der Injektionseinstich erfolgte unter einem Winkel von 65° zur Längsachse des Fisches (SCHMIDT & LAPP, 1987) (Abb. 7). Zur Gewährleistung der richtigen Einstichtiefe wurden 4,5 bis 6 mm oberhalb der Kanülenspitze mit einem wasserfestem Stift Markierungen angebracht. Nach dem Eingriff wurden die

Fische für 15 Minuten in 5 l Becken separiert. Richtig injizierte Fische (> 95 % der Tiere) zeigten nach der Operation normales Schwimmverhalten und fraßen unmittelbar nach dem Einsetzen in die Haltungsbecken. Der Eingriff löste daher wohl keine Verhaltensbeeinträchtigung aus.

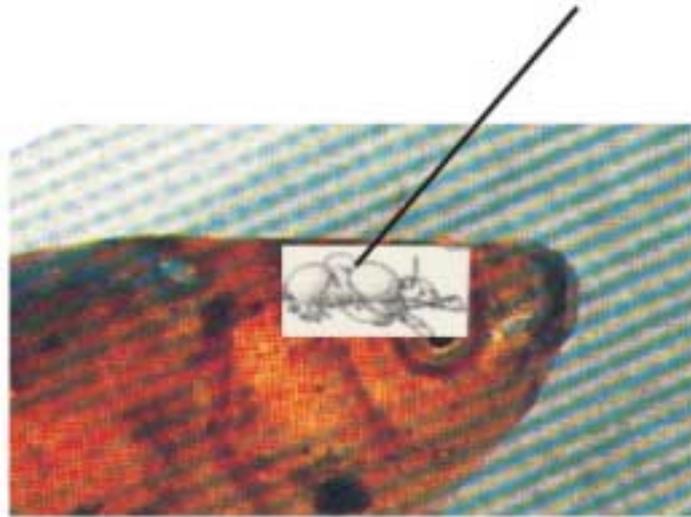


Abb. 7. Schema der intracerebroventrikulären Injektion in das Goldfischgehirn. Puromycinlösung wurde zwischen die optischen Tecta und das Cerebellum in den tectalen Hirnventrikel injiziert.

2.4.2 Antikörper-Injektionen

Zur Beurteilung, ob anti-Ependymin-Antikörper-Injektionen auch nach dem Erlernen einer operanten belohnten Konditionierungsaufgabe die Gedächtnisbildung beeinflussen oder blockieren, wie schon vorher bei aktiven Meidedressuren gezeigt (PIRONT & SCHMIDT, 1988; PRADEL et al., 1999), wurden die Tiere wie unter 2.4.1 beschrieben betäubt und für die Injektionen vorbereitet. 30 Minuten nach dem Erreichen des Lernkriteriums wurde den Lernern entweder 5 µl anti-Ependymin-Antikörper oder 5 µl Präimmunserum (Kontrollserum) in den IV. Hirnventrikel injiziert. Um unspezifische Einflüsse der Injektionen per se zu prüfen, erhielten zwölf Lerner 30 Minuten nach Erreichen des Lernkriteriums eine Injektion mit Präimmunserum. Als weitere Gruppe wurden zehn übertrainierte Fische 30 Minuten nach Beendigung des 10. Trainings mit anti-Ependymin-Antiserum injiziert. Zur Beurteilung der Gedächtnisleistung wurden die Fische aller Gruppen drei Tage nach der Injektion, das heißt am Tag vier, getestet.

2.5 Ependyminisolierung und -aufreinigung

Zur Gewinnung neuralen Ependymins wurde das Goldfischgehirn nach der von SCHMIDT und LAPP (1987) entwickelten Methode mittels verschiedener Zentrifugationsschritte fraktioniert.

2.5.1 Gehirnentnahme

Um Einblicke in Zeitläufe der Ependyminsynthese nach dem Erlernen des operanten Belohnungstrainings zu erhalten, wurde eine Gruppe von Lernern 5,5 Stunden, die andere neun Stunden nach Erreichen des Lernkriteriums dekapitiert. Mit Hilfe einer feinen Schere wurde die Schädelplatte abgetrennt und das freigelegte Gehirn mit einer feinen Pinzette an der Medulla oblongata angehoben. Nach Durchtrennung der Hirnnerven konnte das vollständige Gehirn aus dem Schädel genommen werden. Mit Tieren der Kontrollgruppen ("Nichtlerner", "naive" Tiere, "übertrainierte" Tiere) wurde ebenso verfahren.

2.5.2 Isolierung der Extrazellulärflüssigkeit (ECF)

Nach der Einwaage der Goldfischgehirne wurde je ein Gehirn in 1 ml gekühlten Puffer (40 mM Tris-HCl; pH 7,4; 105 mM NaCl; entsprach ca. 300 mOs; vgl. SCHMIDT & LAPP, 1987) gegeben. Dem Puffer waren die Proteasehemmer TPCK (N-Tosyl-2-phenylalanin-chloromethylketon; 0,3 mM) und Glutathion (1 mM) beigefügt. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 0 °C wurden die Gehirne abgefiltert und die extrahierte Extrazellulärflüssigkeit mit dem extrazellulären Ependymin bei 17.000 g in einer Ultrazentrifuge (L8-55, Beckman, Palo Alto, Kalifornien) zentrifugiert, um Blut und Gewebereste zu entfernen (modifiziert nach SCHMIDT & LAPP, 1987).

2.5.3 Gewinnung der cytoplasmatischen Fraktion

Je ein extrahiertes Gehirn wurde in 1 ml gekühlten Puffer (40 mM Tris-HCl; pH 7,4; 105 mM NaCl; Proteasehemmer: 0,3 mM TPCK; 1 mM Glutathion) eingebracht, und die Zellen mit Hilfe eines Homogenisators (Janke & Kunkel, Staufen) bei 840 rpm und 20-facher Auf- und Abbewegung des Pistills homogenisiert (modifiziert nach SCHMIDT & LAPP, 1987).

Das Homogenat wurde anschließend 30 Minuten bei 17.000 g zentrifugiert. Der erhaltene S₁₂ Überstand enthielt noch die cytoplasmatischen Bestandteile, aber auch synaptische Vesikel, Mitochondrienreste und Membranbruchstücke u. a.. Er wurde nochmals eine Stunde lang bei 100.000 g zentrifugiert, um die cytoplasmatische Fraktion S₃ zu erhalten. Nach dieser Probenaufbereitung konnte sowohl die Extrazellulärflüssigkeit als auch die cytoplasmatische Fraktion bei -80 °C bis zum Einsatz im Radioimmunoassay aufbewahrt werden.

2.5.4 Chromatographische Trennung

Isoliertes und aufgereinigtes Ependymin wurde als Standard im Radioimmunoassay benötigt. Das aufgereinigte Protein wurde radiojodiert und als Tracer im Radioimmunoassay eingesetzt. Ependymin lässt sich sowohl aus der ECF, als auch aus der cytoplasmatischen Fraktion gewinnen. Hier wird die Gewinnung aus der ECF beschrieben.

50 Gehirne wurden aus betäubten (s. 2.4.1) Fischen herauspräpariert und je fünf Gehirne in 2,5 ml TBS-Puffer (Tris-buffered saline, pH 7,4: 50 mM Tris-HCl, 90 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, 2 mM MnCl₂; ca. 286 mOsm), der die Proteasehemmer TPCK (0,3 mM) und Gluthathion (1 mM) enthielt, eingebracht und 30 Minuten extrahiert. Nach Abfilterung wurde der Extrakt bei 100.000 g 30 Minuten lang zentrifugiert. Im Überstand waren die löslichen Proteine der ECF enthalten. Glykoproteine mit α -glykosidischer Bindung, zu denen Ependymin gehört, lassen sich mit Hilfe von Concanavalin A, das an Sepharose gebunden ist, isolieren und reinigen (SCHMIDT & SHASHOUA, 1981). Die gewonnene ECF wurde zunächst eine Stunde lang mit Con A-Sepharose, das mit TBS equilibriert worden war, unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte sechsmaliges Waschen der Suspension mit je 50 ml TBS über einem Glasfilter, um ungebundene Proteine zu entfernen. Im Anschluss daran wurde die Suspension auf eine Chromatographiesäule gegeben, die an einen Fraktionssammler (LKB 2211 Superrac, Bromma, Schweden) angeschlossen wurde. Die Ependymine wurden mit 0,3 M Methyl- α -D-mannopyranosid eluiert, wobei die Absorption des Eluates bei 280 nm mit Hilfe eines Wellenlängendetektors (DFW-20, D-Star Instruments, Manassas, Virginia) gemessen wurde. Die gereinigten glykoproteinreichen Peakfraktionen wurden anschließend über einen Amicon-PM10-Filter (Amicon, Millipore, Eschborn) bei 4 °C unter Stickstoffdruck ultrafiltriert und auf ein Volumen von 2 ml aufkonzentriert.

2.5.5 Gelelektrophorese

Mit Hilfe der SDS (Sodiumdodecylsulfat)-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) nach der Methode von LAEMMLI (1970) wurden erhaltene Proteine weiter aufgetrennt. Dabei werden die Proteine in ihre Untereinheiten aufgespalten und denaturiert. Die denaturierten Proteine binden Laurylsulfat und wandern aufgrund ihrer negativen Aufladung in einem elektrischen Feld zur Anode.

Für die Elektrophorese wurde ein diskontinuierliches Polyacrylamidgel verwendet. Das vorbereitete Trenngel wurde entgast und nach Starterzugabe mit Hilfe eines dünnen Schlauches zwischen die Glasplatten eingebracht und mit Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Um Schwefelbrücken zwischen Cysteinresten zu spalten, wurde das mit Hilfe der Con A Säule

erhaltene Protein-Ultrakonzentrat unter Zusatz von 5 % β -Mercaptoethanol auf 95 °C erhitzt. Zu dem Gemisch wurde nach Abkühlung 10 % Glycerin und ein Tropfen Bromophenolblau zugesetzt. Die Proteinproben und Standards (Rainbow coloured protein molecular weight marker: Rinderserumalbumin 68.000 Da, Ovalbumin 45.000 Da, Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen 21.000 Da, Lysozym 14.300 Da; Amersham, Braunschweig) wurden auf das Gel aufgetragen und über Nacht bei 30 mA und 100 V aufgetrennt. Nach Fixierung der Proteine in 12,5 % Trichloressigsäure wurde das Gel in Coomassie-Blau-Lösung überführt. Nach dem Differenzieren in einem Entfärberbad konnten die Molekulargewichte der erhaltenen Proteinbanden ermittelt werden. Zur Elution der Proteine wurden die Proteinbänder aus dem Gel ausgeschnitten und in Szintillationsgläsern in je 0,7 ml Tris-Base gegeben. Die auf den pH 8,0 eingestellten Proteine wurden in Glasröhrchen gegeben, die unten mit einem Gelstopfen verschlossen waren. Diese Röhrchen wurden in Dialyseschlauchsäckchen (Visking, Typ 8/32, Wandstärke 0,05 mm; Roth, Karlsruhe) gestellt und zwischen einem oberen und einem unteren Pufferreservoir eingetaucht. Zwischen oberem und unterem Reservoir wurde eine Spannung von 100 V bei 3 mA pro Röhrchen angelegt und die Proteine in die Dialysesäckchen eluiert.

2.5.6 Puffer und Lösungen

TBS: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4
 90 mM NaCl
 2,5 mM CaCl₂
 2 mM MnCl₂
 1 mM Gluthation
 0,3 mM TPCK

Acrylamid Stammlösung A:

 60,0 g Acrylamid
 1,6 g Bisacrylamid
auf 200 ml mit H₂O auffüllen, filtrieren

Gelpuffer B, pH 8,8:

9,00 g Tris-Base

2,95 g Tris-HCl

0,13 g SDS

auf 40 ml mit H₂O auffüllen, pH mit 1 M Tris-Base oder HCl auf 8,8 einstellen und auf 50 ml auffüllen

Gelpuffer E, pH 6,8:

9,8 g Tris-HCl

1,0 g SDS

auf 80 ml mit H₂O auffüllen, pH mit 1 M Tris-Base bzw. HCl auf 6,8 einstellen und auf 100 ml auffüllen

Elektrodenpuffer, pH 8,3:

6,0 g Tris-Base

28,8 g Glycin

2,0 g SDS

auf 1500 ml auffüllen, den pH 8,3 mit HCl einstellen und auf ein Endvolumen von 2 l auffüllen

Färbelösung:

2,5 g Coomassie Blue in 1000 ml Entfärbelösung (s. u.)

Entfärbelösung:

227 ml H₂O und

227 ml Methanol

46 ml Eisessig

Trenngel:

48,0 ml Stammlösung A

31,2 ml H₂O

50,4 ml Gelpuffer B

38,4 µl TEMED

14,4 ml 0,3 %ige entgaste APS (Starter)

Sammelgel:

- 6 ml Gelpuffer E
- 18 ml H₂O
- 3 ml Acrylamid Stammlösung A
- 9 µl TEMED
- 3 ml APS (0,4 %ig)

2.6 Ependymin-Antiseren

Für die Quantifizierung von Ependymin mittels Radioimmunoassay standen polyklonale Antikörper zur Verfügung, deren Herstellung bei SHASHOUA (1977) und bei SCHMIDT & SHASHOUA (1981) beschrieben wird. Kaninchen wurden mit chromatographisch und gelelektrophoretisch aus der ECF und der Cytoplasmafraktion des Goldfischgehirns gewonnenen Ependymin-Monomeren (31 bzw. 37 kDa) immunisiert. Isoliertes Ependymin, das zwei N-Glykosylierungsstellen besitzt, wurde mit N-Glykosidase F deglykosyliert und das erhaltene Ependymin zur Immunisierung verwendet (SCHMIDT & SHASHOUA, 1981). Für das Präimmunserum wurde dem Kaninchen vor der Immunisierung Blut entnommen, die zellulären Bestandteile abzentrifugiert (30 Minuten bei 2500 g) und der Überstand (Präimmunserum) bei -70 °C eingefroren.

Für den Radioimmunoassay wurden folgende Antikörper eingesetzt:

- Antikörper gegen das cytoplasmatische β-37 kDa-Ependymin
- Antikörper gegen das cytoplasmatische γ-31 kDa-Ependymin

Für die oben erwähnten Injektionen wurde ein Antikörper gegen das deglykosylierte Ependymin verwendet (SCHMIDT 1989).

2.7 Bestimmung des Ependymingehaltes mittels Radioimmunoassay (RIA)

Im RIA (YALOW & BERSON, 1959) konkurrieren radioaktiv markierte Moleküle (Tracer) und identische, nichtmarkierte Moleküle um spezifische Bindeplätze an Antikörpern (TRAVIS, 1977; YALOW, 1977). Je weniger Tracer an Antikörper gebunden ist, desto höher ist die Konzentration der zu messenden Substanz und umgekehrt. Da in früheren Studien (SCHMIDT, 1987; SHASHOUA & HESSE, 1989) in der cytoplasmatischen Fraktion der höchste Ependymingehalt fünf Stunden nach der Verhaltensakquisition und in der ECF neun Stunden danach festgestellt worden war, wurden in den Versuchen der vorliegenden Arbeit Zeitfenster von 5,5 und neun Stunden nach der Verhaltensakquisition gewählt, um möglichst aussagekräftige Ergebnisse zum Ependymingehalt der verschiedenen Fraktionen zu erhalten. Untersucht wurde der Ependymingehalt der cytoplasmatischen Fraktion und der ECF von Lernern, Nichtlernern, übertrainierten Tieren und naiven Fischen.

2.7.1 Protein-Jodierung

Eine Lösung von 80 µl Ependymin (entspricht 80 µg Ependymin) wurde mit der IODO-GEN Methode (Pierce, Rockford, Illinois) als Tracer jodiert. Die Methode hat sich bewährt, da sie schnell durchzuführen und zudem kostengünstig und schonend ist. Das eingesetzte Reagenz ist milder als Chloramin-T und verursacht in den Zielproteinen weniger oxidative Zerstörungen (FRAKER & SPECK, 1978). Hierbei ist ein Reagenzglas mit dem Oxidationsmittel 1,3,4,6-Tetrachloro-3 α -6 α -diphenylglycouril beschichtet. Das Oxidationsmittel oxidiert $I^- \rightarrow I^+ + 2e^-$. Das nun vorliegende positive Radiojodion kann nun durch einen elektrophilen Angriff an der Ortho-Ringposition des Tyrosinrestes ein H-Atom substituieren, so dass ein H-Atom durch ein Radiojodisotop ersetzt wird. Man erhält also im Protein Monojod- und Dijodyrosinreste (Abb. 8). Bei höheren pH-Werten kann zudem der Imidazolring des Histidins gekennzeichnet werden.

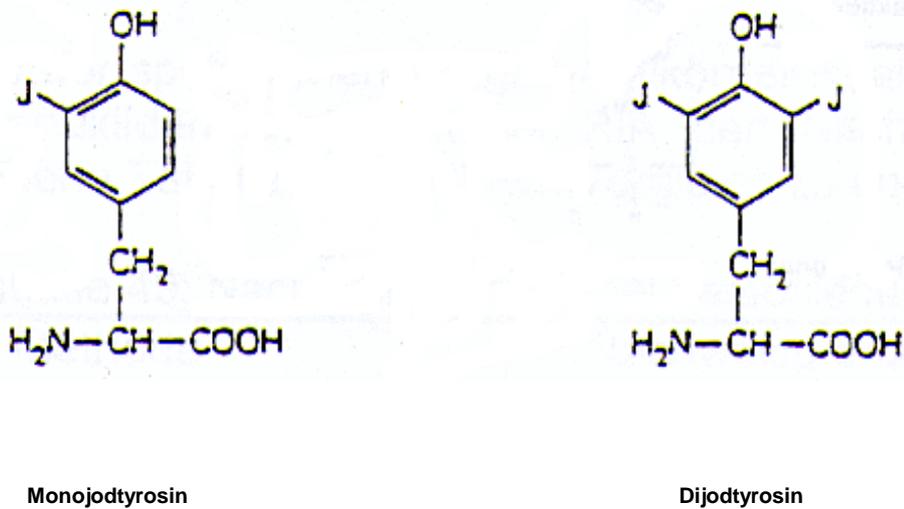


Abb. 8. Monojodtyrosin und Dijodtyrosin.

80 μl Ependymin (entsprechend 80 μg Ependymin) wurden in 420 μl 0,05 M NaP_i -Puffer (pH 7,5) gelöst und vorsichtig in das IODO-GEN Röhrchen gegeben. Dazu wurde 5 μl $\text{Na} [^{125}\text{I}]$ (spezif. Aktivität = 3,8 GBq/ml; 5 μl = 0,51 mCi) gegeben und zehn Minuten lang vorsichtig geschüttelt. Zur Beendigung der Reaktion wurde das Gemisch in ein Reagenzglas abgegossen. Dabei bleibt das stark hydrophobe Oxidationsmittel an den Gefäßwänden des IODO-GEN Röhrchens zurück. Um markiertes Protein von restlichem Natriumjodid und Proteinbruchstücken zu trennen, wurde die Molekülsiebchromatographie verwendet. Das Gemisch wurde auf eine vorher mit Phosphat-Gelatine-Puffer (0,05 M NaP_i -Puffer; 0,1 % Gelatine) equilibrierte Sephadex G75 "superfine" Säule gegeben und Fraktionen à 10 Tropfen gesammelt. Jeder Tropfen besaß ein Volumen von 70 μl . 3 μl jeder Fraktion wurden im γ -Counter (Minaxi, Series 5000, Packard, Canberra) gezählt. Der erste Peak enthielt das markierte Protein, das nun als Tracer für den RIA zur Verfügung stand (Abb. 9). Die zweite kleinere "Schulter" beinhaltete jodierte Proteinbruchstücke und wurde verworfen, da in diesen Fraktionen der Tracer defekt war. Die folgenden Fraktionen enthielten freies Radiojodid. Die Ausbeute an markiertem Protein errechnete sich beispielhaft folgendermaßen:

Die Peakfraktionen (9 Fraktionen à 3 μl) besaßen in insgesamt 27 μl 5.073.355 dpm. Das entsprach 84.555,9 Bq in 27 μl . Da eine Fraktion 700 μl enthielt, also die Peakfraktionen insgesamt ein Volumen von 6,3 ml hatten, entsprach das einer Radioaktivität von 19,73 MBq oder 0,533 mCi. Bei einer eingesetzten Gesamtradioaktivität von 0,689 mCi (realer

Nennwert) entsprach das einer Ausbeute von 77,4 %, was bedeutete das 77,4 % der eingesetzten Radioaktivität an Protein gebunden worden war.

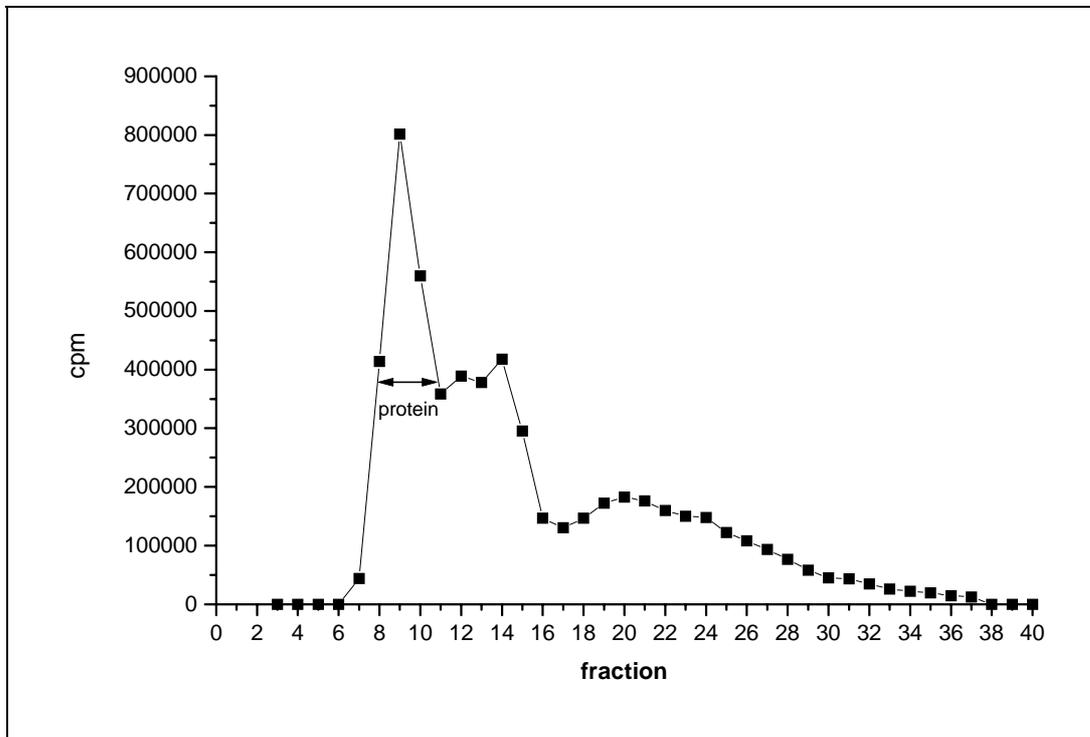


Abb. 9. Typisches Elutionsprofil von ^{125}I -markiertem Ependymin auf der Sephadex G 75 Säule. Dargestellt ist ein Elutionsprofil einer anderen Jodierung als der oben erwähnten. Die Abbildung zeigt die erhaltene Radioaktivität der einzelnen Fraktionen in cpm (counts per minute). 100 μl Ependymin wurden nach Anleitung mit Hilfe der IODO-GEN-Methode jodiert. Das erhaltene Gemisch wurde auf eine mit Phosphat-Gelatine-Puffer equilibrierte Sephadex G 75 Säule gegeben. Jede Fraktion bestand aus zehn Tropfen Eluat. Die Radioaktivität von 3 μl der einzelnen Fraktionen wurde im γ -Zähler bestimmt. Der erste Peak enthält das ^{125}I -markierte Ependymin. Bei dieser Elution sind 35% der eingesetzten Radioaktivität an Protein gebunden worden.

2.7.2 Vorbereitung der Proben für den RIA

Die ECF und die cytoplasmatische Fraktion wurden unverdünnt, 1:5, 1:25, 1:125 und 1:625 verdünnt eingesetzt.

2.7.3 Ansatz des RIA

Zu Beginn wurden 200 µl spezifischer anti-Ependymin-Antikörper in 200 ml Phosphat-Gelatine Puffer (0,05 M NaP_i-Puffer, pH 7,5; 0,1 % Gelatine) gelöst (entsprechend einem Titer von 1/1000). In jedes RIA-Röhrchen wurde nun 1 ml der Antikörperlösung pipettiert. Zur Erstellung einer Eichreihe wurden abnehmende Menge von 5 µg bis 0,0025 µg (jeweils zur Hälfte verdünnt) Ependymin γ als RIA-Standards in RIA-Röhrchen pipettiert (je dreifacher Ansatz). Die Proben der ECF und cytoplasmatischen Fraktion, deren Ependymingehalt bestimmt werden sollte, wurden jeweils 5-fach verdünnt, so dass man unverdünnte bis 625-fach verdünnte Proben erhielt. Das Verdünnen der Proben diente dem Zweck, nach Erstellung der Eichkurve mit den Verdünnungen, deren prozentuale Bindung im Bereich der größten Eichkurvensteigung und damit im Bereich größter Messgenauigkeit liegt, zu arbeiten und zu rechnen. Vor dem Einsatz der Proben im RIA wurden diese drei Minuten lang im Wasserbad gekocht, um dimeres Ependymin zu β - und γ -Monomeren zu dissoziieren (SCHMIDT & SHASHOUA, 1981). Der RIA ist für die Monomeren β und γ hochspezifisch, differenziert aber nicht zwischen den β - und γ -Monomeren und erkennt die dimere Form nicht (SCHMIDT & SHASHOUA, 1983). Die Proben wurden jeweils dreifach eingesetzt. 100 µl der Proben der ECF und cytoplasmatischen Fraktion und ihrer jeweiligen Verdünnungen wurde pro RIA-Röhrchen zu dem ersten Antiserum pipettiert. Die RIA-Röhrchen, welche den ersten Antikörper + Ependyminstandard, bzw. den ersten Antikörper + die zu messenden Proben enthielten, wurden anschließend 60 Minuten lang bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Die Reaktion der Antikörper mit den Antigenen wird auf diese Weise wesentlich beschleunigt. Anschließend wurde das als Tracer jodierte Ependymin so in Phosphat-Gelatine-Puffer verdünnt, dass das Volumen von 100 µl dieser verdünnten Tracerlösung, die in jedes RIA-Röhrchen pipettiert wurde ungefähr 0,05 µg jodiertes Ependymin als Tracer enthielt. Die Röhrchen wurden erneut 60 Minuten im Wärmeschrank inkubiert und danach 15 Stunden lang ins Kältelabor gestellt. In der Kälte ist die Antigen-Antikörperbindung stabiler.

Der RIA wurde mit der Doppelantikörpertechnik angesetzt (CHARD, 1977; TRAVIS, 1977). Dabei wird ein zweiter Antikörper eingesetzt (Ziege-anti-Kaninchen IgG, ein von dem Hersteller nicht näher beschriebenes Immunopräzipitationsreagenz für RIA, Sigma, Deisenhofen), um zusammen mit dem ersten Antigen-Antikörper-Komplex einen größeren Komplex zu bilden, der ein unlösliches Präzipitat erzeugt, welches leicht mittels Zentrifugation zu sedimentieren ist.

Ein Volumen von 0,9 ml dieser zweiten Antikörpersuspension wurde am nächsten Tag jedem RIA-Röhrchen zugegeben. Nur den Kontrollröhrchen NSB (nicht spezifische Bindung) und den Totals (Erklärung s. u.) wurde kein Antikörper zugegeben. Der RIA-Ansatz wurde wiederum im Wärmeschrank inkubiert, und über Nacht gekühlt. Am darauffolgenden Tag wurde der Antigen-Antikörper-Komplex bei 3000 rpm und 4 °C 30 Minuten mit einer Beckman J-6B Zentrifuge (Beckman, Palo Alto, Kalifornien) abzentrifugiert und der Überstand abgegossen. Der Überstand der Totals (drei Stück) wurde nicht abgegossen, damit an ihnen die eingesetzte Gesamtradioaktivität gemessen werden konnte. Mit Hilfe der NSB-Röhrchen, denen kein Antikörper zugegeben wurde, wurde bestimmt, wie viel Radioaktivität nach Abgießen des Überstandes an den Röhrchen haften blieb. Dieser NSB-Background wurde dann vom γ -Counter automatisch abgezogen.

Tab. 1.: Ansatz des eingesetzten Radioimmunoassays. Die Tabelle stellt dar, wie die vier verschiedenen eingesetzten RIA-Röhrchen beschickt wurden.

	Standards	Proben	Totals	NSB (nicht spezifische Bindung)
1 ml 1. Antikörperlsg.	+	+	-	-
5 - 0,0025 µg Ependymin	+	-	-	-
100 µl Probe	-	+	-	-
100 µl Tracer	+	+	+	+
0,9 ml 2. Antikörper	+	+	-	-

2.8 Proteinbestimmung nach Lowry

Um im RIA ermittelte Ependymingehalte der verschiedenen Fraktionen auf den Gesamtproteingehalt beziehen zu können, musste dieser mit Hilfe des photometrischen Verfahrens nach LOWRY und Mitarbeitern bestimmt werden (LOWRY et al., 1951). Dabei wird wahrscheinlich Cu^{2+} im entstandenen Kupfer-Protein-Komplex zu Cu^+ reduziert, welches dann mit dem Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz reagiert. Die dabei entstehende tiefblaue Färbung wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 750 nm vermessen (LOTTSPREICH & ZORBAS, 1998).

Entweder 200 μl ECF-Probelösung oder 50 μl Probelösung der cytoplasmatischen Fraktion wurden mit 5 % SDS in 0,5 M NaOH-Lösung auf ein Volumen von 500 μl aufgefüllt und anschließend zwei Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde je Probe 2,5 ml 2 % Na_2CO_3 -Kupfertartrat-Lösung zugegeben und nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten 250 μl 1 N Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz zugesetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 20 Minuten wurde die Extinktion bei 750 nm im Spektralphotometer (Shimadzu, UV-160A, Kyoto) gemessen. Die Proteinkonzentrationen der jeweiligen Proben konnten durch Vergleich mit einer BSA-Standardreihe von 0 – 300 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt werden.

2.9 Versuche zur Kälteeinwirkung auf den cerebralen Ependymingehalt

Da vor kurzem von der Arbeitsgruppe TANG (TANG et al., 1999) festgestellt wurde, dass die Transkription von Ependymin bei Karpfen und Zebrafischen kälteinduziert ansteigt, was mit Hilfe von Rnase-Protection-Assays und Northern-Blots nachgewiesen werden konnte, die Translation von Ependymin dagegen nicht (dies ergaben Western-Blots), wurde zusätzlich zu den Verhaltensversuchen mit Hilfe des RIA untersucht, ob und in wieweit der Ependymingehalt sich unter Kälteeinfluss verändert.

Dazu wurden drei Goldfischgruppen (je drei Fische) unterschiedlichen Kältebehandlungen unterzogen. Zu Versuchsbeginn wurden alle Fische bei 18 °C gehalten. Die Fische der ersten Gruppe (Kontrolle) wurden sofort dekapitiert und ihre Gehirne herauspräpariert. Die Fische der Gruppe zwei wurden in Eiswasser eingebracht und nach 10 Minuten dekapitiert. Die Fische der Gruppe drei wurden in einem Becken mit Hilfe eines 2219 Multitemp II

Thermostatic Circulators (LKB, Bromma, Schweden) innerhalb von zwei Stunden von 18 °C auf 5,5 °C abgekühlt. Die Fische wurden über Nacht 14 Stunden bei dieser Temperatur gehalten und anschließend ebenfalls dekapitiert. Dieses Zeitprotokoll sollte den Vergleich der Ergebnisse mit denen der Arbeitsgruppe TANG ermöglichen. Die Aufbereitung der ECF und der cytoplasmatischen Fraktion zur Ependyminquantifizierung im RIA entsprach der in 2.5.2 und 2.5.3 angegebenen. Der Gesamtproteingehalt wurde ebenfalls mit der Methode nach LOWRY und Mitarbeitern bestimmt (LOWRY et al., 1951).

2.10 Versuche zur Kartierung der Gehirnaktivität bei der Farbdressur mit [¹⁴C]-Desoxyglukose

Der Glukosestoffwechsel im Gehirn lässt sich mittels Szintigramm über die Ablagerung von [¹⁴C]-2-Desoxyglukosephosphat in Zellen des ZNS darstellen und quantifizieren (SOKOLOFF et al., 1977). Injizierte [¹⁴C]-2-Desoxyglukose wird über die Blut-Hirnschranke in stoffwechselaktive Zellen aufgenommen. Da der Glukose am zweiten C-Atom der Sauerstoff fehlt, kann durch die Hexokinase gebildetes 2-Desoxyglukose-6-phosphat nicht weiter abgebaut werden und reichert sich im Cytoplasma an. Nach der Herstellung von Frontalschnitten verschiedener Hirnregionen kann der dort vorhandene ¹⁴C-Gehalt mit Hilfe des Microimagers (Zinsser Analytic, Frankfurt) digital dargestellt und mit einem unterstützenden bildanalytischen Programm (β-Vision) quantifiziert werden.

Goldfische wurden 20 Minuten vor Beginn der Farbdressur unter Narkose (0,1 % MS 222) mit 29,6 kBq [¹⁴C]-2-Desoxyglukose in 4 µl 0,9 %iger NaCl-Lösung intraperitoneal mittels einer Hamiltonspritze injiziert. Die Fische wurden nach 20-minütiger Erholungsphase in einem geschwärzten 5 l-Aquarium in der Farbdressur trainiert. Unmittelbar nach Beendigung des ca. 35-minütigen Trainings wurden die Fische dekapitiert und die Gehirne gefriereingebettet.

Die Gehirne wurden wie unter 2.5.1 beschrieben entnommen und bis zum Absinken in 30 % Saccharose, gelöst in PBS über Nacht belassen und dann in Gefriereinbettmedium (Jung, Leica, Wetzlar) expediert und in -160 °C kaltem Isopentan eine Minute lang schockgefroren. Die Gefrierpunktserniedrigung half, Gefrierartefakte zu reduzieren. Für das

schnellere Durchfrieren der Gehirne und folglich eine bessere Gewebeerhaltung kam ein eigens angefertigtes Kupfergestell zum Einsatz. Das Kupfergestell bestand aus einer quadratischen "Plattform" mit abnehmbaren Seitenwänden, an der ein Stiel befestigt war. In die "Plattform" mit Seitenwänden wurde Gefriereinbettmedium und ein Gehirn gegeben. Mit Hilfe des Stiels konnte der Experimentator das Gehirn in schmelzendes Isopentan eintauchen. Anschließend konnten die Seitenwände der "Plattform" entfernt werden und das Gehirn entnommen werden. Gefrorene Gehirne wurden bis zur Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

Im Mikrotom-Kryostat (HM 500 OM, Microm, Walldorf) wurden Frontalschnitte des Bulbus olfactorius, des vorderen Telencephalon, des Tectum opticum, des Cerebellum (Corpus cerebelli), der Vaguskerne mit dem Lobus facialis, der Medulla oblongata (Abb. 10) und Sagittalschnitte des gesamten Gehirns in einer Schnittdicke von 20 µm hergestellt und anschließend eine Stunde bei 60 °C getrocknet. Je ein Schnitt konnte dann im Microimager auf seine Desoxyglukoseverteilung und den Desoxyglukosegehalt hin gemessen werden. Der Microimager hat den Vorteil, dass die verteilten radioaktiven β^- -Zerfälle on-line in Echtzeit-Darstellung mit hoher Auflösung (15 µm) auf einem Computer-Monitor dargestellt und bildanalytisch bearbeit werden können.

Vor dem Einbringen in den Microimager wurde ein Feststoffsintillator-Blättchen über den zu bestimmenden Schnitt gelegt. Die beim β^- -Zerfall des $[^{14}\text{C}]$ aus der Probe emittierten Elektronen treffen auf den Szintillator. Hier wird die Energie der Elektronen in Szintillationslicht umgewandelt. Nach der Bedeckung der radioaktiven Probe mit dem Szintillator wird diese mit einem Stempel an den Detektor herangefahren. Dort schlagen die vom Szintillator emittierten Photonen Elektronen aus der Photokathode, die in einem Hohlleitersystem verstärkt und auf einen Fluoreszenzschirm geleitet werden. Vom Fluoreszenzschirm emittiertes Licht wird dann von einer CCD-Kamera gefilmt. Das registrierte Bild wird an einen Computer weitergegeben, wo der Ort des β^- -Zerfalls exakt bestimmt wird. Zusammenfassend wird demnach jedes einzelne radioaktive Zerfallsereignis individuell detektiert, gespeichert und on-line an einen Computer weitergegeben und hier mit Hilfe eines Akquisitionsprogrammes (β -Vision Akquisition) aufgezeichnet.

Miteinander verglichen wurden Lerner, Nichtlerner und naive Fische. Die naiven Tiere wurden mit radioaktiver $[^{14}\text{C}]\text{-2-Desoxyglukose}$ injiziert und 20 Minuten später in das Versuchsbecken mit der Versuchsanordnung gesetzt, wo sie aber nicht trainiert wurden.

Nach 35 Minuten wurden die naiven Fische dann dekapitiert. Diese Zeitspanne entsprach der durchschnittlichen Aufenthaltszeit lernender Tiere von ca. 35 Minuten.

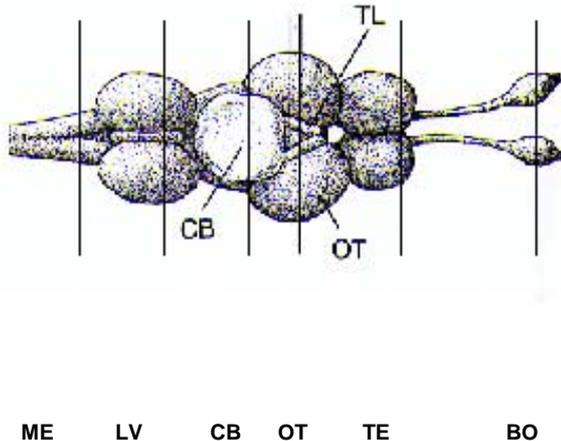


Abb. 10. Schematische Darstellung der Schnittebenen (Goldfischgehirn in Aufsicht) der mit Hilfe der $[^{14}\text{C}]$ -2-Desoxyglukose-Methode untersuchten Frontalschnitte. Der Glukosestoffwechsel in verschiedenen Hirnregionen wurde mit Hilfe der quantitativen Autoradiographie ermittelt. Frontalschnitte des Bulbus olfactorius (BO), des rostralen Telencephalon (TE), des Tectum opticum (OT), des rostralen Cerebellum, der rostralen Vaguskerne (LV = Lobus vagi) und der rostralen Medulla (ME) wurden auf die Quantität des Glukosemetaboliten 2-Desoxyglukose-6-phosphat hin analysiert. TL = Torus longitudinalis. Abbildung verändert nach GIBBS & NORTHMORE (1998).

2.11 Statistische Auswertung

Zur Auswertung der Ergebnisse der Farbdressur wurde nach Prüfung auf Normalverteilung der Daten der Mann-Whitney-U-Test für den Vergleich zweier unabhängiger Stichproben verwendet (vgl. LAMPRECHT, 1992). Für den Vergleich der mit Puromycin injizierten Lerner vor und nach der Behandlung wurde nach Test auf Normalverteilung der t-Test für gepaarte Stichproben verwendet.

Die im RIA ermittelten Ependymin-Gehalte der ECF und der cytoplasmatischen Fraktion wurden mit Hilfe des Ausreißertests nach Nalimov (KAISER & GOTTSCHALK, 1972) auf ihre Homogenität überprüft. Daten, die signifikant (99 %) als Ausreißer bestimmt wurden, wurden nicht in weitere Auswertungen mit einbezogen.

Da die Daten mancher Versuchsgruppen der 2-Desoxyglukose-Versuche als auch mancher Ependymingehalte nur eine kleine Stichprobenanzahl umfassten ($n = 5$ bis 7) konnte keine Normalverteilung der Messdaten garantiert werden. In diesem Fall konnte der Kolmogorov-Smirnov-Omnibustest (LIENERT, 1973), der auf Verteilungsunterschiede zwischen zwei unabhängigen Stichproben anspricht, verwendet werden. Die Nullhypothese nimmt an, dass zwei Stichproben aus identisch verteilten Populationen stammen, die Alternativhypothese, dass die beiden Stichproben aus unterschiedlich verteilten Populationen stammen. Hat die vom Test ausgegebene Unterschreitungswahrscheinlichkeit einen Wert, der größer als $\alpha = 0,05$ ist, so ist die Nullhypothese beizubehalten, ist sie kleiner als $\alpha = 0,05$, so kann die Alternativhypothese angenommen werden. Erhaltene Daten werden als Mittelwert mit der Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) und mit der Zahl der Messwerte angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Verhaltensversuche

3.1.1 Lernverhalten

Goldfische wurden darauf trainiert, das Aufleuchten eines bestimmten Farbstimulus ($\Delta+$) mit einer Verhaltensantwort, dem Anschwimmen an die Futterbelohnung enthaltende Futterbox zu beantworten. Von 126 in der Farbunterscheidungsdressur trainierten Goldfischen erreichten, bei Zusammenrechnung aller Farbunterscheidungsdressuren 62 (49,2 %) das Lernkriterium von fünf richtigen Verhaltensaktionen innerhalb sechs aufeinander folgender Trainingsrunden und wurden als Lerner eingestuft. Anzumerken ist, dass der Begriff Lerner nur auf das hier zu prüfende Verhalten angewendet wird, und keine Aussage zulässt, ob und inwieweit der Fisch andere Aufgaben erlernt. Durchschnittlich benötigten Lerner 9,7 Trainingsrunden zum Erlernen der Aufgabe. Das Verhalten der Fische unterschied sich individuell, wenn sie das erste Mal in die Trainingsapparatur eingesetzt wurden. Ängstlichere Tiere brauchten oft ein paar Minuten, um sich an die gegenüber der Vordressur veränderten Bedingungen (Vorhandensein eines Lichtsignals in den Futterboxen, Einzeltraining) zu gewöhnen; andere Fische schwammen sofort nach dem Einsetzen in das Versuchsbecken die Futterboxen an. 64 Fische (50,8 %) erreichten das Lernkriterium nicht ("Nichtlerner"). Diese Fische schwammen entweder keine oder irgendeine Box an, zeigten zwar hin und wieder richtige Verhaltensaktionen, konnten aber keine Assoziation Farbe-Anschwimmreaktion bilden.

3.1.2 Unterschiede in der Erlernbarkeit der Farbunterscheidungsdressuren

Mit dem Einsatz dreier unterschiedlicher Farbunterscheidungsdressuren (s. 2.3.2; Rotdressur, Blaudressur, Gründressur) sollte geprüft werden, welche dieser Dressuren gut geeignet ist, eine ausreichende Anzahl von Lernern für die verschiedenen Untersuchungen zu erhalten, gut zu erinnern ist und zudem für den Fisch in höchstens 45 Minuten zu erlernen ist.

Auffallend war, dass für die Fische die verschiedenen Farbunterscheidungsdressuren unterschiedlich schwer zu erlernen waren. So erreichte kein in der Gründressur trainierter Goldfisch im ersten Training das Lernkriterium (Abb. 11). Nur ein Goldfisch ließ sich nach mehrfachem Training auf Anschwimmen der mit dem grünen Signal ausgestatteten Zielbox trainieren. Von zehn in der Blaudressur trainierten Goldfischen erreichten drei Tiere im ersten Training das Lernkriterium. Fische, die erstmals in die Blaudressur eingesetzt wurden, mieden das blaue Licht. Da es auch in dieser Dressur schwierig schien, eine ausreichende Anzahl von Lernern für die Injektionsversuche und die biochemischen Untersuchungen zu erhalten, wurde schließlich der Rotdressur für die nachfolgenden Untersuchungen der Vorzug gegeben. In der Rotdressur erreichten 55 % von 107 der erstmalig trainierten Fische das Lernkriterium.

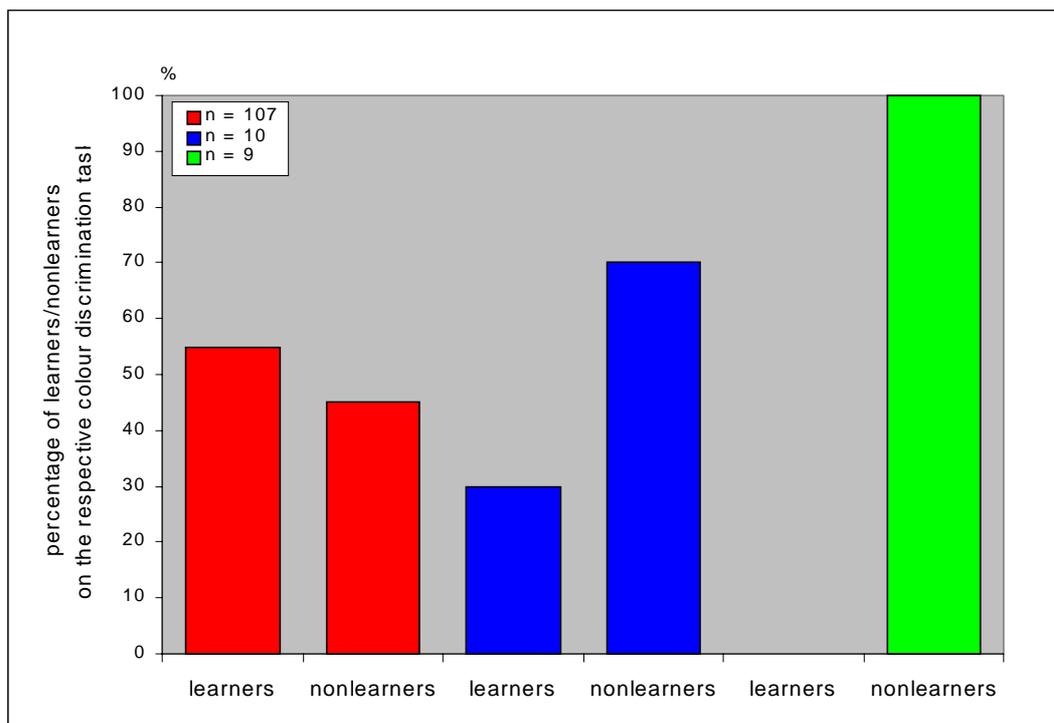


Abb. 11. Prozentualer Anteil von Lernern und Nichtlernern an der jeweiligen Farbunterscheidungsdressur (Rot-, Blau- und Gründressur). Am größten war der Anteil von Lernern in der Rotdressur mit 55 %. Kein Goldfisch erreichte in der Gründressur im ersten Training das Lernkriterium. Somit wurden im Folgenden alle Fische in der Rotdressur trainiert, um eine ausreichende Anzahl von Lernern für die Injektionsversuche und die biochemischen Untersuchungen zu erhalten.

3.1.3 Einfluss von injiziertem Puromycin auf die Gedächtnisbildung

Mit Injektionen von Puromycin sollte festgestellt werden, ob die Gedächtniskonsolidierung nach einer appetitiven operanten Dressur proteinsyntheseabhängig ist, und ob ferner das Abrufen des bereits gebildeten Gedächtnisses bei übertrainierten Fischen proteinsyntheseabhängig ist, d. h. Rekonsolidierungsvorgänge vorhanden wären.

30 Minuten nach Erreichen des Lernkriteriums wurde insgesamt sechs Lernern, die im ersten Training ein überdurchschnittlich hohes Lernniveau erreicht hatten (\bar{x} 12,1 richtige Wahlen), Puromycin (170 μ g Puromycin/10 μ l 0,9% NaCl) intracerebroventrikulär injiziert. Drei Tage später wurden diese Fische in der Trainingsapparatur getestet und die Anzahl richtiger Verhaltensantworten im Test mit den Antworten im ersten Training verglichen, wobei die Anzahl richtiger Wahlen auf die Zahl möglicher Runden von 15 hochgerechnet wurde. In einem weiteren Experiment zur Untersuchung von Phänomenen der Rekonsolidierung wurden drei übertrainierte Tiere verwendet, die in ihren letzten Trainingsdurchläufen mit hochgerechnet 15 richtigen Verhaltensaktionen keine Fehler mehr machten. Sie wurden 30 Minuten nach Durchführung des letzten Trainings intracerebroventrikulär injiziert.

Injizierte Lerner wählten im Durchschnitt 8,7 mal richtig und schnitten im Test signifikant schlechter ab, als in ihren ersten Trainingsversuchen, in denen sie durchschnittlich 12,1 richtige Wahlen trafen (Abb. 12; gepaarter t-Test; $p < 0,05$). Auch bei zwei übertrainierten Fischen war ein deutlicher Einfluss von Puromycin-Injektionen zu beobachten. Bei ihnen verringerte sich im drei Tage später durchgeführten Test die Häufigkeit der richtigen Verhaltensantworten, während der dritte übertrainierte Goldfisch im Test keine Fehler machte, so dass die drei Fische durchschnittlich 11,5 richtige Wahlen im Test erzielten (Abb. 12). Somit zeigt die Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses bei Goldfischen auch nach dem Erlernen einer futterbelohnten, positiv verstärkten Farbunterscheidungsdressur eine Proteinsyntheseabhängigkeit. Auch das Wiederabrufen des bereits gebildeten Langzeitgedächtnisses erwies sich für zwei der übertrainierten Fische als anfällig gegenüber dem eingesetzten Proteinsynthesehemmer.

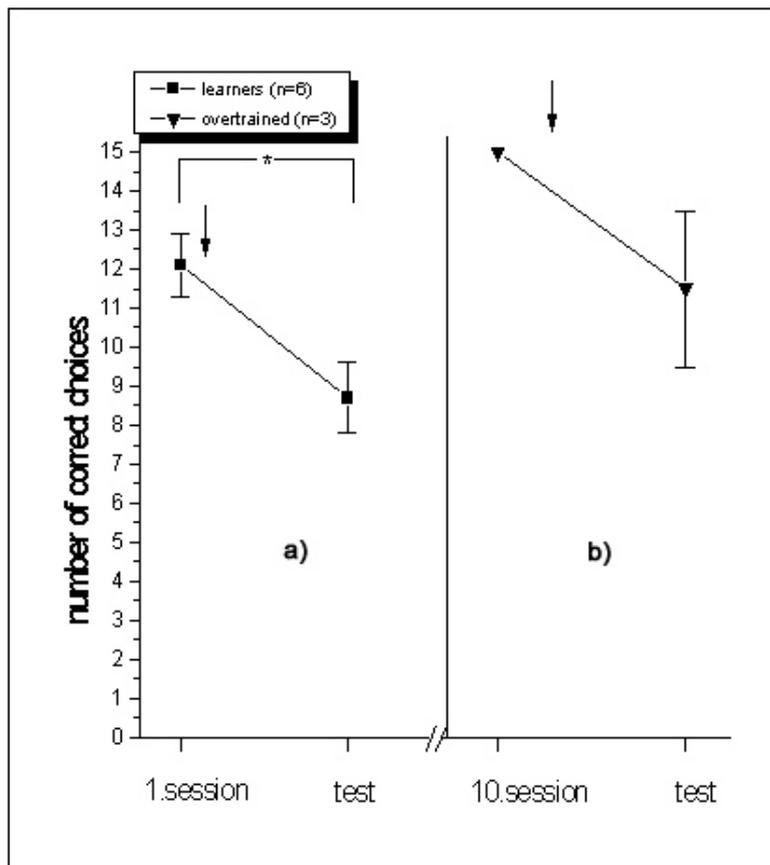


Abb. 12. Einfluss von intracerebral injizierter Puromycinlösung auf die Anzahl richtiger Wahlen im Test von a) Lernern und b) übertrainierten Fischen. Die Pfeile deuten die Injektionen an, die den Tieren 30 Minuten nach dem ersten bzw. zehnten Training gegeben wurden. Lerner (n = 6) erzielten im Test eine signifikant geringere Häufigkeit richtiger Wahlen als im ersten Training (gepaarter t-Test; $p < 0,05$). Zwei der drei übertrainierten Fische (n = 3), die im vorangegangenen Test immer richtig gewählt hatten, also 15 mal, erzielten im Test eine deutlich geringere Häufigkeit richtiger Wahlen. Der dritte übertrainierte Fisch machte im Test keine Fehler.

3.1.4 Einfluss von Injektionen mit anti-Ependymin-Antikörpern auf die Gedächtnisbildung

Intracerebrale Injektionen mit einem Ependymin-Antikörper nach der Verhaltensakquisition sollten Auskunft über eine mögliche Beteiligung dieses Substratadhäsionsmoleküls auch nach belohnter operanter Farbunterscheidungsdressur geben.

30 Minuten nach dem Erreichen des Lernkriteriums wurden insgesamt 13 Lerner mit anti-Ependymin-Antikörpern intracerebroventrikulär injiziert. Drei Tage danach wurden diese Fische in der Trainingsapparatur getestet und die Anzahl richtiger Verhaltensantworten im Test mit den Antworten im ersten Training verglichen. Dabei wurde die Anzahl der Wahlen, bei denen die Fische richtig gewählt hatten, auf die mögliche Rundenzahl von 15 hochgerechnet (vgl. 2.3.5).

Injizierte Lerner zeigten im Test mit durchschnittlich 8,5 signifikant weniger richtige Verhaltensantworten als nicht injizierte Lerner, die im Test auf durchschnittlich 11,3 richtige Verhaltensaktionen kamen (Abb. 13, Mann-Whitney-U-Test; $p < 0,025$). Injizierte Fische schnitten im Test sogar etwas schlechter ab als in ihren ersten Trainingsversuchen, in denen sie durchschnittlich 9,7 richtige Antworten erzielten. Dagegen wählten injizierte Fische im folgenden Trainingsdurchlauf (3. Training) mit durchschnittlich 11,4 Treffern fast genauso häufig die richtige Futterbox, wie nicht injizierte Fische (11,9) und steigerten sich im vierten Training auf 11,7 korrekte Antworten. Nicht injizierte Goldfische hatten hier 12,6 richtige Verhaltensaktionen. Die im dritten und vierten Trainingsdurchlauf gezeigten Verhaltensantworten beider Gruppen unterschieden sich nicht signifikant.

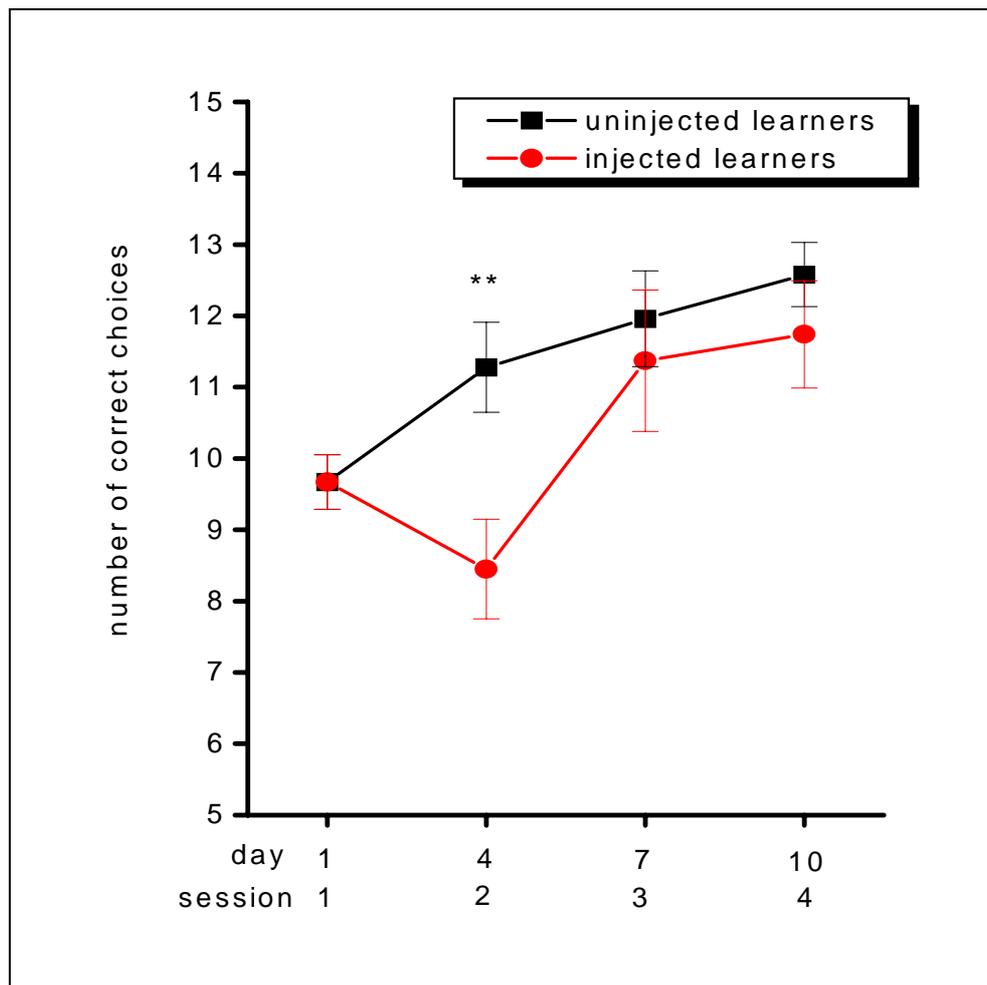


Abb. 13. Häufigkeiten richtiger Wahlen injizierter und nichtinjizierter Lerner in den ersten vier aufeinander folgenden Trainingsdurchläufen, hochgerechnet auf die mögliche Anzahl von 15 Trainings-/Testrunden. Injizierte Lerner wählten im Test (zweiter Trainingsdurchlauf) signifikant (Mann-Whitney-U-Test; $p < 0,025$) seltener richtig als nicht injizierte Fische, und trafen weniger richtige Wahlen als im ersten Training. Dagegen waren sie in den beiden darauffolgenden Trainingsdurchläufen fast genauso erfolgreich wie nicht injizierte Tiere (Unterschiede nicht signifikant).

Um Einflüsse der Injektion auf die Gedächtniskonsolidierung zu testen, wurde eine Gruppe von Lernern 30 Minuten nach Erreichen des Lernkriteriums im ersten Training nicht mit anti-Ependymin-Antiserum, sondern mit Präimmenserum injiziert (Abb.14). Derartig behandelte Fische wählten im Test mit durchschnittlich 13,2 häufiger richtig als uninjizierte Fische, der Unterschied war aber nicht signifikant. So wird deutlich, dass die mit dem Präimmenserum

injizierten Lerner im Test (Tag 4) nicht die Fehler machten, die die mit dem anti-Ependymin-Antikörper injizierten Fische am Tag 4 zeigten (vgl. auch mit Abb. 13).

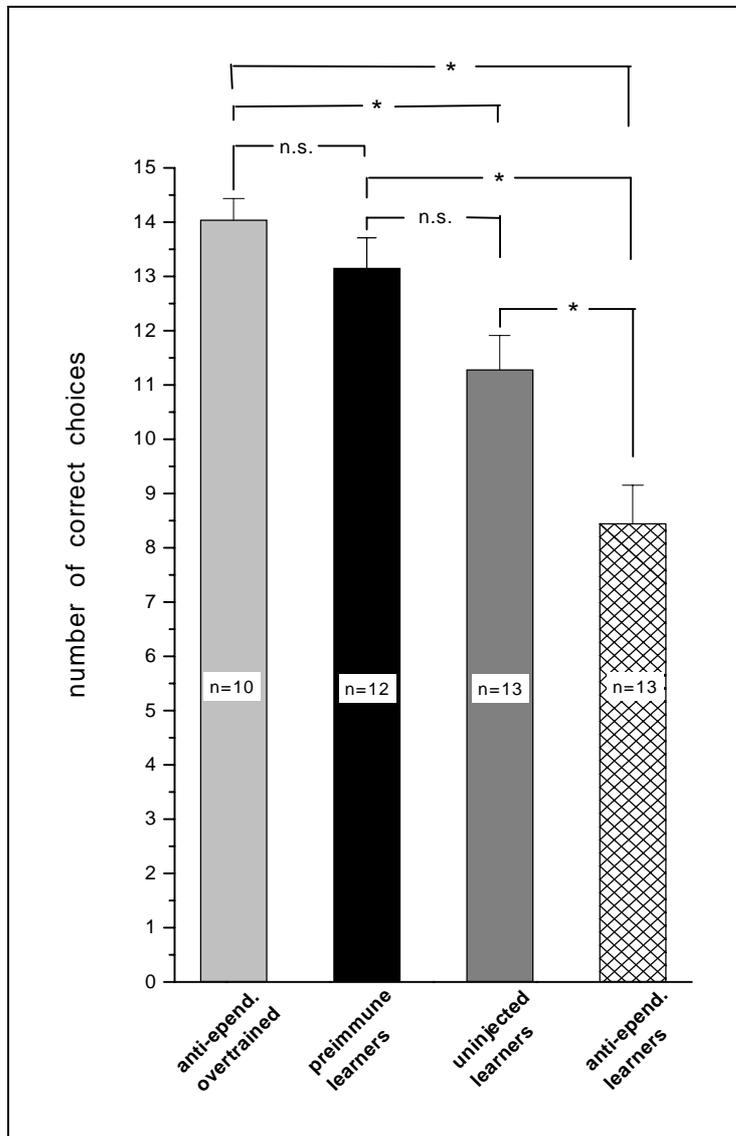


Abb. 14. Häufigkeit richtiger Verhaltensantworten im Test, hochgerechnet auf 15 Trainings-/Testrunden.

Nicht injizierte Lerner wählten im Test signifikant häufiger richtig als die mit anti-Ependymin-Antikörpern injizierten Fische. Auch die mit Präimmenserum intracerebroventrikulär injizierten Lerner wählten signifikant häufiger richtig als die mit anti-Ependymin-Antikörpern injizierten Lerner. Mit anti-Ependymin-Antikörpern injizierte übertrainierte Fische zeigten im Test die häufigsten richtigen Verhaltensaktionen und wählten sogar signifikant häufiger richtig als nichtinjizierte Lerner (* Mann-Whitney-U-Test; $p < 0,025$).

Um zu untersuchen, ob Antikörper auch auf ein schon gebildetes Gedächtnis einwirken und die Abrufbarkeit oder Performanz des bereits gelernten Verhaltens beeinflussen, wurden übertrainierte Tiere 30 Minuten nach dem zehnten Training mit anti-Ependymin-Antikörpern injiziert und drei Tage später getestet (Abb. 14). Diese Fische wählten durchschnittlich häufiger richtig (14,0 richtige Wahlen) als Fische der anderen drei Gruppen. Sie zeigten aber keine Unterschiede gegenüber nicht injizierten übertrainierten Fischen.

Noch deutlicher wurde der Einfluss der anti-Ependymin-Antikörper auf die Gedächtniskonsolidierung, wenn anstatt der Häufigkeiten richtiger Verhaltensantworten von Fischen der verschiedenen Gruppen, der Prozentsatz der Tiere dargestellt wurde, die im Test das Verhaltenskriterium (= Lernkriterium im ersten Training) von fünf richtigen aus sechs hintereinander folgenden Testrunden erreichten (Abb. 15). Nur vier von 13 Lernern, die mit dem Antikörper gegen das extrazelluläre Matrixprotein Ependymin injiziert worden waren, erfüllten das Kriterium im Test. Dagegen erreichten alle mit dem spezifischen Antikörper injizierten übertrainierten Fische im Test das Verhaltenskriterium. Elf Lerner von insgesamt zwölf der mit dem Präimmunserum injizierten Kontrollgruppe erreichten im Test das Verhaltenskriterium.

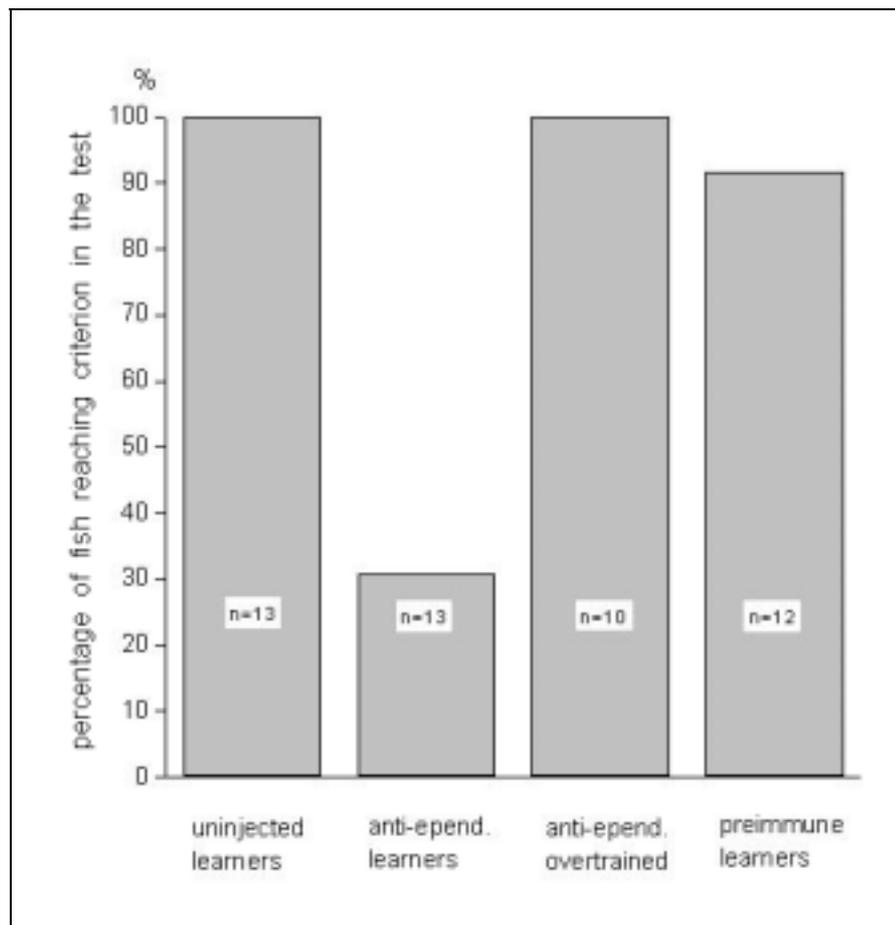


Abb. 15. Prozentsatz der Fische der vier unterschiedlichen Gruppen, die im Test das Verhaltenskriterium erreichten. Von dem mit dem Antikörper gegen das extrazelluläre Matrixprotein Ependymin injizierten Lernern gelang es nur vier Tieren, das Verhaltenskriterium im Test zu erreichen. Dagegen erreichten alle mit demselben Antikörper injizierten übertrainierten Fische das Verhaltenskriterium. Mit Präimmenserum injizierte Lerner erreichten alle bis auf einen im Test das Verhaltenskriterium.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass intracerebrale Injektionen mit einem anti-Ependymin-Antikörper 30 Minuten nach der Verhaltensakquisition zu einer Gedächtnisbeeinträchtigung im Test führen. Das Gedächtnis übertrainierter Fische hingegen wurde nicht durch die Injektionen beeinträchtigt.

3.1.5 Erinnerungsdauer nach Erlernen der Farbunterscheidungsdressur

Um abschätzen zu können, über welchen Zeitraum Goldfische die zuvor erlernte Farbunterscheidungsdressur erinnern können, wurden übertrainierte Tiere, die in den letzten Trainingsdurchläufen keine Fehler machten, im Abstand von je einem Monat (Beginn nach zwei Monaten) getestet, ohne dass sie in der Zwischenzeit trainiert wurden. Abb. 16 zeigt, dass sich ein übertrainierter Fisch noch nach vier Monaten sehr gut an die zuvor erlernte Aufgabe erinnerte und nicht ein einziges Mal falsch wählte. Zwei Fische, die noch nach fünf Monaten getestet wurden, erzielten, bezogen auf 15 Trainingsrunden (s. 2.3.5), 11,3 bzw. 9,5 richtige Antworten. Alle Fische, deren Erinnerungsdauer in diesem Experiment überprüft wurde, erreichten somit im Test das Kriterium.

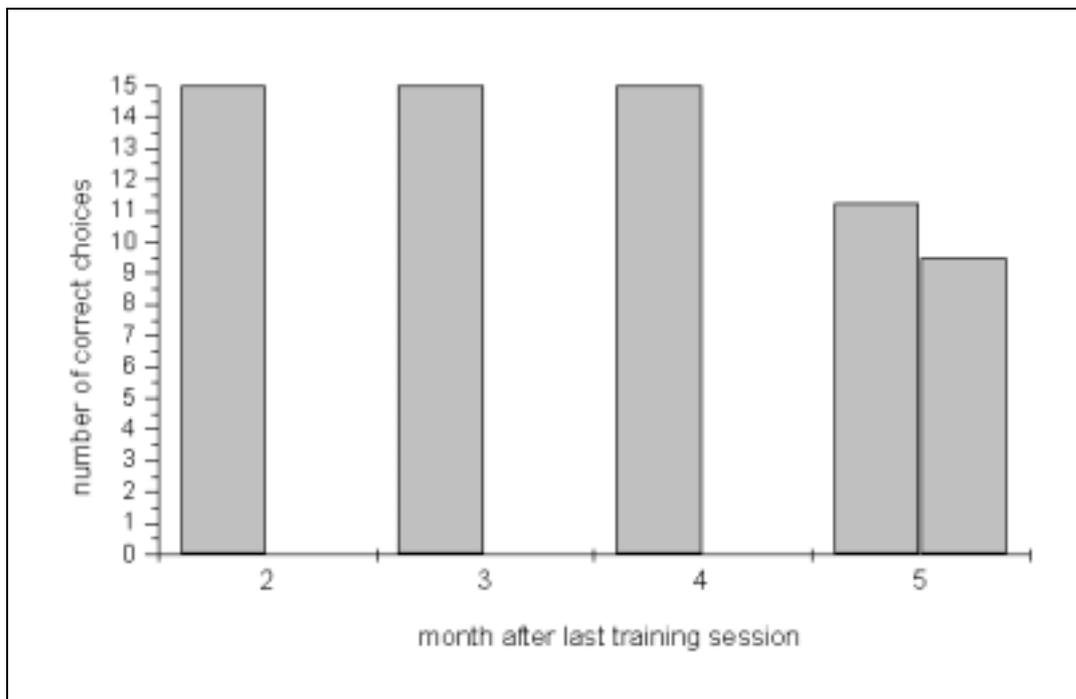


Abb. 16. Dauerhaftigkeit der Erinnerung individueller Goldfische an die zuvor gelernte Aufgabe. Je ein übertrainierter Fisch wurde nach zwei, drei bzw. vier Monaten getestet, ohne zwischenzeitlich das Training absolviert zu haben. Zwei Fische erreichten sogar noch nach fünf Monaten das Verhaltenskriterium.

3.2 Umverteilung des Ependymins nach dem Lernen

Durch den Einsatz des Radioimmunoassays sollte eine mögliche Umverteilung des Ependymins nach dem Erlernen der operanten Farbumterscheidungsdressur festgestellt werden, wobei der Ependymingehalt 5,5 und 9 Stunden nach der Verhaltensakquisition in der ECF und der cytoplasmatischen Fraktion gemessen wurde.

Die Standardkurve (Abb. 17) zeigt, dass bei einem Ependymingehalt von 1 µg pro RIA-Röhrchen Sättigung der Antikörper mit nicht radioaktivem Ependymin erreicht wurde. Der Bereich der größten Kurvensteigung und Messgenauigkeit lag zwischen 0,1 und 0,7 µg Ependymin pro Probenröhrchen. Da die erhaltenen Proben der ECF und der cytoplasmatischen Fraktion unverdünnt bis zu einer 625-fachen Verdünnung eingesetzt wurden, wurden für die Berechnung des enthaltenen Ependymins jene Probenverdünnungen verwendet, deren Ependymingehalt im Bereich der größten Kurvensteigung und damit im Bereich größter Messgenauigkeit lagen. Die erhaltenen Ergebnisse wurden auf die unverdünnten Proben zurückgerechnet und, da im Triplett eingesetzt, gemittelt.

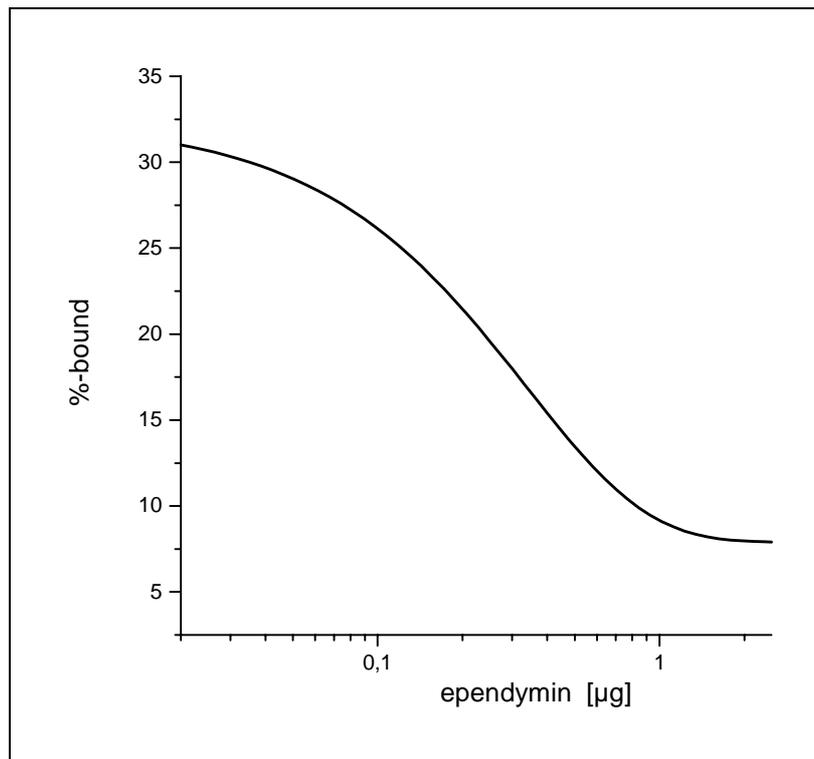


Abb. 17. Standardbindungskurve des eingesetzten RIA. Aufgetragen ist der Prozentsatz an gebundenem [^{125}I]-Ependymin gegen die Menge des Standards in μg . Im Bereich der größten Kurvensteigung liegt die größte Messgenauigkeit.

3.2.1 Ependymingehalt der Extrazellulärflüssigkeit (ECF) 5,5 Stunden nach der Farbunterscheidungsdressur

Der Ependymingehalt der ECF war bei Lernern 5,5 h nach dem Erlernen der Farbunterscheidungsdressur mit durchschnittlich $87 \mu\text{g}/\text{Gehirn}$ höher als bei den Fischen, die die gestellte Aufgabe nicht erfüllt hatten (Nichtlerner: $\emptyset 55 \mu\text{g}/\text{Gehirn}$; Tab. 2 und Abb. 18a). Nur unwesentlich höher als der Ependymingehalt der Nichtlerner erwies sich der ECF-Ependymingehalt übertrainierter Fische ($\emptyset 59 \mu\text{g}/\text{Gehirn}$), deren Gehirn 5,5 Stunden nach dem zehnten Training herauspräpariert worden war. Die als zusätzliche Kontrollgruppe untersuchten naiven Fische, die nicht dressiert worden waren, zeigten mit $72 \mu\text{g}/\text{Gehirn}$ einen Ependymingehalt, der zwischen dem der Lerner und jenem der beiden anderen Gruppen lag. Der bei den Lernern festgestellte erhöhte ECF-Ependymingehalt unterschied sich von dem der übrigen Gruppen aber nicht signifikant.

3.2.2 Ependymingehalt der cytoplasmatischen Fraktion 5,5 Stunden nach der Farbunterscheidungsdressur

5,5 Stunden nach der Verhaltensakquisition in der futterbelohnten Farbunterscheidungsdressur enthielt die cytoplasmatische Fraktion von Nichtlernern mit durchschnittlich 289 $\mu\text{g}/\text{Gehirn}$ nur unbedeutend mehr Ependymin, als die von Lernern und übertrainierten Fischen mit je 284 $\mu\text{g}/\text{Gehirn}$ (Tab. 2 und Abb. 18b). Naive Fische besaßen mit 255 $\mu\text{g}/\text{Gehirn}$ den geringsten Ependymingehalt aller Gruppen. Die Unterschiede im Ependymingehalt waren aber nicht signifikant.

Tab. 2. Ependymingehalte der verschiedenen Versuchsgruppen 5,5 Stunden nach der Verhaltensakquisition in der operanten Farbunterscheidungsdressur. Ependymingehalte sind neben der Menge des Gesamtproteins in $\mu\text{g}/\text{Gehirn}$ angegeben.

5,5 h	Ependymingehalt ($\mu\text{g}/\text{Gehirn}$)		Gesamtprotein ($\mu\text{g}/\text{Gehirn}$)		Ø Hirngewicht (g)
	ECF	cytoplasm. Frakt.	ECF	cytoplasm. Frakt.	
Naiv	72 \pm 11 (n=13)	255 \pm 59 (n=13)	150 \pm 17	1519 \pm 103	0,074 \pm 0,005
Lerner	87 \pm 18 (n=10)	284 \pm 82 (n=10)	135 \pm 20	1840 \pm 140	0,095 \pm 0,005
Nichtlerner	55 \pm 6 (n=6)	289 \pm 58 (n=10)	131 \pm 14	1994 \pm 90	0,087 \pm 0,004
Übertrainiert	59 \pm 16 (n=5)	284 \pm 102 (n=4)	158 \pm 35	2320 \pm 185	0,095 \pm 0,007

3.2.3 Ependymingehalt der Extrazellulärflüssigkeit (ECF) 9 Stunden nach der Farbunterscheidungsdressur

Neun Stunden nach dem Training stieg bei allen Gruppen, die die Farbunterscheidungsdressur absolviert hatten, der Gehalt an Ependymin in der ECF gegenüber den 5,5-stündigen Werten an (Tab. 3 u. Abb. 18a), bei Lernern von 87 auf 136 µg/Gehirn, dem höchsten Wert der drei Gruppen. Der gegenüber den Nichtlernern unwesentlich höhere Wert der übertrainierten Tiere war von 59 auf 106 µg/Gehirn angestiegen, der der Nichtlerner von 55 auf 104 µg/Gehirn. Bei Lernern und Nichtlernern war der Ependymingehalt also um 49 µg/Gehirn, bei übertrainierten Fischen um 47 µg/Gehirn angestiegen, folglich stieg der Ependymingehalt aller drei Gruppen um fast den gleichen Betrag an (Abb. 18a).

Der Ependymingehalt der ECF stieg verhaltensassoziiert nach neun Stunden bei Fischen, die die Farbunterscheidungsdressur neu und erfolgreich absolviert hatten, signifikant gegenüber denjenigen Fischen an, die diese Farbunterscheidungsdressur nicht absolviert hatten (naive Fische) (Abb. 18a; Kolgomorov-Smirnov-Omnibustest; $p < 0,05$). Die Zunahme der Ependymingehalte innerhalb der Gruppen unterschied sich nach neun Stunden aber nicht signifikant von denen, die nach 5,5 Stunden gemessen wurden. Auch die Werte zwischen den Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede, obwohl doch deutlich wird, dass Lerner neun Stunden nach dem Training den höchsten Ependymingehalt in der ECF besaßen.

3.2.4 Ependymingehalt der cytoplasmatischen Fraktion 9 Stunden nach der Farbunterscheidungsdressur

Anders als für die ECF sah das Bild für die Ependymingehalte der cytoplasmatischen Fraktion aus. Hier hatten mit 191 µg/Gehirn Lerner den geringsten absoluten cytoplasmatischen Gehalt der drei Gruppen, gefolgt von Nichtlernern mit 215 µg/Gehirn (Abb. 18b). Die cytoplasmatische Fraktion übertrainierter Tiere enthielt mit 258 µg/Gehirn den höchsten absoluten Ependymingehalt, vergleichbar dem Gehalt untrainierter naiver Fische. Auffallend an den Werten war, dass bei allen drei Gruppen der cytoplasmatische Ependymingehalt gegenüber der jeweiligen 5,5 Stunden Gruppe abgenommen hatte, wobei

die Abnahme bei übertrainierten Fischen mit 26 μg am geringsten, bei Lernern mit 93 μg am höchsten war (vgl. Tab. 2 u. 3).

Tab. 3. Ependymingehalte der verschiedenen Versuchsgruppen neun Stunden nach der Verhaltensakquisition in der operanten Farbunterscheidungsdressur. Ependymingehalte sind neben der Menge des Gesamtproteins in $\mu\text{g}/\text{Gehirn}$ angegeben.

9 h	Ependymingehalt ($\mu\text{g}/\text{Gehirn}$)		Gesamtprotein ($\mu\text{g}/\text{Gehirn}$)		\emptyset Hirngewicht (g)
	ECF	cytoplasm. Frakt.	ECF	cytoplasm. Frakt.	
Naiv	72 \pm 11 (n=13)	255 \pm 59 (n=13)	150 \pm 17	1519 \pm 103	0,074 \pm 0,005
Lerner	136 \pm 23 (n=7)	191 \pm 30 (n=7)	197 \pm 18	1569 \pm 219	0,068 \pm 0,005
Nichtlerner	104 \pm 15 (n=7)	215 \pm 48 (n=7)	172 \pm 17	1314 \pm 68	0,067 \pm 0,006
Übertrainiert	106 \pm 20 (n=5)	258 \pm 31 (n=5)	161 \pm 25	1178 \pm 91	0,068 \pm 0,007

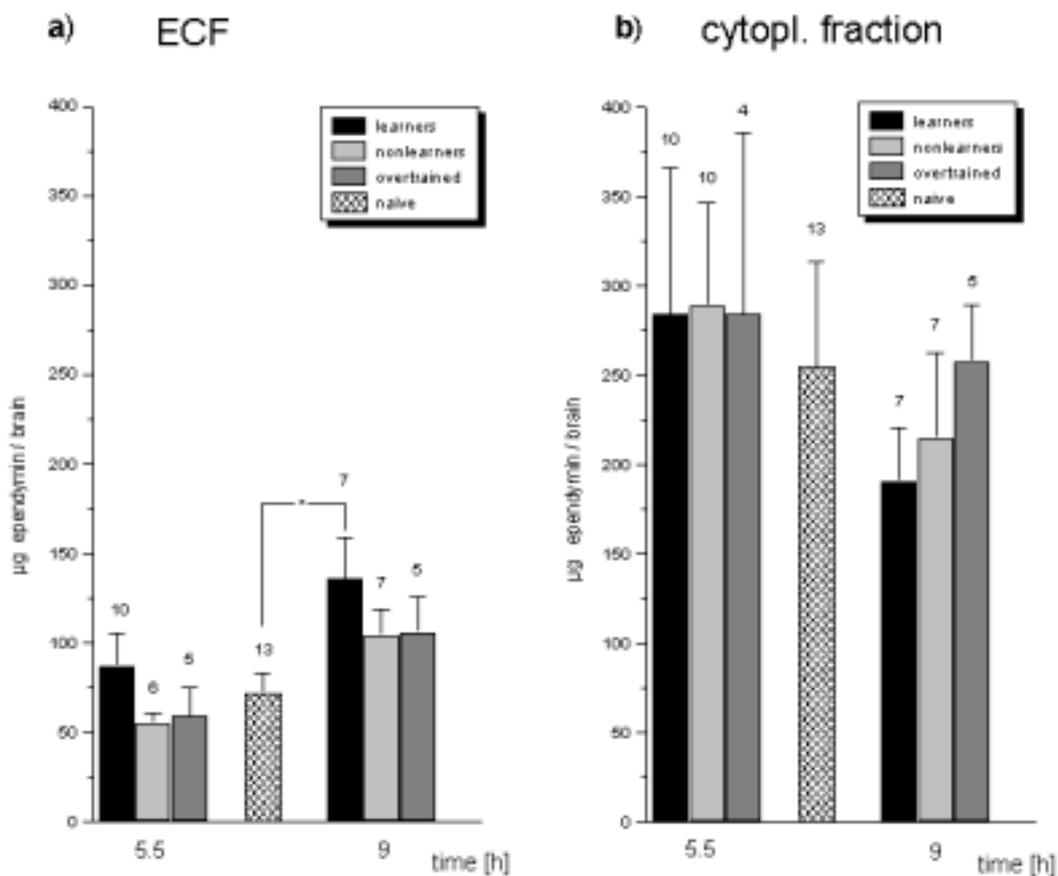


Abb. 18. Vergleich der Ependymingehalte der ECF (a) und cytoplasmatischen Fraktion (b) der verschiedenen Versuchsgruppen 5,5 und neun Stunden nach der Verhaltensakquisition in der Farbumterscheidungsdressur. Der Unterschied zwischen dem ECF-Ependymingehalt von Lernern zu dem der naiven Tiere war signifikant (Kolmogorov-Smirnov-Omnibustest; $p < 0,05$).

3.2.5 Kälteeinfluss auf den Ependymingehalt

Zusätzlich zur Untersuchung einer lerninduzierten Umverteilung oder Synthese des Ependymins sollte untersucht werden, ob in diesem anfänglichen Experiment der Ependymingehalt durch Kälte beeinflussbar ist.

Die Goldfische der unterschiedlich behandelten Gruppen wiesen aber im Ependymingehalt der ECF und der cytoplasmatischen Fraktion untereinander und gegenüber den Kontrolltieren keine signifikanten Unterschiede auf. Mit einer Gruppengröße von je drei Tieren war die Stichprobe zweifellos auch sehr klein.

3.3 Stoffwechselaktivität des Gehirnes während der Farbunterscheidungsdressur

Untersuchungen zur Stoffwechselaktivität mit $[^{14}\text{C}]$ -2-Desoxyglukose-Messungen sollten über eine Beteiligung unterschiedlicher Hirngebiete am Erlernen der belohnten operanten Farbunterscheidungsdressur Auskunft geben.

Abb. 19 vermittelt anhand eines repräsentativen Parasagittalschnittes einen Gesamtüberblick über die metabolische Gehirnaktivität von Zellen eines Goldfischgehirns während des Lernens der futterbelohnten Farbunterscheidungsdressur.

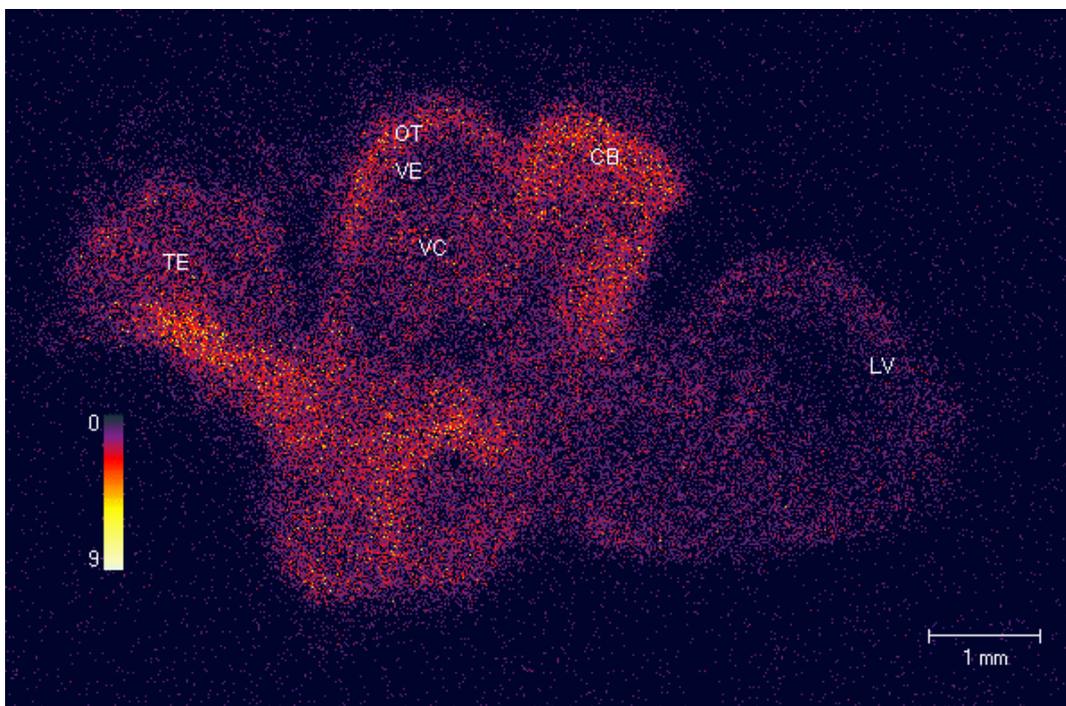


Abb. 19. Sagittalschnitt durch das Gehirn eines Goldfisches, der die Farbunterscheidungsdressur erlernt hatte. Muster der $[^{14}\text{C}]$ -2-Desoxyglukose-6-phosphatbildung in einem farbkodierten autoradiographischen Bild. Die Farbskala links gibt in relativen Einheiten die Quantität der $[^{14}\text{C}]$ -2-Desoxyglukose-6-phosphatbildung in neuronalen und glialen Zellen wieder. Die gemessene Radioaktivität nimmt von Blau über Rot bis Weiß zu. CB = Corpus cerebelli; LV = Lobus vagi; OT = Tectum opticum; TE = Telencephalon; VC = Valvula cerebelli; VE = tectaler Ventrikel.

Eine erhöhte metabolische Gehirnaktivität gegenüber den anderen Hirngebieten zeigten der ventrale Teil des Telencephalon, das Tectum opticum, das Corpus cerebelli und der Sehnerv.

Abb. 20 zeigt beispielhaft die lokale cerebrale [^{14}C]-2-Desoxyglukose-6-phosphatbildung anhand eines Frontalschnittes des als Referenzstruktur verwendeten Telencephalon. Hier ließ sich nach dem Erlernen der operanten Farbunterscheidungsdressur ein gegenüber den umgebenen telencephalen Hirnarealen erhöhter Glukosemetabolismus im parvozellulären präoptischen Nucleus registrieren.

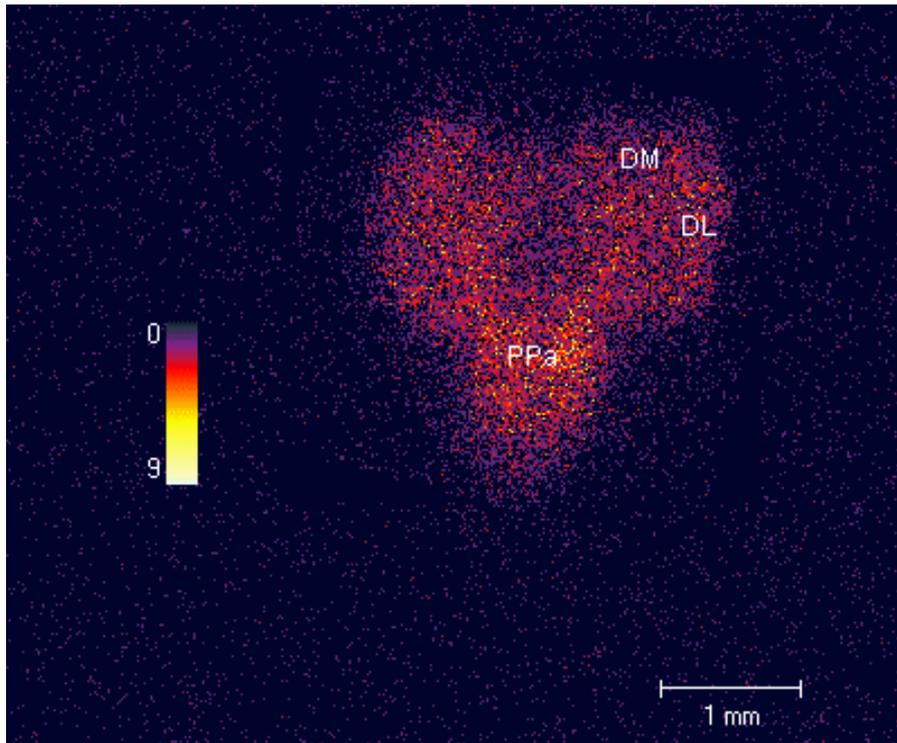


Abb. 20. Frontalschnitt durch das Telencephalon eines Goldfisches, der die Farbunterscheidungsdressur erlernt hatte. DL = dorso-lateraler Teil des Telencephalon; DM = dorso-medialer Teil des Telencephalon; PPA = parvozellulärer präoptischer Nucleus; sonst wie Abb. 19.

Abb. 21 stellt die lokale cerebrale [^{14}C]-2-Desoxyglukose-6-phosphatbildung im Mesencephalon eines Lerners dar. Nach dem Erlernen der operanten Farbunterscheidungsdressur ließ sich in diesem Schnitt gegenüber anderen Arealen ein leicht erhöhter Glukosemetabolismus in Teilen des Tectum opticum, im Torus semicircularis und im Tegmentum (Begriff hier für das ventrale Mesencephalon verwendet) ausmachen.

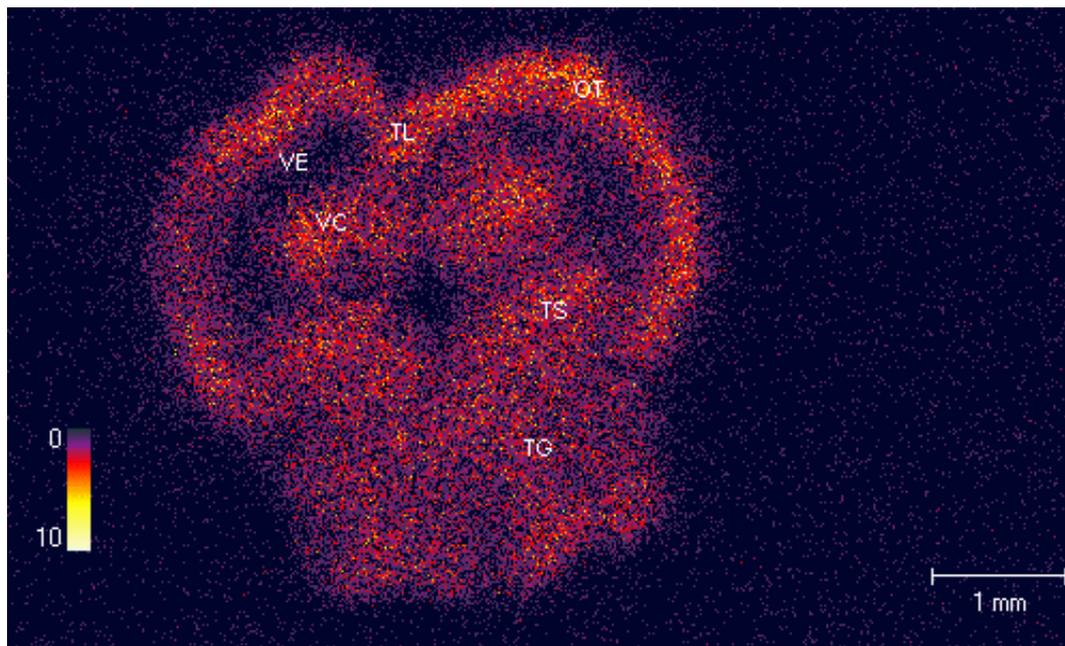


Abb. 21. Frontalschnitt durch das Mesencephalon eines Goldfisches, der die Farbunterscheidungsdressur erlernt hatte. Da dieser Schnitt eine höhere Gesamtaktivität aufweist, hat der höchste Wert der relativen Skala den Wert 10, verglichen mit den Skalen der Abb. 19, Abb. 20 und Abb. 22, die jeweils den höchsten relativen Wert 9 besitzen. Der jeweils höchste Wert pro Abbildung erhält aber vom Programm automatisch die gleiche Farbe zugeteilt. TG = Tegmentum; TL = Torus longitudinalis; TS = Torus semicircularis; OT = Tectum opticum; VC = Valvula cerebelli; VE = tectaler Ventrikel sonst wie Abb. 19.

Abb. 22 gibt beispielhaft den Glukosemetabolismus im Metencephalon eines Lerners wieder. Auffällig an diesem Schnitt war die größere Menge an Radioaktivität im Corpus cerebelli gegenüber benachbarten Arealen.

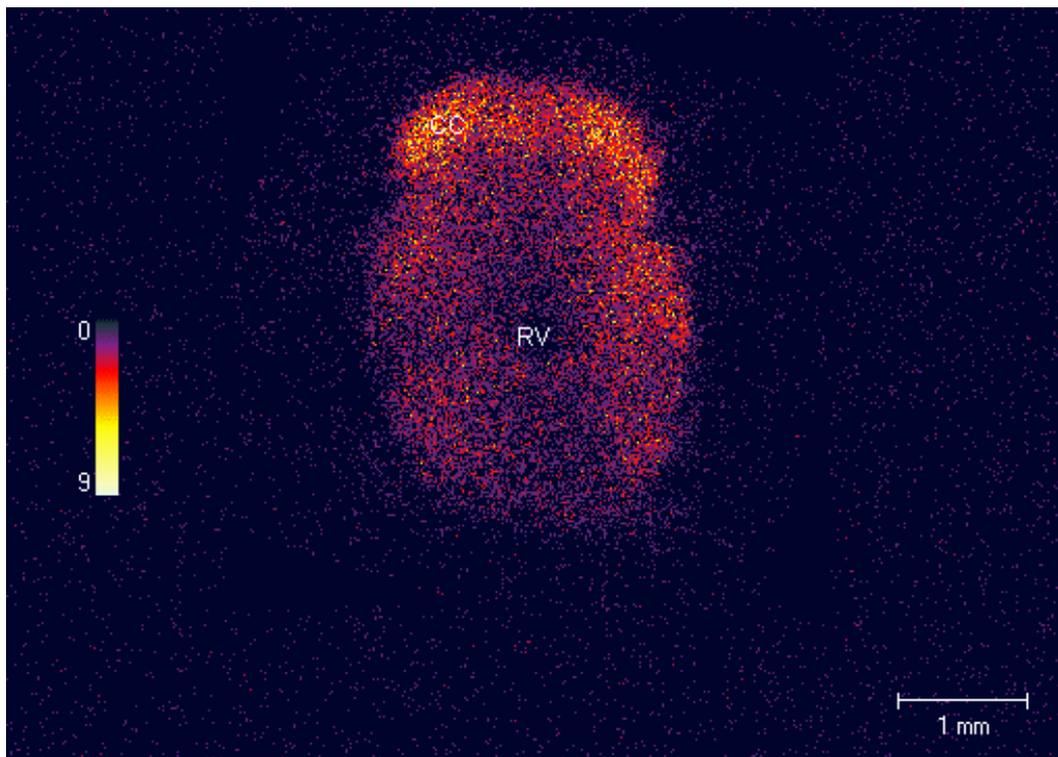


Abb. 22. Frontalschnitt durch das Metencephalon eines Goldfisches, der die Farbungerscheidungsdressur erlernt hatte. CC= Corpus cerebelli; RV= rhombencephaler Ventrikel; sonst wie Abb. 19.

Zuletzt sei der Glukosemetabolismus anhand der lokalen cerebralen [^{14}C]-2-Desoxyglukose-6-phosphatbildung in cerebralen gustatorischen Gebieten des Myelencephalon dargestellt (Abb. 23). Bei einem Goldfisch, der die operante Farbungerscheidungsdressur erfolgreich absolviert hatte, zeigte sich ein geringfügig erhöhter Glukosemetabolismus im Lobus vagi verglichen mit dem Lobus facialis (s. auch Abb. 24).

Die beschriebenen autoradiographischen Abbildungen können hier natürlich nur exemplarisch bleiben. Die Gesamtauswertung wird weiter unten erläutert.

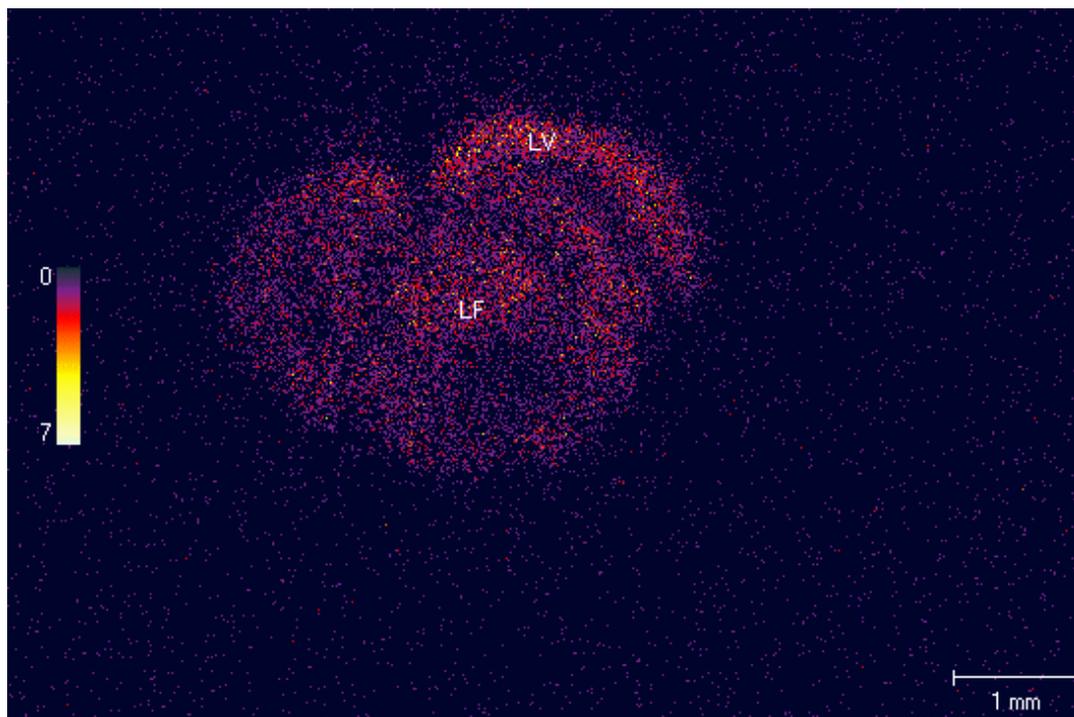


Abb. 23. Frontalschnitt durch das Myelencephalon eines Goldfisches, der die Farbunterscheidungsdressur erlernt hatte. Da dieser Schnitt eine geringere Gesamtaktivität aufweist, hat der höchste Wert der relativen Skala den Wert 7, wird aber automatisch als höchster Wert des Schnittes mit gleicher Farbe wie die Skalen der anderen Schnitte belegt (s. dazu auch Abb. 21). LF = Lobus facialis; LV = Lobus vagi; sonst wie Abb. 19.

Micro-Imagerbilder von Frontalschnitten der Medulla zeigten, dass in dieser Region kaum [^{14}C]-2-Desoxyglukose aufgenommen bzw. [^{14}C]-2-Desoxyglukose-6-phosphat abgelagert worden war. Die Aktivität dieser Struktur hob sich kaum von der Hintergrundstrahlung der Objektträger ab. Deshalb wurden Schnitte der Medulla nicht weiter verwendet. Auch die Schnitte des Bulbus olfactorius wurden nicht weiter verwendet, da sie oft während der Präparation Schaden nahmen und auch wie im Fall der Medulla wenig Aktivität zeigten.

Um die relative Zunahme der Glukoseaufnahme von Hirnstrukturen zu berechnen, sollte auf die von Tier zu Tier unterschiedliche Gesamtaufnahme von [^{14}C]-2-Desoxyglukose normiert werden, die unter anderem auf Unterschieden in der Stoffwechselaktivität zurückzuführen ist sowie auf Abweichungen, die bei den Injektionen des Tracers auftreten. Hierzu wurde, wie schon bei einer Studie an Zebrafischen das Telencephalon als Referenzstruktur verwendet (vgl. PRADEL, 1998; PRADEL et al., 2000). Die durchschnittliche Markierung

(cpm/100 μm^2) aller Telencephalonschnitte wurde vermessen und auf den Wert eins normiert. Die gemessenen Schnittflächen der anderen Hirngebiete desselben Fisches wurden dann auf diesen Wert bezogen, so dass man einen relativen Dichtewert erhielt. So konnten Hirnschnitte unterschiedlicher Fische und auch die Schnitte verschieden behandelter Tiere miteinander verglichen werden (Abb. 24). Allerdings erhielten so alle Telencephala den relativen Wert eins zugeordnet. Um eventuell vorhandene Unterschiede im Stoffwechsel des Telencephalon der verschiedenen Gruppen feststellen zu können, wurde deshalb die relative Markierung/Flächeneinheit des Telencephalon wieder berücksichtigt, indem die mittlere Impulszahl aller Telencephalon-Anschnitte der jeweiligen Gruppe (Lerner, Nichtlerner und naiv) durch die mittlere Impulszahl der Telencephalon-Anschnitte aller Gruppen geteilt wurde, wobei folgende Formel Verwendung fand (Beispiel Lerner):

$$\frac{\frac{\sum_{i=1}^8 \text{Tel}_{(\text{Lerner})}}{8}}{\frac{\sum_{i=1}^{22} \text{Tel}_{(\text{gesamt})}}{22}} = \frac{\text{[mittlere Impulszahl der Telencephalonanschnitte der Lerner]}}{\text{[mittlere Impulszahl aller Telencephalonanschnitte]}}$$

Abb. 24 zeigt den relativen Dichtewert pro 100 μm^2 Schnittfläche der verschiedenen Hirngebiete der drei Gruppen. Die [^{14}C]-2-Desoxyglukose-6-phosphatbildung von Lernern war im Telencephalon und im Tectum opticum größer als die der Nichtlerner und naiven Goldfische, das heißt diese Hirngebiete waren bei Lernern aktiver. Im Tectum der Lerner war die Aktivität signifikant größer ($p < 0,05$; Kolgomorov-Smirnov-Omnibustest) als bei Nichtlernern. Im Tegmentum (s. Abb. 21) war die Impulszahl nur unwesentlich größer als bei Nichtlernern. Hier hatten naive Tiere die höchsten Werte. Nichtlerner besaßen im Cerebellum (Corpus cerebelli) höhere Werte als Lerner, wobei hier, wie auch bei den folgenden Strukturen, die naiven Tiere die höchste Stoffwechselaktivität zeigten. In den Hirngebieten, die für die gustatorische Informationsverarbeitung und Integration zuständig

sind (FINGER, 1983; KOTRSCHAL et al., 1991; WULLIMANN et al., 1996), war die Impulszahl von Lernern höher als die der Nichtlerner, wobei die Unterschiede in den Stoffwechselaktivitäten des Lobus vagi größer waren als die des Lobus facialis. Außer den Unterschieden zwischen Lernern und Nichtlernern im Tectum opticum waren aber alle anderen Unterschiede nicht signifikant. In den anderen Hirngebieten war die Aktivität bei naiven Tieren am höchsten.

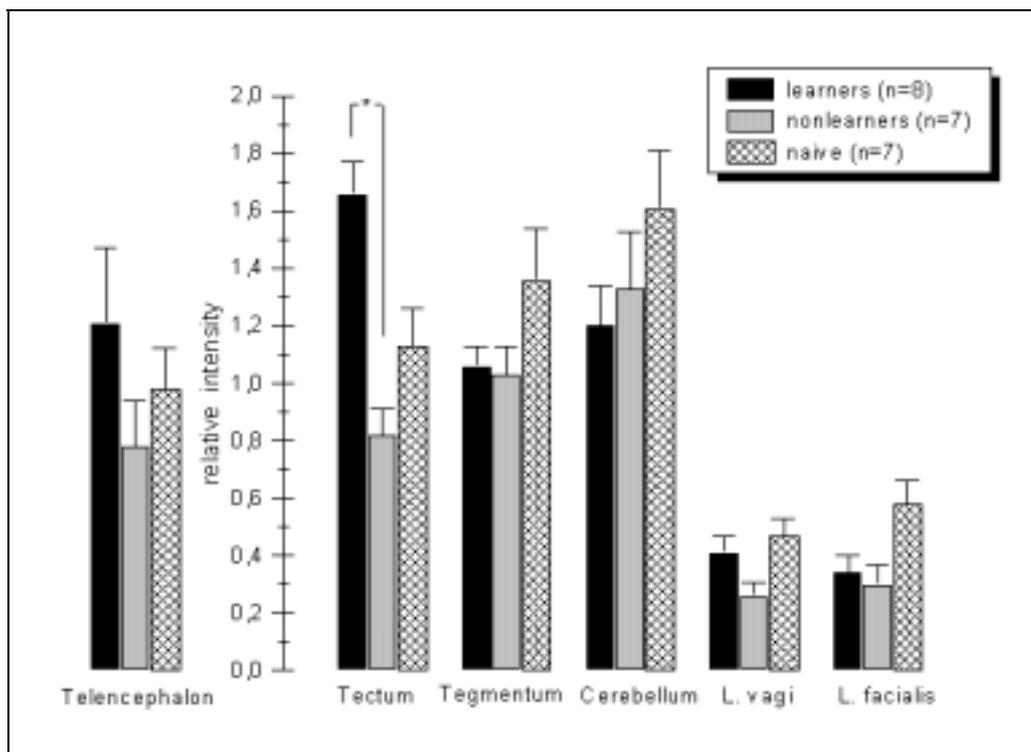


Abb. 24. Relative Impulszahlen pro 100 μm^2 Schnittfläche von Frontalschnitten verschiedener Hirngebiete von Lernern, Nichtlernern und naiven Tieren, deren [^{14}C]-2-Desoxyglucose-6-phosphatbildung in cerebralen Zellen nach der Farbunterscheidungsdressur gemessen wurde. In den visuellen Hirngebieten (Telencephalon, Tectum) war die Aktivität bei Lernern höher als bei Nichtlernern und naiven Tieren, im Tectum gegenüber Nichtlernern signifikant (Kolgomorov-Smirnov-Omnibustest; $p < 0,05$). L. vagi = Lobus vagi; L. facialis = Lobus facialis.

4. Diskussion

In den Versuchen zur Beteiligung cerebraler Strukturen am Erlernen der Farbunterscheidungsdressur zeigte sich, dass Goldfische, die erfolgreich die Farbunterscheidungsdressur erlernt hatten, im Tectum opticum einen signifikant erhöhten Energiemetabolismus besaßen. Auch das Telencephalon von Goldfischen scheint beim erfolgreichen Lernen der Farbunterscheidungsdressur eine Rolle zu spielen, obwohl der gegenüber Nichtlernern und naiven Fischen höhere Zuckerverbrauch keine Signifikanz aufwies. Da sowohl das Tectum opticum als auch das Telencephalon neuronale Strukturen darstellen, die in großem Ausmaß an der Verarbeitung visueller Information beteiligt sind, wird im folgenden zuerst die Neuroanatomie des visuellen Systems der Teleostier vorgestellt. Einige neuronale Strukturen, die an der Verarbeitung visueller Information beteiligt sind, sind gleichfalls an der Gedächtnisbildung beteiligt.

4.1 Das visuelle System der Teleostier

Die Verarbeitung der visuellen Information geschieht in verschiedenen Abschnitten und Kerngebieten des Fischgehirns (SCHELLART, 1990). Vor allem das Diencephalon und das Mesencephalon enthalten eine große Anzahl Nuclei, die an der visuellen Verarbeitung beteiligt sind.

Das Tectum opticum (Tectum mesencephali) ist die bei weitem wichtigste visuelle Struktur bei allen Craniaten mit Ausnahme der Säuger (ROTH & WULLIMANN, 1996). Das Tectum verarbeitet mehrere Sinnesmodalitäten, von denen aber der Verarbeitung der visuellen Information die bedeutendste Rolle zufällt (SCHELLART, 1990).

Das Tectum opticum ist das paarige Dach des Mittelhirns und liegt zwischen dem Telencephalon und dem Cerebellum. Unterhalb des Tectum liegt das Tegmentum. Die meisten Efferenzen verlassen das Tectum über die tegmentale-tectale Kontaktzone und Afferenzen gelangen darüber in das Tectum hinein. Die beiden Tectumhälften werden durch die tectale Kommissur verbunden. Ventral der tectalen Kommissur liegt medial der Torus longitudinalis, eine paarige Struktur längswärts ausgerichteter Körnerzellen. Diese Struktur ist nur bei Actinopterygiern ausgebildet (VANEGAS et al., 1984). Nach der

Durchführung von extrazellulären Mehrfach-Ableitungen aus dem Torus longitudinalis und dem Tectum opticum postulierten GIBBS und NORTHMORE (1998), dass der Torus longitudinalis vor allem ein Helligkeit verarbeitendes System sei, welches auf die Menge der Lichtquanten reagiere, im Gegensatz zum Tectum opticum, das eingehende visuelle Information wellenlängenabhängig verarbeite und somit für die Verarbeitung von Farbinformation verantwortlich sei. Im Ventrikel des Mittelhirnes, unterhalb des Tectum opticum liegt eine Ausstülpung des Cerebellum, die Valvula cerebelli.

Das Tectum opticum ist die komplexeste Struktur im Teleostier-Gehirn (WULLIMANN et al., 1996) und besteht aus sieben gut zu erkennenden Schichten (Abb. 25). In der Reihenfolge von außen nach innen beginnend mit dem **Stratum marginale** (SM, Schicht 7), welches unmyelinisierte Axone enthält, die in den Zellen des Torus longitudinalis entspringen. Diese Axone projizieren auf die dendritischen Dornen der pyramidalen Typ I Neurone des Stratum fibrosum et griseum superficiale (Schicht 5) (MEEK, 1981a). Das Stratum marginale ist ein integratives Neuropil, in dem das Sehsystem über das Cerebellum einen Eingang vom Seitenliniensystem erhält (KOTRSCHAL et al., 1991).

Dem Stratum marginale folgt das **Stratum opticum** (SO, Schicht 6), in dem die meisten Neuriten stark myelinisierte Axone retinalen Ursprunges sind. Diese endigen in Schicht 5, dem Stratum griseum et superficiale (SFGS). Vereinzelt Zellkörper im Stratum opticum gehören zu Typ III Interneuronen (MEEK, 1990). Das **Stratum fibrosum et griseum superficiale** (SFGS, Schicht 5) ist die komplexeste tectale Zellschicht, in der die meisten optischen Fasern endigen. Auffällig in dieser Schicht sind die Zellkörper der Typ I Neurone, deren apikale Dendriten von retino-tectalen Afferenzen kontaktiert werden. Unterhalb des SFGS liegt das **Stratum griseum centrale** (SGC, Schicht 4). Das daran anschließende **Stratum album centrale** (SAC, Schicht 3) enthält vorwiegend myelinisierte tectale Afferenzen aus dem kontralateralen Tectum und der kontralateralen Retina (EBBESSON & VANEGAS, 1976; VANEGAS & EBBESSON, 1976; MEEK, 1990). Schicht 2, das **Stratum periventriculare** (SPV) enthält hauptsächlich kleine dichtgepackte Neurone und die Zellkörper der Typ XIV- und Typ XV Neurone (MEEK, 1990). Radiär verlaufende Apikaldendriten der Cholin-Acetyltransferase positiven Typ XIV Neurone (TUMOSA et al., 1986; KAGEYAMA & MEYER, 1987), können bis in das Stratum opticum verlaufen und stehen in Kontakt mit Neuronen der anderen Schichten (WULLIMANN, 1998). An das Stratum periventriculare schließt die ependymale Region (**Stratum ependymale**, SE, Schicht 1) an. Der Ventrikel des Teleostier-Gehirns wird zum Tectum opticum hin von einer

mehrschichtigen Zellschicht, den ependymalen Gliazellen, umgeben, die die Hohlräume des ZNS auskleiden. Neben den ependymalen Zellen enthält diese Schicht als weitere Zellpopulation die Radiärglia und die Kontaktliquorneurone (VIGH-TEICHMANN & VIGH, 1983; VIGH et al., 1983).

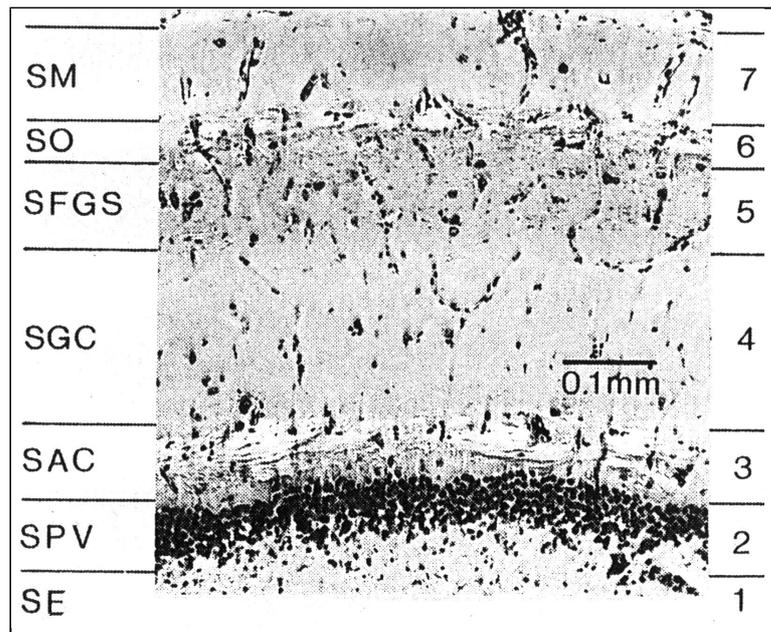


Abb. 25. Querschnitt durch das Tectum opticum des Goldfisches. Hämatoxylin-Eosin gefärbter Schnitt der die Schichten (1-7) zeigt. SM = Stratum marginale; SO = Stratum opticum; SFGS = Stratum fibrosum et griseum superficiale; SGC = Stratum griseum centrale; SAC = Stratum album centrale; SPV = Stratum periventriculare; SE = Stratum ependymale. Darstellung verändert nach MEEK (1990).

Der Weg der retinalen Ganglienzellaxone lässt sich vereinfacht folgendermaßen darstellen: Die Axone der retinalen Ganglienzellen verlassen über den optischen Nerv die Retina und erreichen das Gehirn über das optische Chiasma. Von hier ziehen die meisten Fasern in das kontralaterale Tectum opticum, in das sie topographisch projizieren. Axone der nasalen Retina gehen in das caudale Tectum, Axone der temporalen Retina ziehen in das nasale Tectum (SPERRY, 1963; SHARMA, 1972; MEEK, 1990). Nur eine prozentual geringfügige ipsilaterale Projektion ist bei vielen Teleostiern beschrieben (VANEGAS & ITO, 1983; MEEK 1983). Innerhalb des Tectum opticum durchziehen die meisten Fasern das Stratum opticum (Schicht 6) und endigen im Stratum fibrosum et griseum superficiale (SFGS, Schicht 5). Hier bilden die retinalen Fasern die retinotopen oder visuotopen Felder (JACOBSEN & GAZE, 1964; MEEK, 1983). Zusätzliche Projektionen bestehen zum superficialen Teil des Stratum

opticum, zur mittleren Region des Stratum griseum centrale und zum Stratum album centrale.

Die Anzahl der optischen Fasern, die zum Tectum projizieren, wurde für den Goldfisch mit ungefähr 200.000 beziffert (MURRAY, 1982). Diese bilden im SFGS große synaptische Endigungen mit großen, runden synaptischen Vesikeln. Vieles deutet darauf hin, dass die retino-tectale Transmission hauptsächlich nikotinisch-cholinerg ist (SCHMIDT & FREEMAN, 1980), eine Reihe von Studien zeigen Acetylcholin vorwiegend als intrinsischen tectalen Transmitter (ZOTTOLI et al., 1987; RODRIGUEZ-MOLDES et al., 2002).

Als bedeutende visuelle Struktur ist das Tectum verantwortlich für die Generierung von Orientierungsbewegungen zu neuen sensorischen Stimuli hin (HERRERO et al., 1998). Es kann orientierte Augenbewegungen hervorrufen (SALAS et al., 1997; HERRERO et al., 1998; TORRES et al., 2002).

Die nach dem Tectum opticum wichtigste, visuelle Reize verarbeitende Struktur ist der tegmentale unter dem Tectum opticum liegende Torus semicircularis (TS), der dem Colliculus inferior der Säuger homolog ist (SCHELLART, 1990; KÄLMÄN, 1998). Der TS ist ein multisensorisches Gehirnzentrum und erhält Input vom auditorischen- und vom Seitenliniensystem (PLACHTA et al., 1999) und ferner, bei Teleostiern, vom elektrosensitiven System.

Neben den oben erwähnten mesencephalen Teilen des Fischgehirns erhalten vor allem diencephale Teile direkten retinalen als auch indirekten visuellen Input. Das diencephale visuelle System besteht aus den Kernen der präoptischen Region und des Hypothalamus, Kernen im dorsalen und ventralen Thalamus und im Prätectum (SCHELLART, 1990). Beim Goldfisch antworten z. B. Neurone im dorsalen Thalamus und im Hypothalamus auf visuelle Stimuli (KIRSCH et al., 2002). Weiterhin weisen Neurone im Prätectum der Teleostier eine Richtungsspezifität für visuelle Stimuli auf (KLAR & HOFFMANN, 2002). Eine vollständige retinotopie Projektion beim Goldfisch besitzt der parvozelluläre Nucleus prepectalis superficialis (SPRINGER & MEDNICK, 1985).

Auch das Telencephalon erhält visuellen Input. Schon bei den phylogenetisch ursprünglichen Elasmobranchiern (Chondrichthyes) lassen sich Repräsentationen visueller Modalitäten im Telencephalon erkennen (COHEN et al., 1973). Bei Teleostiern erhält die

dorsale Region des Telencephalon visuellen Input von den oben erwähnten diencephalen Teilen des visuellen Systems (SCHELLART, 1990; YAMANE et al., 1996). So projiziert der retinorecipiente Nucleus anterior des dorsalen Thalamus auf die Area dorsalis lateralis (CORREA et al., 1998). Umgekehrt projizieren Neurone der Area dorsalis lateralis zu hypothalamischen Kernen und übertragen visuelle Information (SHIMIZU et al., 1999). Unterhalb der pallialen Zone der Area dorsalis konnten PRECHTL und Mitarbeiter durch Gabe eines visuellen Stimulus, dem Zeigen eines 100 msec dauernden roten Lichtreizes mittels einer Leuchtdiode, elektrische Potentiale beim Elefanten-Rüsselfisch *Gnathonemus petersii* ableiten (PRECHTL et al., 1998). Dieser Fisch ist schwach elektrisch und besitzt ein reduziertes visuelles System. SAIDEL und Mitarbeiter leiteten extrazellulär die Antworten von Neuronen der lateralen Zone der Area dorsalis beim Goldfisch ab, währenddessen sie verschiedene visuelle Stimuli gaben (SAIDEL et al., 2001). Sie fanden nach ein- und aussetzender Beleuchtung ON und OFF-antwortende Neurone und solche, die stroboskopische Reize phasisch beantworteten.

Direkten retinalen Input in das Telencephalon bei dem Stör *Acipenser transmontanus*, einem Actinopterygier, der nicht zu den Teleostiern zählt, konnten ITO und Mitarbeiter nachweisen (ITO et al., 1999). Dieser Trakt über den Thalamus direkt zum Telencephalon entspricht dem geniculaten System der anderen Vertebraten, während der Weg von der Retina zum optischen Tectum dem extrageniculaten System anderer Vertebraten entspricht (ALBERT et al. 1999; YAMAMOTO et al. 1999).

Zur Übersicht der verschiedenen Verbindungen des visuellen Systems der Teleostier siehe Abb. 26.

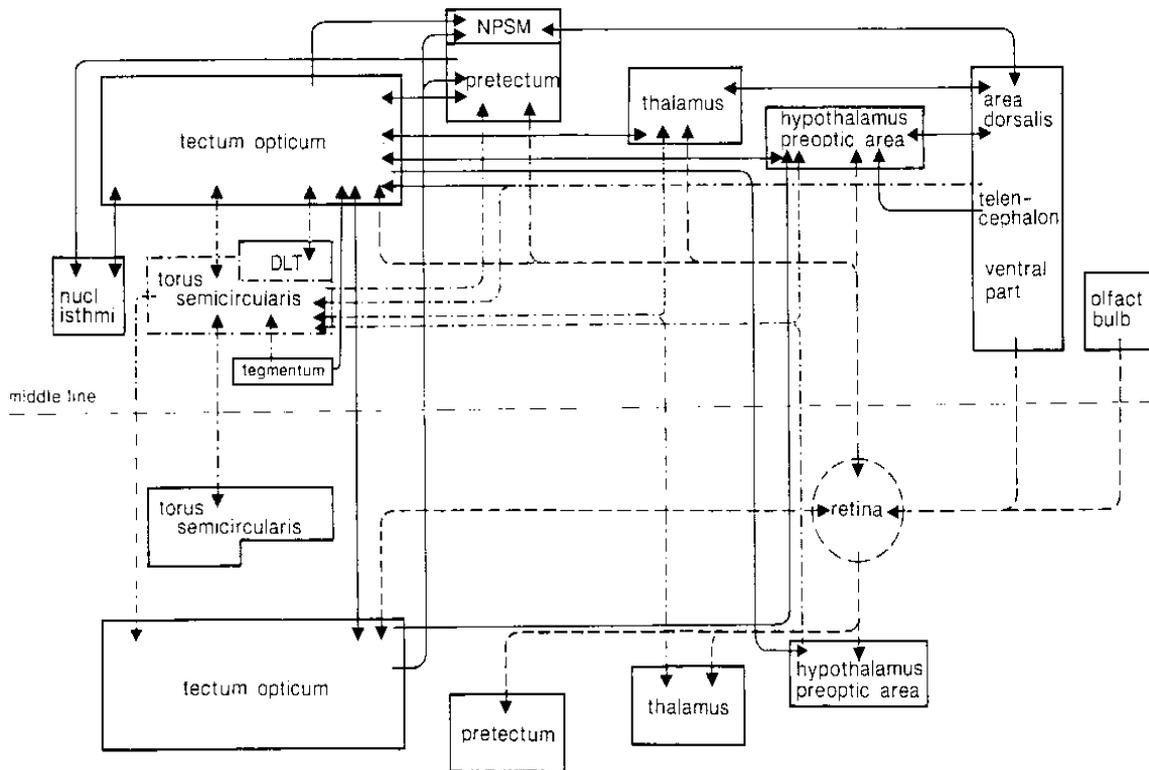


Abb. 26. Schematische Aufsicht auf die Hauptverschaltungen des visuellen Systems der Teleostier. Zur Vereinfachung ist das Diencephalon nur in seine drei Hauptteile unterteilt dargestellt: Hypothalamus/präoptische Region; Thalamus und Pretectum. Die Richtung jeder Verbindung ist durch einen Pfeilkopf dargestellt. Die Wege zur Retina hin und von ihr weg sind gestrichelt dargestellt, gestrichelt und punktiert die Verbindungen des Torus semicircularis. Die Verbindungen der Kerngebiete der rechten Hemisphäre untereinander sind der Übersicht halber ausgelassen. DLT = Nucleus dorsolateralis tegmenti; NPSM = Nucleus preectalis superficialis magnocellularis (aus: SCHELLART, 1990).

4.2 Beteiligung cerebraler Strukturen am Erlernen der futterbelohnten

Farbunterscheidungsdressur

Mit Hilfe der [^{14}C]-2-Desoxyglukosemethode für den Glukosemetabolismus (SOKOLOFF et al., 1977) lassen sich verlässliche Aussagen über die Aktivität beteiligter Hirnregionen machen, wobei vor allem der lokale Energiemetabolismus, der für die Natrium/Kaliumpumpe benötigt wird, erkannt wird. Hierbei wurde eine gute Korrelation zwischen elektrischer und metabolischer Aktivität nachgewiesen (Zusammenfassung bei GLAGOW & EWERT, 1999). Die Limitierungen der [^{14}C]-2-Desoxyglukosemethode liegen in der zeitlichen Dimension, da nur kumulative Veränderungen während der Dressur gemessen werden können.

Goldfische, die innerhalb von 45 Minuten das Lernkriterium in der operanten Farbdressur erreicht hatten, zeigten im **Telencephalon** einen etwas höheren Glukosemetabolismus als Nichtlerner und naive Tiere (Abb. 24). Dies mag zuallererst auf die Funktionen des Telencephalons im visuellen System zurückzuführen sein (s. 4.1). Das Telencephalon spielt aber auch eine wichtige Rolle bei der Bildung eines Kurzzeitgedächtnisses und ist wichtig für die Integration neuronaler Erregungen aus extratelencephalen Arealen (ONISHI, 1997). In der Wechselkammer (aktive Meidedressur) zeigten telencephalektomierte Goldfische eine schnellere Extinktion des Gedächtnisses (SAVAGE, 1968). In einer Fardressur zeigten sie signifikant eingeschränkte Lernfähigkeiten (ONISHI, 1989) und Defizite im Umkehrlernen einer räumlichen Aufgabe (LOPEZ et al., 2000 a). Bei Durchführung einer vierarmigen Labyrinthaufgabe, mit der unterschiedliche Lösungsstrategien, die ein Fisch einschlagen kann, erkannt werden können, lösten Fische ohne Telencephalon die gestellte Aufgabe schneller, und zwar durch direkte Mustererkennung, sogenanntes "cued-learning", bei dem der Fisch ein Signal mit dem räumlich in nächster Nähe vorhandenen Verstärker assoziiert (LOPEZ et al., 2000 b). Fische im Besitz des Telencephalon benutzten nicht nur diese Strategie direkter Mustererkennung, sondern erlernten zusätzlich eine räumliche Karte (SALAS et al. 1996). Sie zeigten im Telencephalon eine lern-induzierte Zunahme von Proteinen, die mit dem Nucleolusorganisator assoziiert sind, ein direkter Hinweis erhöhter transkriptiver Aktivität (VARGAS et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2002). Auch sind Goldfische in der Lage, eine Futterquelle zu finden, die zu einer bekannten Landmarke in einem festen Winkel liegt (DOUGLAS, 1996).

Das Fischtelencephalon ist das neuronale Substrat für eine kognitive Karte (LOPEZ et al. 2000 a). Es besitzt im Fisch für das räumliche Lernen und Gedächtnis die gleiche Bedeutung wie im Säuger der Hippocampus (LOPEZ et al., 2000 b; RODRIGUEZ et al., 2002), jener Gehirnbereich, der in großem Umfang für das Abspeichern von räumlichen Gedächtnisinhalten in ein Langzeitgedächtnis unentbehrlich ist und der an der Verarbeitung von Erinnerungen mitwirkt (vgl. z. B. BLISS, 2000; SQUIRE, 2000). Das Phänomen der Langzeitpotenzierung, das ein wichtiges zelluläres Modell für Lernen und Gedächtnis darstellt, wurde im Hippocampus entdeckt (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993). Von einigen Arbeitsgruppen werden Teile des Teleostier-Telencephalon (Area dorsalis lateralis und dorsalis ventralis) mit dem Hippocampus der Säuger homologisiert (vgl. BUTLER, 2000; RODRIGUEZ et al., 2002). Somit scheint das Telencephalon von Goldfischen auch beim erfolgreichen Lernen der hier eingesetzten Farbumterscheidungsdressur eine Rolle zu spielen. Das für Lernen und Gedächtnis wichtige Modell der Langzeitpotenzierung konnte

auch im Tectum opticum, im SFGS (Schicht 5), beim Goldfisch festgestellt werden (LEWIS & TEYLER, 1986).

Im **Tectum opticum** zeigten Goldfische während des erfolgreichen Erlernens der operanten Farbdressur einen gegenüber Nichtlernern signifikant erhöhten Energiemetabolismus. Dieser Befund weist auf eine Beteiligung des Tectum opticum bei assoziativen Lernvorgängen hin. Dieser erhöhte Metabolismus kann nicht in unterschiedlicher motorischer Aktivität oder in unterschiedlichen Reaktionen auf die andere Umgebung (das Versuchsbecken) zwischen Lernern und Nichtlernern begründet sein, denn Fische beider Versuchsgruppen kannten aus der Vordressur die Versuchsapparatur und zeigten während des Trainings keine Unterschiede in ihrer motorischen Aktivität. Zwischen Lernern und Nichtlernern treten aber Unterschiede in der Stressreaktion während der Durchführung der Farbunterscheidungsdressur auf, denn Lerner reduzieren ihren Hungerstress, da sie es im Trainingsverlauf erlernen, sich Futter zu verschaffen. Die hier festgestellten Metabolismus-Unterschiede im Tectum opticum haben ihre Ursache im unterschiedlichen Energiebedarf der beiden Versuchsgruppen. Anscheinend benötigt der Lernprozess oder eine direkt damit gekoppelte Aktivität des Tectum opticum Energie.

Mit Hilfe der [¹⁴C]-2-Desoxyglukosemethode konnten auch PRADEL und Mitarbeiter eine direkte Beteiligung des Tectum opticum bei dem Erlernen einer aktiven Meidedressur und dem Erinnern an zuvor Erlerntes, bei einem nahe verwandten Cypriniden, dem Zebrafisch (*Brachydanio rerio*) demonstrieren (PRADEL et al., 2000). Fische, die das Wechselkammertraining (Shuttle-Box Training) neu erlernten oder - in geringerem Ausmaß - dieses Training in vorhergehenden Versuchen erlernt hatten, zeigten im Tectum eine vermehrte Einlagerung von [¹⁴C]-2-Desoxyglukosephosphat. Die Bedeutung des Tectum bei der Integration visueller Information wurde schon in 4.1 dargestellt. Es sind viele Hinweise vorhanden, dass das Tectum zusätzlich zur visuellen Integration bei der Integration nichtvisueller Sinnesmodalitäten eine außerordentlich wichtige Rolle spielt, so z. B. bei der Integration visueller und elektrosensorischer Information bei Elasmobranchiern (BODZNICK, 1990), der Integration von Erregungen des visuellen und des Seitenliniensystems bei *Xenopus* (CLAAS, 1994), der Integration infraroter und visueller Information bei Klapperschlangen (KARDONG & BERKHOUDT, 1999) und der Integration visueller und auditorischer Information bei der Schleiereule (HYDE & KNUDSEN, 2002).

Eine weitere im Hinblick auf den zu Grunde liegenden Metabolismus untersuchte Struktur war das **Tegmentum**. Hier hatten Lerner gegenüber Nichtlernern nur einen unerheblich größeren Metabolismus, während naive Fische deutlich höhere Stoffwechselwerte zeigten. Das Tegmentum enthält vor allem Strukturen, denen eine wichtige Rolle bei der Steuerung motorischer Funktionen zukommt (WULLIMANN et al., 1996). Der Metabolismus dieser motorischen Strukturen scheint also im Zusammenhang mit dem erfolgreichen Erlernen eines operanten Lernvorgangs keine Veränderung gegenüber jenem nicht lernender Fische zu erfahren. Tatsächlich zeigten Nichtlerner und Lerner nach dem Einsetzen in die Versuchsanordnung keine Unterschiede in der Art oder Häufigkeit ihrer Bewegungsabfolgen. Derartige Unterschiede hätten sich im Metabolismus motorischer Strukturen zeigen müssen.

Ähnliches gilt für den Glukosemetabolismus des **Cerebellum** (Corpus cerebelli). Hier ließ sich bei Lernern ein nur unwesentlich verstärkter Metabolismus gegenüber Nichtlernern nachweisen. Wiederum besaßen naive Goldfische die höchsten Werte. Corpus und Valvula cerebelli spielen eine wichtige Rolle in der räumlichen Orientierung, der Proprioception, dem motorischen Lernen und der Koordination (WULLIMANN et al., 1996; KOTRSCHAL et al., 1998; WAGNER, 2001). Auch im Corpus cerebelli hätten sich bei Unterschieden in der motorischen Aktivität, größere Differenzen zwischen Lernern und Nichtlernern im cerebralen Metabolismus erkennen lassen müssen.

Da die vorliegende Dressur futterbelohnt war, sollte geprüft werden, ob nach diesem Lernen, Veränderungen in den gustatorischen Zentren nachzuweisen sind. Bei Goldfischen, deren Geschmacksknospen mehrheitlich im Gaumen lokalisiert sind, wird die gesamte oropharyngeale Höhle topographisch in den **Vaguskerne** repräsentiert (MORITA & FINGER, 1985; KOTRSCHAL et al., 1991, WULLIMANN et al., 1996). Der Goldfisch besitzt einen, verglichen mit anderen Cypriniden, moderaten **Lobus facialis**, der den externen Hautgeschmack repräsentiert, hingegen einen großen Lobus vagi für den oropharyngealen Sortierapparat (KOTRSCHAL et al., 1991). Nach Meinung von KOTRSCHAL und Mitarbeitern sei der Goldfisch ein Spezialist des "chemischen Sinnes" und besäße ein "chemosensorisches Gehirn" (KOTRSCHAL et al., 1991). Cypriniden spiegeln hier unterschiedliche Anpassungen wieder. Andere Cypriniden, z. B. der Gründling (*Gobio gobio*) und die Barbe (*Barbus barbus*), die über große Barteln und damit viele Geschmacksknospen auf der Körperoberfläche verfügen, haben einen kleinen Vaguskerne

und einen massiven Lobus facialis (KOTRSCHAL et al., 1991). Der Goldfisch nimmt mit seinem oropharyngealen Sortierapparat zunächst alles an potentieller Nahrung auf und spuckt dann nicht Verwertbares wieder aus (LAMB & FINGER, 1995).

Die Ergebnisse für den Glukosemetabolismus der gustatorischen Zentren zeigten folgendes Bild: Vaguskerne von Lernern hatten während der gustatorisch motivierten Dressur einen geringfügig höheren Metabolismus als entsprechende Kerne bei Nichtlernern. Bei den Facialiskernen war kaum ein Unterschied zwischen Lernern und Nichtlernern auszumachen. Naive Fische besaßen in beiden gustatorischen Zentren wiederum die höheren Werte.

Da sich ein kleiner Teil der Futterpaste im Verlauf der Farbdressur im Wasser löst, reagiert sicherlich auch das gustatorische und olfaktorische Sinnessystem eines in die Farbdressur eingesetzten Fisches auf die im Wasser gelösten Nahrungspartikel. Diese Geruchs-/Geschmacksfreisetzung geschieht bei Lernern und Nichtlernern in gleichem Maße und sollte daher die gleichen Auswirkungen haben, denn sie hat mit dem Lernvorgang als solchem nichts zu tun. Andererseits kann ausgeschlossen werden, dass die Fische den futterbelohnten Futterkasten nur deswegen anschwammen, weil von dort der Geruch kam, dies wäre auch kein Lernen gewesen. Der Geruch muss von allen vier Schläuchen ausgegangen sein.

Die höheren Glukosemetabolismuswerte naiver Tiere könnten auf Stresseinflüsse zurückzuführen sein. Die naiven Goldfische, die nach der Injektion der [¹⁴C]-2-Desoxyglukose in das Versuchsbecken mit der Apparatur für die Farbdressur gesetzt wurden, hielten sich das erste Mal dort auf. Verglichen mit Fischen, die mit der Versuchsapparatur über einen Zeitraum von Wochen vertraut waren, wiesen die naiven Tiere deutlich erkennbar stressbeeinflusstes Verhalten auf. So zeigten viele Fische ein aufgeregtes Verhalten, indem sie mit hoher motorischer Aktivität von einem zum anderen Beckenende schwammen und oft auch typisches Flossenklemmen erkennen ließen. Fische, die gestresst sind, zeigen höhere Stufen motorischer Aktivität (OVERLI et al., 2002). Diese verstärkte motorische Aktivität könnte sich im höheren Energieverbrauch in den motorischen Zentren Tegmentum und Cerebellum niedergeschlagen haben.

Anwachsender Stress könnte sich insgesamt in hohen Metabolismuswerten niederschlagen. Die Stressantwort bei Teleostiern zeigt viele Ähnlichkeiten mit der landlebender Vertebraten. Dies trifft sowohl auf die Gehirn-Rückenmark-Sympathicus Achse und die Gehirn-Hypophysen-Zwischennieren Achse zu (WENDELAAR BONGA, 1997). Dies führt, verglichen mit terrestrischen Vertebraten, zu gleicher Symptomatik und zwar zur Stimulation der Sauerstoffaufnahme, Mobilisierung der Energiesubstrate und zur Hemmung energie-liefernder Prozesse, betreffend Wachstum, Reproduktion und Immunsystem. Teleostier reagieren auf Stress mit einem Anwachsen der Konzentrationen von Serotonin und Dopamin im Hirnstamm und von Noradrenalin im Tectum opticum und Telencephalon (OVERLI et al., 2001). Andere Studien konnten zeigen, dass Stress eine schnelle Aktivierung Somatolactin-sezernierender Zellen in der Pars intermedia des Hypothalamus hervorruft (RAND-WEAVER et al., 1993) und sowohl eine schnelle und anhaltene Erhöhung von Serotonin im Telencephalon als auch eine m-RNA Induktion von Pro-opiomelanocortin in der Hypophyse bewirkt (WINBERG & LEPAGE, 1998).

Ein weiterer wichtiger Stressfaktor für die naiven Fische war das Herausfangen aus dem Haltungsbecken. Nach dieser Prozedur zeigten naive Fische deutliche Stressanzeichen. Bei Lernern und Nichtlernern, die alle zwei bis drei Tage mit dem Käscher gefangen wurden und an diese Prozedur gewöhnt waren, war dagegen keinerlei Anzeichen einer Stressreaktion zu erkennen. Für Vertreter verschiedener Teleostiergruppen ist der Zusammenhang zwischen erhöhten Cortisolkonzentrationen und dem Fangen bestätigt worden, so für Cypriniden wie Karpfen (*Cyprinus carpio*) und Plötze (*Rutilus rutilus*) (POTTINGER et al., 1999; TANCK et al., 2000), für Plattfische wie den Steinbutt (*Psetta maxima*) (WARING et al., 1996), für Salmoniden wie den Seesaibling (*Salvelinus alpinus*) (ELOFSSON et al., 2000) und für Meerbrassen der Familie Sparidae (ROSSLANT & TORT, 1997). Bei den beiden Letztgenannten wurde zusätzlich eine durch den Käscherfang hervorgerufene Hyperglykämie beschrieben (ROSSLANT & TORT, 1997; ELOFSSON et al., 2000).

Zusammenfassend lässt sich Folgendes festhalten: Wie schon von PRADEL und Mitarbeitern bei einer aktiven Vermeidendressur festgestellt, konnte auch während der Experimente der vorliegenden Untersuchung bei der neuen operanten Farbunterscheidungsdressur ein erhöhter Energiebedarf im Tectum opticum registriert werden (PRADEL et al. 1997, 2000). Dies ist ein Hinweis auf lernrelevante Vorgänge im Tectum auch bei diesem positiv verstärkten Lernvorgang.

Beim Lernvorgang kommt es zu Veränderungen der synaptischen Erregungsübertragung, die u. a. auf der Wirkung verschiedener Transmitter beruhen. Für Säuger ist z. B. mittlerweile gut etabliert, dass Glutamatrezeptoren (NMDA-Rezeptoren) eine wichtige Rolle bei der neuronalen Plastizität spielen, die Lernen und Gedächtnis zu Grunde liegt (z. B. PLATENIK et al., 2000). Goldfische besitzen Glutamatrezeptoren im Tectum opticum (UEDA, 1997) und in den Vaguskernen (SMERASKI et al., 1999). Die Injektionen der NMDA-Antagonisten AP5, MK-801 und HA-966 vor dem Lernen einer aktiven Vermeidendressur ruft beim Goldfisch eine anterograde Amnesie hervor (XU & DAVIS, 1992; XU et al., 1995; XU et al. 2001) und Injektionen des NMDA-Antagonisten MK-801 verhindern bei einer Konditionierung die Assoziationsbildung von konditioniertem und unkonditioniertem Stimulus (XU, 1997). Aus diesem Grund können die Fische den konditionierten nicht mehr mit dem unkonditionierten Stimulus assoziieren.

4.3 Der Goldfisch als Objekt der Verhaltens- und Gedächtnisforschung

Als Grundlage zur Erforschung der Gedächtniskonsolidierung nach einer appetitiven Belohnungsdressur, konnte für Goldfische eine neue stressarme Belohnungsdressur erfolgreich etabliert werden. Hierbei handelt es sich um ein operantes Konditionierungsexperiment, wobei der Fisch mit alternativen Stimuli konfrontiert wird und dann eine Belohnung erhält, wenn er den richtigen Stimulus auswählt, (vgl. DOUGLAS & HAWRYSHYN, 1990). Die Fische werden in der für diese Untersuchung neu entwickelten Dressur unter Einsatz eines positiven Verstärkers (Futter) darauf trainiert, einen Farbstimulus, bestehend aus rotem und grünem bzw. blauem und grünem Licht zu unterscheiden und die futterbelohnende Box anzuschwimmen. Somit wird die Bedingung für die operante Konditionierung erfüllt, bei der die Verhaltensaktion mit dem Verstärker assoziiert wird (FRANCK, 1985; MCFARLAND 1989; DUDEL et al., 1996). Die richtige Verhaltensaktion besteht darin, die Futterbox in einer neuen Trainingsrunde als erste anzuschwimmen, in der das futterbelohnende Farbsignal angeschaltet ist, wobei die drei anderen Futterboxen mit dem anderen, nicht belohnenden Farbsignal ausgestattet sind. Nachdem sie in der Vordressur die Futterentnahme aus den Fitterschläuchen erlernt

hatten, absolvierten 55 % der Goldfische ihre erste Farbdressur erfolgreich. Diese Versuchstiere erlernten diese Aufgabe innerhalb von 45 Minuten, womit gesichert war, dass eine ausreichende Anzahl von Tieren, die für Experimente der vorliegenden Untersuchung benötigt wurden, in relativ kurzer Zeit trainiert werden konnte.

Auffällig war, dass für die Goldfische die verschiedenen Farbunterscheidungsdressuren unterschiedlich schwer zu erlernen waren. Kein in der Gründressur trainierter Goldfisch erreichte im ersten Training das Lernkriterium (Abb. 11). Auch die Blaudressur erwies sich für die Fische als schwieriger zu erlernen als erwartet. Nur drei von 10 Goldfischen erreichten im ersten Training das definierte Lernkriterium, wobei der Fisch in fünf von sechs aufeinander folgenden Trainingsrunden die mit dem belohnten Farbsignal versehene Box als erste anschwimmen musste. Nur die Rotdressur, das heißt das Auswählen eines roten Signals gegenüber drei grünen, brachte einen ausreichenden Anteil an Lernen (55 %) hervor, so dass eine genügende Anzahl von Fischen aller Kontrollgruppen für die Injektionsversuche und die biochemischen Untersuchungen zur Verfügung stand.

Fische sind für Lernversuche gut geeignet, und sind erfolgreich auf Farben, Töne, Temperaturveränderungen, Veränderungen im Salzgehalt, Geruch und Geschmack konditioniert worden (BONE & MARSHALL, 1985). Der Goldfisch ist nicht nur aufgrund seiner guten Lernfähigkeit, sondern auch aufgrund seines Vermögens zu längerer, mehr als einen Monat währender, dauerhafter Erinnerung ein ausgezeichnetes Versuchstier für die Gedächtnisforschung (AGRANOFF & KLINGER, 1964). Auch in der neuen futterbelohnten Farbunterscheidungsdressur trainierte Goldfische erinnerten sich sehr lange an die zuvor erlernte Aufgabe (Abb. 16), wobei das hohe Niveau der Erinnerung bei mehreren der Fische schon nach dem fünften Training erreicht wurde. Folglich war schon nach wenigen Dressurversuchen ein dauerhaftes Langzeitgedächtnis erfolgreich konsolidiert worden. Ein abnehmendes Erinnerungsvermögen, also beginnendes Vergessen, war erst nach fünf Monaten zu beobachten.

Der Goldfisch ist schon seit Jahrzehnten ein beliebtes Versuchstier in der Verhaltens- und Gedächtnisforschung. HORNER und Mitarbeiter entwickelten eine Shuttle-Box zur aktiven Meidekonditionierung von Goldfischen (HORNER et al., 1961). Bei dieser klassischen Konditionierung muss der Goldfisch nach Aufleuchten eines roten Lichtes mit der Überquerung einer Hürde, die das Aquarium in zwei Hälften teilt, reagieren, um einen

Stromschlag zu vermeiden. Dieses Verhaltensparadigma wurde von AGRANOFF und KLINGER (1964) eingesetzt, um die Gedächtnisbildung beim Goldfisch zu erforschen, und später von PIRONT und SCHMIDT (1988) modifiziert verwendet, um die Rolle des Ependymins bei der Gedächtniskonsolidierung zu untersuchen. INGLE (1965) konditionierte Goldfische mit Stromreizen auf Muster und Farben, um den intertectalen Transfer, das heißt die Übertragung eines Gedächtnisinhaltes von einer Hirnhemisphäre auf die andere, zu erforschen. WOOLFE und Mitarbeiter (WOOLFE et al., 1974) entwickelten ein operantes Floßtraining, bei dem einem Goldfisch ein Styroporfloß ventral an der Basis der Bauchflossen befestigt wird. Der Fisch muss lernen, trotz eines Auftrieb erzeugenden Floßes, wieder aufrecht zu schwimmen, und das einmal Erlernete in Erinnerung zu behalten. YEO und SAVAGE (1975, 1976) konditionierten Goldfische auf Muster, deren Erscheinen die Fische mit einer Abnahme der Herzschlagfrequenz zu beantworteten hatten. OVERMIER und PATTEN (1982) entwickelten ein Y-Labyrinth, in dem die Goldfische durch Belohnung verschiedene Stimuli lernen und sich für einen Weg des Y-förmigen Aquariums entscheiden müssen. Bei Verhaltensversuchen der Arbeitsgruppe SALAS müssen Goldfische in einer trapezförmigen Box, deren Wände mit Streifen und Punkten versehen sind, den Ausgang finden und bilden eine räumliche Karte (SALAS, 1996; LOPEZ et al., 1999, 2000 a, 2000 b). Mit Hilfe von Umkehrexperimenten, wobei die räumliche Anordnung der Streifen und Punkte im Trapez verändert wird, lassen sich nun Rückschlüsse auf Gedächtnissysteme ziehen. Eine andere futterbelohnte diskriminative Aufgabe, bei der der Fisch lernen muss, ein Abteil des zweigeteilten hinteren Aquarianteils mit Futter zu verbinden, entwarfen MATTIOLI und Mitarbeiter, um Einflüsse auf das Gedächtnis zu untersuchen (MATTIOLI et al., 1997). ODA und Mitarbeiter brachten durch eine auditorische Konditionierung Goldfische dazu, beim Auftreffen eines Balles auf die Wasseroberfläche ihres Beckens nicht mehr mit dem charakteristischen C-Start (Fluchtreflex) zu reagieren (ODA et al., 1998).

Die hier entwickelte Farbunterscheidungsdressur hat den entscheidenden Vorteil, dass im Gegensatz zu der von LAUDIEN und Mitarbeitern (vgl. LAUDIEN, 1975, 1977; SCHARPEKANT, 1979; SCHARPEKANT & LAUDIEN, 1980; LAUDIEN et al., 1986) und der Arbeitsgruppe MATTIOLI entwickelten futterbelohnten Dressur (MATTIOLI et al., 1997), die richtige Verhaltensantwort zufallsbedingt nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 25 % auftritt, da hier der Goldfisch eine von vier Farbsignale enthaltenden Futterboxen auswählen muss. Bei den oben erwähnten Konditionierungen waren für die Fische nur zwei Möglichkeiten zur Wahl vorhanden. Die Tiere hatten damit eine 50%ige Chance, die richtige Wahl zufällig zu treffen. Bei Untersuchungen zur Langzeitgedächtnisbildung sind genauere "Auflösungen" von

Erinnerungsleistungen in Testsituationen wichtig, um exakte Ergebnisse zu erhalten. Ein Vorteil der hier entwickelten Dressur ist, dass innerhalb eines Trainingsdurchlaufes der Fisch kontinuierlich im Versuchsbecken war und jederzeit eine Futterbox anschwimmen konnte, gewertet wurde ja nur der Besuch einer Futterbox zu Beginn einer neuen Trainingsrunde. Bei den oben erwähnten Farbdressuren (vgl. LAUDIEN, 1975, 1977; SCHARPEKANT, 1979; SCHARPEKANT & LAUDIEN, 1980; LAUDIEN et al., 1986; MATTIOLI et al., 1997), musste der Fisch einmal wählen und wurde nach jeder Wahl mit dem Käscher in ein Nachbarabteil zurück geführt. Dort verblieb er einen Augenblick, ehe er wieder in den Versuchsteil des Beckens schwimmen konnte. Das Führen des Fisches mit dem Käscher stellt sicherlich einen vermeidbaren Eingriff in den Ablauf der Konditionierung dar. In jenen Dressuren wurde auch kein Lernkriterium definiert, sondern es wurden nur prozentuale Häufigkeiten richtiger Verhaltensreaktionen aller Fische vor bzw. nach einer Behandlung zusammengefasst.

Eine weitere Besonderheit der neu entwickelten Farbumterscheidungsdressur bestand darin, dass die Goldfische nicht nur einfach eine Futterbelohnung erhielten, sondern sich diese innerhalb der Futterboxen holen mussten, wozu die Tiere die Öffnung der Boxen mit der vorderen Körperhälfte durchschwimmen mussten. Gegenüber Untersuchungen zur Gedächtniskonsolidierung, die mittels Meidedressuren durchgeführt wurden (AGRANOFF & KLINGER, 1964; PIRONT & SCHMIDT, 1988) hat die hier entwickelte Dressur den Vorteil, dass sie stressarm ist, somit Stresseinflüsse auf die Gedächtniskonsolidierung als gering einzuschätzen sind. Die in der Vordressur an die Verhaltensapparatur gewöhnten Tiere machten auf den Experimentator keinen gestressten Eindruck und begannen sofort mit der Nahrungssuche in den Futterboxen.

4.4 Farbsehen bei Goldfischen

Erste Dressurexperimente zum Farbsehen des Goldfisches führte u. a. YAGER (1967, 1968) durch, indem er seine Fische auf ein beleuchtetes Testfeld dressierte. BEAUCHAMP und ROWE (1977) führten eine Reflexmessung durch. Sie konditionierten einen curarisierten und folglich fixierten Goldfisch mit Hilfe von Elektroschocks, der auf einen Lichtreiz hin verabreicht wurde und maßen die Herzschlagfrequenz. Weitere von NEUMEYER (1988) mit Hilfe von Futterbelohnungen durchgeführte Farbdressurexperimente zeigten, dass neben

den spektralen Empfindlichkeitsmaxima von 470, 540 und 660 nm ein Maximum der spektralen Empfindlichkeit bei 360 nm auftritt, was auf einen UV-Rezeptor (HAWRYSHYN & BEAUCHAMP, 1985; NEUMEYER, 1985) zurückzuführen ist, der inzwischen kloniert wurde (HISATOMI et al., 1996). Die Farbmischexperimente von NEUMEYER erbrachten, dass der Goldfisch ein tetrachromatisches Farbsehen besitzt, welches allerdings unterhalb einer Beleuchtungsstärke von 1,5 lx trichromatisch wird, da der langwellige Zapfentyp bei 1,5 lx nicht am Farbsehen beteiligt ist, so dass unter diesen Bedingungen der Fisch nicht in der Lage ist, Rot von Grün zu unterscheiden und unter diesen Bedingungen Helligkeitskriterien eingesetzt werden, wenn der Helligkeitsabgleich gemäß der veränderten Empfindlichkeitsfunktion nicht erfolgt ist (NEUMEYER, 1988). Laut NEUMEYER zeigen Goldfische eine spontane Bevorzugung der helleren Farbe und alle Farben werden bei größerer Helligkeit attraktiver. In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise, dass Goldfische und andere Teleostier polarisiertes Licht wahrnehmen (HAWRYSHYN & MCFARLAND, 1987). Die UV-, grün- und rotempfindlichen Zapfen zeigen eine eindeutige Polarisationsempfindlichkeit (DOUGLAS & HAWRYSHYN, 1990).

Die drei verschiedenen hier eingesetzten Farbdressuren unterschieden sich deutlich in der Erlernbarkeit für die Goldfische (s. 3.1.2.). 55 % der in der Rotdressur eingesetzten Fische erreichten im ersten Training das Lernkriterium. Im Gegensatz dazu erreichte kein erstmalig in der Gründressur trainierter Fisch das Lernkriterium, obwohl hier die gleichen Stimuli verwendet wurden. Da hier kein Helligkeitsabgleich erfolgt ist, kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass Goldfische nicht Rot/Grün Unterschiede, sondern Helligkeitsunterschiede erlernt haben und in der Gründressur (ein grüner Stimulus versus drei rote Stimuli) Schwierigkeiten hatten, die drei "hellen", also attraktiveren, roten Kästen nicht anzuschwimmen. Gegen diese These sprechen aber Ergebnisse von MUNTZ und CRONLY-DILLON (1966), die zeigen, dass Grün sowohl von Rot als auch von Blau unterschieden werden kann, unabhängig von Helligkeitsunterschieden. Auf den Experimentator machten in die Farbdressur eingesetzte Fische den Eindruck eine Farbe gegenüber der anderen zu bevorzugen. Deutlich wurde dies in der Blaudressur, die drei von zehn Tieren im ersten Trainingsdurchlauf erlernten. Manche Fische schienen generell das blaue Licht zu meiden. Goldfische besitzen eine gute Unterscheidungsfähigkeit von Blau/Grün (NEUMEYER, 1988).

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass die hier entwickelte Farbdressur zur Erforschung der Gedächtnisbildung gut geeignet ist, da sie vor allem in der

Rotdressur eine ausreichende Anzahl an Lernern gewährleistet, gut erinnerbar und mit einer Trainingsdauer von höchstens 45 Minuten für den Fisch schnell zu erlernen ist. In dieser Studie geht es auch nicht um eine Analyse zum Farbsehen von Goldfischen, sondern darum, Erinnerung quantifizierbar zu machen.

4.5 Wirkung von injiziertem Puromycin nach der operanten Farbunterscheidungs- dressur

4.5.1 Wirkung von injiziertem Puromycin auf die Gedächtniskonsolidierung

Zahlreiche Studien an Fischen, Vögeln, Nagern und Invertebraten haben darauf hingewiesen, dass an der Bildung des Langzeitgedächtnisses Prozesse der Proteinbiosynthese beteiligt sind (vgl. AGRANOFF et al., 1999). So kann die Bildung eines Kurzzeitgedächtnisses und eines Langzeitgedächtnisses mit Hilfe der Proteinsynthesehemmer Cycloheximid, Anisomycin oder Puromycin dahingehend unterschieden werden, dass zwar die Bildung eines Langzeitgedächtnisses (Konsolidierung) durch derartige Pharmaka hemmbar ist, die Bildung eines Kurzzeitgedächtnisses dagegen nicht blockiert wird. Die Langzeitgedächtniskonsolidierung wird demnach durch Prozesse vermittelt, die eine *de novo* Proteinsynthese benötigen, vom neuronalen Genom abhängen und eine Kommunikation von Zelloberfläche und Nucleus erfordern (AGRANOFF et al., 1999).

Erste Versuche zur Proteinsyntheseabhängigkeit der Gedächtnisbildung führten FLEXNER und Mitarbeiter (FLEXNER et al., 1963) durch, die Mäusen einen Tag nach dem Erlernen eines Meidetrainings (Vermeidung eines Armes in einem Y-Labyrinth) Puromycin intracerebral injizierten, was die Gedächtnisbildung verhinderte. Weitere frühe Untersuchungen zur Gedächtniskonsolidierung wurden an Goldfischen durchgeführt. AGRANOFF und KLINGER (1964) injizierten Goldfischen 90 µg Puromycin unmittelbar nach dem Erlernen einer aktiven Meidedressur, dem Überqueren einer Hürde nach dem Aufleuchten eines roten Lichtes. Goldfische, die drei Tage später getestet wurden, erinnerten sich nicht an die zuvor erlernte Aufgabe. Das Gedächtnis übertrainierter Tiere, das heißt von Tieren, die die Aufgabe in zahlreichen Versuchen schon erlernt hatten und beherrschten, deren Gedächtnis somit schon

konsolidiert war, erwies sich hingegen im Test als Puromycin-resistent. In weiteren Versuchen erwiesen sich Goldfische, die mit weiteren Hemmern der Proteinsynthese, wie Actinomycin und Cycloheximid unmittelbar nach dem Shuttle-Box Training injiziert wurden, im Test als amnestisch (AGRANOFF et al., 1967).

SHASHOUA (1968) untersuchte den Einbau radioaktiv markierten Uridins und Cytidins in die RNA sowie die Wirkung von Puromycin auf die Gedächtniskonsolidierung und RNA-Veränderungen bei Goldfischen, die eine operante Aufgabe erlernt hatten. Die mit Puromycin behandelten Fische veränderten nicht das Basenverhältnis der RNA. NEALE und Mitarbeiter (NEALE et al., 1973) blockierten bei Goldfischen mittels Camptothecin das Gedächtnis nach einer Meidedressur. Camptothecin hemmt die Topoisomerase I, ein Enzym, das die koordinierte Spaltung und Wiederverschließung doppelhelikaler DNA katalysiert und bei Replikation und Transkription eine wichtige Rolle spielt (URICH, 1990; STRYER, 1995). Die Arbeitsgruppe LAUDIEN führte die Wirkung der Gedächtnisblockierung von Proteinsynthesehemmern auf den Einfluss von Stress zurück, da alle bis dahin durchgeführten Lernparadigmen als Verstärker Strafreize eingesetzt hatten und entwickelte eine futterbelohnte Farbdressur (LAUDIEN 1975, 1977; SCHARPEKANT, 1979; SCHARPEKANT & LAUDIEN, 1980; LAUDIEN et al., 1986). Die Gedächtnisbildung von Fischen, die diese Dressur erlernt hatten, ließ sich durch Hemmer der Proteinsynthese nicht beeinflussen.

Für die hier neu entwickelte Farbunterscheidungsdressur sollte deshalb mit Hilfe von Puromycin-Injektionen zuerst einmal geklärt werden, ob die von LAUDIEN und Mitarbeitern erhobenen Befunde einer proteinsyntheseunabhängigen Gedächtnisbildung in einer Belohnungsdressur bestätigt werden können oder ob die Bildung des Langzeitgedächtnisses nach einer diskriminativen Belohnungsdressur generell gleiche Mechanismen involviert wie nach dem Erlernen einer Strafdressur, die mit Stress verbunden ist.

Während der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde eine Puromycindosis gewählt, die nach Angabe von AGRANOFF und Mitarbeitern (AGRANOFF et al., 1965) wirksam die Gedächtniskonsolidierung blockiert, ohne den Fisch toxisch zu belasten. Auch der gewählte Injektionszeitpunkt von 30 Minuten nach dem Erlernen der Farbdressur, stimmte mit dem von AGRANOFF und Mitarbeitern gefundenen Zeitfenster überein. Dieses entsprach der größten Empfindlichkeit des Gedächtnisses gegenüber Puromycin-Injektionen 20 Minuten vor dem Training bis zu 60 Minuten nach dem Training (AGRANOFF et al., 1965). In der vorliegenden Studie waren Fische, die 30 Minuten nach Erlernen der operanten Farbdressur mit einer Dosis von 170 µg Puromycin injiziert worden waren, im Test drei Tage später weniger erfolgreich und erinnerten sich schlechter. Dabei sank die Anzahl richtiger Wahlen von durchschnittlich 12,1 im ersten Training auf durchschnittlich 8,7 im Test, ein Unterschied, der signifikant war ($p < 0,05$; gepaarter t-Test). Die für diese Injektionen ausgewählten Fische waren ausnahmslos sehr gute Lerner, das heißt sie hatten mit 12,1 richtigen Wahlen im ersten Training (Abb. 12) ein durchschnittlich höheres Lernniveau erreicht, als die Lerner der anderen Injektionsversuche mit durchschnittlich 9,7 richtigen Wahlen (Abb. 13). Die erhaltenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass auch bei der Langzeitgedächtniskonsolidierung nach Erlernen dieser neuen stressarmen Belohnungsdressur Prozesse ablaufen, die eine *de novo* Proteinsynthese benötigen. Dies steht im Einklang mit neueren Studien, die sich mit der Proteinsynthese und dem Erlernen einer operanten, appetitiven Aufgabe beschäftigten (vgl. BERTAINA & DESTRADE, 1995; BALDWIN et al., 2000; BERTAINA-ANGLADE et al., 2000). So wurde im Hippocampus der Maus die c-Fos mRNA (ein immediate early gene) nach appetitivem Training heraufreguliert (BERTAINA & DESTRADE, 1995) und eine erhöhte c-Fos-Proteinexpression im Hippocampus und in corticalen Bereichen der Maus nach appetitivem, operanten Lernen festgestellt (BERTAINA-ANGLADE et al., 2000). Auch das Erlernen des Anlegens von Futterspeichern induziert eine Neurogenese im Vogelhippocampus (PATEL et al., 1997). Somit können frühere Interpretationen der Arbeitsgruppe Laudien (LAUDIEN, 1975, 1977; SCHARPEKANT, 1979; SCHARPEKANT & LAUDIEN, 1980; LAUDIEN et al., 1986) widerlegt werden. Ein weiterer Einwand gegen die von LAUDIEN und Mitarbeitern eingesetzte Farbdressur besteht in der Möglichkeit, dass dort eingesetzte Fische gar nicht gelernt haben. Die Fische mussten nur zwischen zwei verschiedenen farbigen Zielen wählen und konnten sich auch nach falscher Wahl umentscheiden. Nach Beobachtungen, die während der vorliegenden Untersuchung gewonnen wurden, entscheidet sich ein Fisch, wenn er ein falsches Ziel getroffen hat umgehend für die nächste Möglichkeit.

4.5.2 Wirkung von injiziertem Puromycin auf Erinnerungsprozesse (Rekonsolidierungshypothese)

Neuere Befunde widersprechen der ursprünglichen Konsolidierungshypothese und versuchen nachzuweisen, dass nach Abrufen eines Gedächtnisses eine erneute Einspeicherung erfolgt, die proteinsyntheseabhängig ist (Rekonsolidierungshypothese; vgl. PRZYBYSLAWSKI & SARA, 1997; SARA et al., 1999; SARA, 2000).

Das Schema der Langzeitgedächtniskonsolidierung und Rekonsolidierung lässt sich folgendermaßen darstellen: Das Tier erlernt eine Verhaltensaufgabe, z. B. die Assoziation eines CS und eines US und bildet ein Kurzzeitgedächtnis, welches durch proteinsyntheseabhängige Prozesse innerhalb von Stunden in ein Langzeitgedächtnis überführt wird (Langzeitgedächtniskonsolidierung). Wird das Tier zu einem späteren Zeitpunkt mit dem gleichen Kontext, indem es jenes Verhalten erlernt hat, konfrontiert, so erinnert es sich, wobei das zuvor gebildete Langzeitgedächtnis reaktiviert wird und in eine labile Phase übergeht, die gleichermaßen proteinsyntheseabhängig ist, wobei das Gedächtnis erneut konsolidiert werden muss (PRZYBYSLAWSKI & SARA, 1997; LITVIN & ANOKHIN, 2000). Allerdings geht das Gedächtnis während der Reaktivierung nur dann wieder in einen labilen Zustand über, wenn ein sogenannter "reminder" vorhanden ist, im allgemeinen ein mit dem erinnerten Verhaltenskontext assoziierter Stimulus. TAUBENFELD und Mitarbeiter (TAUBENFELD et al., 2001) meinen, dass Ratten entweder verschiedene molekulare Mechanismen oder verschiedene Hirnregionen für eine Rekonsolidierung benötigen. Ergebnisse, die auf Rekonsolidierungsprozesse hinweisen, wurden in Positiv- (PRZYBYSLAWSKI & SARA, 1997; SARA et al., 1999) und Negativdressuren mit Ratten (NADER et al., 2000; TAUBENFELD et al., 2001), in einer Vermeidedressur mit Hühnerküken (LITVIN & ANOKHIN, 2000) und mit der Landschnecke *Limax* (SEKIGUCHI et al., 1997) erzielt.

Die mit übertrainierten Goldfischen während der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse könnten ebenfalls auf eine labile Phase während des Abrufens des schon gebildeten Gedächtnisses hindeuten. Drei übertrainierte Fische, die schon nach dem sechsten Trainingsdurchlauf ein Lernniveau von 15 richtigen Verhaltensantworten erreicht hatten und dieses Niveau auch bis zum zehnten Trainingsdurchlauf beibehielten, wurden 30 Minuten nach dem zehnten Training mit Puromycin injiziert. Zwei der drei Fische waren im Test deutlich weniger erfolgreich. Dies könnte ein Hinweis auf die Möglichkeit einer labilen Phase während des Erinnerungsprozesses sein. Der dritte Fisch traf allerdings trotz Injektion im

Test keine falsche Wahl. Mit drei Messwerten müssen die Daten allerdings äußerst vorsichtig interpretiert werden. Eine alternative Interpretation für das Ergebnis wäre eine Toxizität des injizierten Puromycins, besonders auf die Membran von Erythrozyten (BURKA et al., 1975). Die Möglichkeit unspezifischer Gifteinwirkung auf die Erinnerungsfähigkeit ist in der Literatur diskutiert worden (z. B. FLEXNER et al., 1963; AGRANOFF et al., 1965; BURKA et al., 1975) und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass derartige längerandauernde toxische Wirkungen eine Rolle spielen. Gegen solche Wirkungen spricht, dass die mit Puromycin injizierten Lerner (s. 4.5.1) überhaupt keine Verhaltensauffälligkeiten aufwiesen und sich auch in den Haltungsaquarien normal verhielten.

Da übertrainierte Fische aufgrund des für ihr Training benötigten hohen Zeitaufwandes sehr wertvoll waren und die Zahl dieser Tiere dadurch begrenzt war, wurde auf weitere Puromycin-Versuche verzichtet, zumal übertrainierte Fische auch für die anderen Versuche benötigt wurden. Um aussagekräftige und auch signifikante Ergebnisse zur Rekonsolidierungshypothese zu erhalten, sollten zukünftig weitere systematische Injektionsversuche an einer größeren Zahl übertrainierter Fische durchgeführt werden.

4.6 Wirkung von injizierten anti-Ependymin-Antikörpern auf die Gedächtniskonsolidierung

Schon frühere Experimente hatten die Beteiligung des extrazellulären Matrix-Glykoproteins Ependymin bei der Gedächtniskonsolidierung von Goldfischen gezeigt. Effekte von Injektionen eines spezifischen anti-Ependymin-Antikörpers innerhalb eines limitierten Zeitfensters auf die Gedächtniskonsolidierung, wurden bei einem operanten Floßtraining beobachtet (SHASHOUA & MOORE, 1978; SHASHOUA, 1985; SCHMIDT, 1987) und konnten gleichermaßen in einer aktiven Meidedressur registriert werden (PIRONT & SCHMIDT, 1988; SCHMIDT, 1986; SCHMIDT, 1989). Desweiteren konnte durch die Injektion einer Antisense-Oligodesoxynukleotid-Sonde, die aufgrund der Blockierung der Translation die Neubildung von Ependyminmolekülen verhindert, die Gedächtniskonsolidierung bei Goldfischen nach der aktiven Meidedressur blockiert werden (SCHMIDT et al., 1995). In den Injektionsversuchen der vorliegenden Studie konnte ebenfalls eine Beteiligung des Ependymins bei

der operanten Farbunterscheidungsdressur nachgewiesen werden. Fische, die diese Dressur innerhalb von 45 Minuten erlernt hatten und 30 Minuten danach mit einem polyklonalen anti-Ependymin-Antikörper gegen das deglykosylierte Polypeptid in den tectalen Hirnventrikel injiziert worden waren, erinnerten sich signifikant schlechter, wenn sie drei Tage später im Testdurchlauf geprüft wurden. In den nachfolgenden Trainingsdurchläufen lernten diese Fische aber die Aufgabe erneut, ein weiterer Hinweis, dass die Langzeitgedächtniskonsolidierung blockiert worden war. Auch bei Injektionsversuchen nach dem Erlernen der aktiven Meidedressur lernten Goldfische, deren Langzeitgedächtnisbildung blockiert worden war, die Aufgabe erneut (PIRONT & SCHMIDT, 1988).

Injektionen mit dem Präimmunserum 30 Minuten nach Erreichen des Lernkriteriums in der Farbunterscheidungsdressur hatten keinen Einfluss auf die Bildung des Langzeitgedächtnisses. Weder die Injektionsprozedur als solche, noch die Injektion anderer unspezifischer IgG Moleküle in die Cerebrospinalflüssigkeit bewirkte eine Gedächtnisbeeinträchtigung im Test.

Keine Beeinträchtigung des Gedächtnisses erzeugte die Injektion von anti-Ependymin-Antikörpern bei übertrainierten Fischen. Diese Gruppe zeigte im Gegenteil die höchste Auswahl richtiger Verhaltensantworten im Test. Dies ist ein Beleg für den Besitz eines bereits gut konsolidierten Gedächtnisses. Darüber hinaus macht dieses Ergebnis deutlich, dass die Gedächtniskonsolidierung beeinträchtigt wurde und nicht die Prozesse des Wiederabrufens eines Gedächtnisses (Erinnerung). Diese Ergebnisse sprechen somit gegen die Hypothese, dass bei der operanten Farbunterscheidungsdressur Rekonsolidierungsprozesse ablaufen (s. 4.5.2).

Injektionsversuche zur Blockierung der Gedächtniskonsolidierung nach dem Erlernen einer aktiven Meidedressur zeigten gleichartige Ergebnisse (SCHMIDT, 1986; PIRONT & SCHMIDT, 1988). Injektionsversuche mit anti-Ependymin-Antikörpern lieferten ein Zeitfenster der Antikörperwirkung. Goldfische, die 0,5 Stunden, 4,5 Stunden und 24 Stunden nach der Verhaltensakquisition mit anti-Ependymin-Antikörpern injiziert worden waren, erwiesen sich im Test als amnestisch. Dagegen hatten Fische, die 72 Stunden nach der Verhaltensakquisition injiziert worden waren, schon ein Langzeitgedächtnis gebildet, das der Intervention nicht mehr zugänglich war. Das gleiche Zeitfenster für die Blockierbarkeit

der Langzeitgedächtnisbildung, von 0,5 bis 24 Stunden nach der Verhaltensakquisition konnte ebenfalls für ein operantes Floßtraining festgestellt werden (SHASHOUA & MOORE, 1978; SCHMIDT, 1987). Somit fällt der Zeitpunkt der Injektionen in der vorliegenden Studie mit 30 Minuten (0,5 Stunden) in den Beginn dieses Zeitfensters. Auch nach einer Meidedressur von Zebrafischen konnte die Wirksamkeit eines anti-Ependymin-Antikörpers, der eine Stunde nach Erreichen des Lernkriteriums in den tectalen Ventrikel injiziert worden war, auf die Langzeitgedächtniskonsolidierung bestätigt werden (PRADEL et al., 1999). Wie in der vorliegenden Farbunterscheidungsdressur festgestellt, hatte in jener Studie derselbe Antikörper keine Auswirkungen, wenn er übertrainierten Zebrafischen injiziert wurde, deren Langzeitgedächtnis bereits formiert war und deswegen einer Intervention nicht mehr zugänglich war. Auch ein neutraler IgG hatte keine Auswirkungen (PRADEL et al., 1999). Aus Interventionsversuchen, in denen Goldfischen eine Antisense-Oligodesoxynukleotidsonde in die perimeningeale Flüssigkeit über dem Tectum opticum injiziert worden war, schlossen die Autoren, dass insbesondere neu synthetisierte Ependyminmoleküle an der Gedächtnisbildung beteiligt seien (SCHMIDT et al., 1995). Zugleich war, wie nach den anti-Ependymin-Injektionen der vorliegenden Untersuchung, das Gedächtnis übertrainierter Tiere der Wirkung der Antisense-Oligodesoxynukleotidsonde nicht mehr zugänglich.

Die vorliegende Untersuchung macht also die Beteiligung des extrazellulären Matrixmoleküls Ependymin bei der Gedächtniskonsolidierung nach einer operanten Farbunterscheidungsdressur, einem assoziativem Lernvorgang, deutlich. Nach vorherrschender Sicht beruhen assoziative Lernvorgänge auf synaptischer Plastizität, z. B. der anwachsenden Stärke der synaptischen Transmission oder einer anwachsenden Zahl involvierter Synapsen (vgl. z. B. CAREW et al., 1981; LYNCH & BAUDRY, 1984) und Lern- und Entwicklungsvorgänge beruhen auf ähnlichen Mechanismen (REICHERT, 1990). Mit Injektionen von anti-Ependymin-Antikörpern in den tectalen Ventrikel von Goldfischen, konnten SCHMIDT und SHASHOUA (1988) eine entscheidene Rolle des Ependymins bei der Verschärfung der rezeptiven Felder während der Regeneration des durchtrennten Sehnervs nachweisen. Bei Goldfischen, deren Sehnerv durchtrennt worden war, verhinderte die Applikation von anti-Ependymin-Antikörpern 21 Tage nach Durchtrennung des Sehnervs die Verschärfung der retinotopen Karte im Tectum opticum. Dies ergaben elektrische Ableitungen. Normalerweise regeneriert der durchtrennte optische Nerv und zieht wieder in das Tectum opticum, wobei erst eine grobe retinotope Karte etabliert wird, die später feiner

wird, wobei ältere unbrauchbare Verzweigungen eliminiert werden, und brauchbare Verzweigungen und Synapsen stabilisiert werden (SCHMIDT & SHASHOUA, 1988). Auch ein gegen das HNK-Epitop gerichteter Antikörper inhibierte die Verschärfung der retinotopen Felder nach Durchtrennung des Sehnervs beim Goldfisch (SCHMIDT & SCHACHNER, 1999).

Ependymin trägt das HNK-1 Epitop (SHASHOUA et al., 1986), eine sulfatierte Glucuronsäure und verbreitete Carbohydrat-Struktur von Glykoproteinen und Glykolipiden (KRUSE et al., 1984, 1985; MCGARRY et al., 1993). Viele der neuralen Glykoproteine, die an Prozessen der Zellerkennung beteiligt sind, tragen gleichfalls diese Struktur, wie z. B. die Mitglieder der Ig-Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle NCAM, L1 und MAG, die Integrine und die Tenascine, extrazelluläre Matrixmoleküle (SCHACHNER & MARTINI, 1995). PRADEL und Mitarbeiter konnten mit Injektionen eines Antikörpers gegen das HNK-1 Epitop bzw. das Zelladhäsionsmolekül L1 die Langzeitgedächtniskonsolidierung bei Zebrafischen nach dem Erlernen einer aktiven Meidedressur blockieren (PRADEL et al., 1999, 2000). Anti-HNK-1-Antikörper blockieren nicht nur bei Fischen, sondern auch bei Säugern die Gedächtniskonsolidierung. Ein in den Hippocampus von Mäusen injizierter anti-HNK-1-Antikörper verhinderte die Gedächtniskonsolidierung nach einer Vermeidedressur (STREKALOVA et al., 2001). Da sowohl die Ependyminsequenz (LANDER et al., 2001; NIMMIRICH et al., 2001; VENTER et al., 2001), als auch ein verwandtes Protein (APOSTOLOPOULOS et al., 2001) mittlerweile bei Säugern und Menschen nachgewiesen worden ist und Ependymin in die Transkription eingreift, indem es einen Transkriptionsfaktor aktiviert (SHASHOUA et al., 2001), ergeben sich aus diesen neuen interessanten Ergebnissen weitere Ansätze, bei denen z. B. die Beteiligung des Ependymins an Gedächtnisprozessen bei Säugern untersucht werden könnte.

4.7 Ependymin-Turnover

4.7.1 ECF- und cytoplasmatische Ependymingehalte nach einer futterbelohnten Farbumterscheidungsdressur

Nach der erfolgreichen (Lerner, übertrainierte Goldfische) und erfolglosen (Nichtlerner) Durchführung der operanten futterbelohnten Farbumterscheidungsdressur, nahmen die Ependyminkonzentrationen in der ECF nicht signifikant zu und in der cytoplasmatischen

Fraktion nicht signifikant ab (Abb. 18). Der Vergleich der Ependyminkonzentrationen 5,5 Stunden nach dem Durchführen der Farbunterscheidungsdressur, mit den Ependyminkonzentrationen neun Stunden danach, ergab folgendes Bild: Die Ependyminkonzentration nahm innerhalb des oben genannten Zeitraumes in der ECF zu, wobei die Zunahme bei den Fischen aller drei Gruppen (Lerner, Nichtlerner, übertrainierte Fische) mit durchschnittlich 47 – 49 µg Ependymin/Gehirn bemerkenswert konform war. Bei Lernern führte die Zunahme extrazellulären Ependymins in der ECF neun Stunden nach der Verhaltensakquisition mit einem Wert von 136 µg/Gehirn zu einer Signifikanz gegenüber dem Kontrollwert naiver Tiere, der als der Ependymingehalt zum Zeitpunkt null der Verhaltensakquisition betrachtet werden kann. Demgegenüber war im gleichen Zeitraum nach dem Erlernen der Aufgabe in der cytoplasmatischen Fraktion eine nicht signifikante Abnahme der Ependyminkonzentration zu beobachten.

Schon frühere Studien zeigten, dass Ependymin nach der Akquisition verschiedener Trainingsaufgaben *de novo* synthetisiert und sezerniert wird (SHASHOUA, 1979; SCHMIDT, 1987, 1989; SHASHOUA & HESSE, 1989). Der Sekretion geht eine temporäre Abnahme in der Konzentration der extrazellulären Hirnflüssigkeit voraus (SCHMIDT, 1987; SHASHOUA & HESSE, 1989). Eine temporäre Abnahme des extrazellulären Ependyminpools von 8 % und 19 % bis zu vier Stunden nach der Verhaltensakquisition ließ sich nach operanter (SCHMIDT, 1987) und klassischer Konditionierung (SHASHOUA & HESSE, 1989) ermitteln. In den erwähnten Studien ergab sich eine maximal erhöhte Ependyminkonzentration in der cytoplasmatischen Fraktion fünf Stunden nach der Verhaltensakquisition, gefolgt von einer Sekretion in die ECF mit einem dortigen Maximum, neun Stunden nach der Akquisition.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie könnten auf eine leichte, aber nicht signifikante Abnahme der Ependyminkonzentration der ECF 5,5 Stunden nach Durchführung der Verhaltensdressur bei Nichtlernern und übertrainierten Fischen gegenüber den Kontrollwerten naiver Fische hindeuten. Die Werte lernender Goldfische waren zu diesem Zeitpunkt leicht, aber nicht signifikant, höher als die Kontrollwerte naiver Goldfische.

Die Zunahme der extrazellulären Ependyminkonzentrationen nach neun Stunden stimmt weitestgehend mit Ergebnissen früherer Studien überein (SCHMIDT, 1987; SHASHOUA & HESSE, 1989). Auch die leichte Abnahme der Ependyminkonzentration in der cytoplasmatischen Fraktion nach neun Stunden entspricht Ergebnissen früherer Arbeiten (SCHMIDT, 1987; SHASHOUA & HESSE, 1989). In einer Untersuchung von SCHMIDT (1987)

erreichte z. B. die Ependyminkonzentration im Cytoplasma ein Maximum 5,5 Stunden (7,6 % des Proteingehaltes) nach dem Training, blieb hoch für vier Stunden, und kehrte dann innerhalb der nächsten zehn Stunden auf Kontrollwerte zurück. In der ECF nahm der Ependymingehalt zuerst auf 88 % des Kontrollwertes ab (vier bis fünf Stunden nach dem Training) und stieg dann auf 138 % des Kontrollwertes (acht bis 14 Stunden nach Training; SCHMIDT, 1987). Jüngere Arbeiten konnten nach einer aktiven Meidedressur ein signifikantes Anwachsen der Ependymin mRNA-Expression 20 Minuten bis vier Stunden nach der Verhaltensakquisition nachweisen (ROTHER et al., 1995). Nach acht Stunden war die Expression wieder auf den Kontrollwert abgefallen. Die Autoren mutmaßen, dass die Abnahme der extrazellulären Ependyminkonzentration hier ein negatives Feedback liefere, und zwar ein Signal für die Ependymin-Transkription in den meningealen Fibroblasten, dem Synthesort des Ependymins (ROTHER et al., 1995).

Die Resultate der Ependyminkonzentrationen der ECF und cytoplasmatischen Fraktion nach der hier entwickelten Farbunterscheidungsdressur sprechen für eine Umverteilung des Ependymins nach der Durchführung der futterbelohnten Farbdressur, wobei Ependymin aus dem Cytoplasma in die ECF sezerniert wird und nach neun Stunden dort den Wert höchster Konzentration erreicht (vgl. SCHMIDT, 1987). Da der Sekretion eine temporäre Abnahme in der Ependyminkonzentration vorausgeht (SCHMIDT, 1987; SHASHOUA & HESSE, 1989), könnte auch bei der neuen Farbunterscheidungsdressur ein Teil des Ependymins während der Gedächtniskonsolidierung verbraucht werden (vgl. SCHMIDT et al., 1995), z. B. durch die Aufnahme in Neurone, welche während der Dressur aktiviert worden sind (SCHMIDT et al., 1995), oder durch die Bindung an Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Laminin (SCHMIDT et al., 1991), Kollagen (SCHWARZ et al., 1993) und an andere Ependyminmoleküle (SHASHOUA et al., 1990; SCHMIDT, 1995) oder auch durch die Polymerisation in der Nachbarschaft aktivierter Synapsen, an denen die extrazelluläre Calcium-Konzentration reduziert ist (MORRIS et al., 1986; SHASHOUA, 1988; SCHMIDT, 1989; SCHMIDT & MAKIOLA, 1991).

Immunogoldmarkierungen nach Shuttle-Box Versuchen zeigten, dass Ependymin nach dem Lernen an Glia und Typ XIV- und Typ I Neuronen des Tectum lokalisiert war (SCHMIDT et al., 1999). Ependymin war vermehrt an Synapsen und Dendriten der Typ I Neurone zu beobachten. Diese erhalten sowohl Input von den retinalen Ganglienzellen, als auch von den Marginalfasern des Torus longitudinalis, deren Funktion u. a. in der Verarbeitung von Zeitinformationen über erwartete Vorgänge liegt (MEEK, 1981).

Die Zunahme der Ependyminmenge in der ECF nach der operanten Farbungstrennung war in der vorliegenden Studie bei Fischen aller Gruppen zu erkennen, wobei der Ependymingehalt von Fischen, die die gestellte Aufgabe erfolgreich absolviert hatten, gegenüber dem naiver Tiere einen signifikanten Unterschied aufwies. SCHMIDT (1987) konnte bei Fischen, die eine operante vestibulomotorische Aufgabe absolviert hatten, eine signifikante Zunahme des Ependymins in der cytoplasmatischen Fraktion vier bis fünf Stunden nach der Verhaltensakquisition, gefolgt von einer signifikanten Zunahme in der ECF gegenüber naiven Tieren feststellen.

Die Ursache für die Zunahme des Ependymingehaltes von Fischen, die das Lernkriterium während vorliegender Arbeit nicht erfüllt hatten, könnte darin bestehen, dass diese Tiere zwar das Lernkriterium nicht erfüllt hatten, trotzdem aber ein Lernvorgang eingesetzt hatte, der zu Veränderungen in dem Ependymingehalt der ECF und der cytoplasmatischen Fraktion geführt hat. Die Veränderungen im Ependymingehalt bei übertrainierten Tieren könnten, falls sich die Rekonsolidierung als zutreffend erweist (s. 4.5.2), auf plastische Veränderungen im ZNS zurückzuführen sein, die weitestgehend denen gleichen, welche beim Lernen und bei der Langzeitgedächtniskonsolidierung ablaufen. In Einklang mit der leichten Ependyminzunahme in der ECF übertrainierter Fische der vorliegenden Studie stehen die Ergebnisse von ROTHER et al. (1995), die eine geringe Zunahme der Ependymin mRNA-Expression bei übertrainierten Tieren nach einer aktiven Meidedressur feststellten.

Die festgestellten Ependyminquantitäten in der ECF und der cytoplasmatischen Fraktion zeigten größere, in sich geschlossene Abweichungen von ehemals ermittelten Ependymingehalten (vgl. SCHMIDT & SHASHOUA, 1981; SCHMIDT, 1987; SCHMIDT & LAPP, 1987). So waren die Ependyminwerte der ECF im Mittel (hier Werte naiver Fische) um den Faktor 1,8 zu hoch, die Werte der cytoplasmatischen Fraktion im Mittel um den Faktor 2,7. Diese Differenzen blieben reproduzierbar und es konnte nicht geklärt werden, was der Grund dafür war. Zwischen-Assay-Varianzen konnten durch nochmaliges Messen von Proben in einem anderen Assay und durch das Messen von Standards in den meisten Fällen auf ein Minimum reduziert werden (vgl. TRAVIS, 1977). Als potentielle Fehlerquellen kommen im RIA mehrere Möglichkeiten in Betracht. Diese können z. B die Spezifität des eingesetzten Antikörpers betreffen (Vorhandensein hoher Kreuzreaktivität), die Trennung

der gebundenen und freien Liganden, ein anderes Fällungsreagenz, den Standard selber und die Menge der eingesetzten Röhrchen (je mehr Röhrchen, desto mehr Fehler). Weitere Möglichkeiten sind Pipettierfehler oder wiederholtes Auftauen des eingesetzten Antikörpers (Zusammenfassung möglicher Fehlerquellen bei CHARD, 1977). Eine weitere Fehlerquelle könnte in der verwendeten Methode der Proteinjodierung liegen. Diese Markierungsreaktion könnte mehrere Tyrosinreste im Protein markieren und das Antigen so verändern, dass es schlechter bindet als das unmarkierte bzw. mit einer anderen Methode (z. B. Bolton Hunter Reagenz) markierte Protein. Daher würden im RIA höhere Messwerte erhalten.

4.7.2 ECF- und cytoplasmatische Ependymingehalte nach Abkühlungsexperimenten

Die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse der Ependymingehalte der ECF und des Cytoplasmas dreier verschieden behandelte Versuchsgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede. Wie auch von der Arbeitsgruppe TANG (TANG et al., 1999) mit Kälteexperimenten an Karpfen und Zebrafischen festgestellt, konnte in der vorliegenden Studie ebenfalls keine Veränderung in der Menge des extra- und intrazellulären Ependyminproteins nach Kälteeinwirkung bei Goldfischen festgestellt werden. TANG und Mitarbeiter, die Karpfen und Zebrafische innerhalb von zwei Stunden heruntergekühlt und bis 48 Stunden danach in kühlerer Temperatur gehalten hatten, fanden aber einen großen Anstieg in der Ependymin mRNA zwischen zwölf und 24 Stunden nach dem Herrunterkühlen, sowohl bei Karpfen als auch bei Zebrafischen. Die Kälteinduktion begann dort schon nach zwei Stunden Kälteexposition.

Mit den Kälteversuchen sollten Kälte-(Temperatur)einwirkungen auf den Ependymingehalt ausgeschlossen werden, die lernspezifische Veränderungen in den Quantitäten des Ependyminproteins in den jeweiligen Fraktionen hätten maskieren können. Weiterhin sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen Stress und der Ependyminsynthese geklärt werden. Proteinmuster von Fischen können sich nach der Akklimation an neue Temperaturen verändern (KULTZ & SOMERO, 1996). Auch schnelle Temperaturänderungen wirken als Stressor (TANCK et al., 2000) und können vielfältige physiologische

Veränderungen hervorrufen, u. a. ein schnelles Ansteigen des Plasma-Cortisols durch Kälteeinwirkung (TANCK et al. 2000), ein Kälte-induziertes Anwachsen der Mitochondriendichte in der Skelett-Muskulatur (HUBLEY et al., 1997), eine Zunahme der Pro-opiomelanocortin mRNA (ARENDS et al., 1998) und Veränderungen in der Membranfluidität (HAZEL, 1984). Könnte die Heraufregulierung der Ependyminsynthese auf Stresseinwirkungen zurückgeführt werden, wären die Ergebnisse von Studien über den Zusammenhang der Ependyminsynthese und der Gedächtniskonsolidierung zumindest fragwürdig. In diesen wurden als Stressoren wirksame negative Verstärker eingesetzt (Stromreiz) (SHASHOUA & HESSE, 1989; ROTHER et al., 1995; SCHMIDT et al., 1999) oder die Fische mussten eine operante Aufgabe erfüllen, die mit Stress behaftet war (SHASHOUA & MOORE, 1978; SCHMIDT, 1987, 1989). Goldfische aber sind mit einem optimalen Temperaturbereich von 4 °C und 25 °C als eurytherm zu bezeichnen und tolerant gegenüber Temperaturveränderungen (PENZES & TÖLG, 1993), so dass bei dieser Art Toleranz gegenüber Kältestress zu erwarten ist (z. B. GANIM et al., 1998). Während der vorliegenden Untersuchung konnte keine signifikante Veränderung im Ependymingehalt durch Kälteeinwirkung festgestellt werden. Dies würde bedeuten, dass das Lernen zur Heraufregulierung der Ependyminsynthese führt und nicht der in der Dressur erfahrene Stress. Aus diesem Grund werden Kälte- und Stresseinflüsse auf die Ergebnisse der Ependymingehalte nach dem Lernen nicht weiter verfolgt.

4.8 Stresseinflüsse auf die Gedächtnisbildung

Da das zur Erforschung der Gedächtnisbildung beim Goldfisch eingesetzte Shuttle-box Training als aktive Meidedressur nicht ohne Stresseinfluss ist, wurde die vorliegende stressarme und belohnte Futterdressur entwickelt, um Stresseinflüsse zu prüfen, die die Wirkungen und Funktionen von Substrat- und Zelladhäsionsmolekülen maskieren könnten. Die Wirkungen von Stress auf die Gedächtnisbildung und das Abrufen des Gedächtnisses ist in der Literatur recht paradox diskutiert worden (vgl. RON DE KLOET et al., 1999). So wirken z. B. Stress und freigesetzte Glukocorticoide unterschiedlich auf Lern- und Gedächtnissysteme, je nachdem ob Mineralocorticoidrezeptoren oder Glukocorticoidrezeptoren aktiviert werden (RON DE KLOET et al., 1999).

Widersprüchlich sind z. B. die Ergebnisse zum Einfluss von chronischem Stress. Säuger, die Langzeitstress erleiden, zeigen Reduktionen des Hippocampusvolumens (OHL et al., 2000), eine Atrophie der Apikaldendriten hippocampaler Neurone (MAGARINOS & MCEVEN, 1995; FUCHS & FLÜGGE, 1998; FUCHS et al., 2001) und veränderte synaptische Endigungen im Hippocampus (MAGARINOS et al., 1997). Chronischer Stress wirkt sich negativ auf die Gedächtnisbildung aus und gestresste Tiere zeigen Gedächtnisdefizite, sei es durch psychosozialen Stress (FUCHS & FLÜGGE, 1998; OHL & FUCHS, 1998; OHL et al., 2000; FUCHS et al., 2001) oder durch Stress, der durch reduzierten Futterzugang verursacht wurde (CABIB et al., 1995; CABIB & CASTELLANO, 1997). Nicht nur chronischer Stress, sondern auch kurzfristiger, akuter Stress kann sich negativ auf das Abrufen des Gedächtnisses auswirken, wobei die Erinnerungsdefizite direkt mit anwachsender adrenocorticaler Funktion, das heißt der vermehrten Ausschüttung von Glukocorticoiden, korreliert sind (DE QUERVAIN et al., 1998).

Andererseits verstärkt chronischer Stress die Angstkonditionierung und erhöht die Expression von PSA und L1 (SANDI et al., 2001), und Stress erhöht die Expression von NCAM und L1 (GROOTENDORST et al., 2001). Eingesetzte Corticosteroidsynthesehemmer, wie Metyrapon und Aminoglutethimid blockieren u.a. die Langzeitgedächtnisbildung (LOSCERTALES et al., 1997). Corticosteron spielt eine wichtige Rolle bei der Gedächtniskonsolidierung (CORDERO & SANDI, 1998) und induziert die Glykoproteinsynthese (SANDI et al., 1995) und die Bildung von Kinasen im Hippocampus (TSAI et al., 2002). Allgemein spielen Stresshormone, die während emotionaler Aufmerksamkeit freigesetzt werden, eine wichtige Rolle bei der Gedächtnisbildung und resultieren im erhöhten Gedächtnis für diese Dinge (FERRY et al., 1999). Im Hippocampus findet eine komplexe Regulation von Zelladhäsionsmolekülen statt, die von der Stressorintensität abhängt (MERINO et al., 2000).

Die Aktivierung von Mineralocorticoidrezeptoren ist wichtig für die Verhaltenakquisition und den Erinnerungsvorgang, während die Aktivierung von Glukocorticoidrezeptoren für die Konsolidierung wichtig ist (RON DE KLOET et al., 1999). Das gleiche Hormon kann in verschiedenen Hirngebieten Lernen und Gedächtnis unterschiedlich modulieren. Z. B. beschleunigen Injektionen von Corticotropin Releasing Factor in den Hippocampus das Lernen, während Injektionen des gleichen Hormons in das laterale, intermediäre Septum das Lernen blockiert (RADULOVIC et al., 1999). Hippocampus und Amygdala, für Lernen und

Gedächtnis wichtige Strukturen, werden je nach Stresslevel, der auf das Tier einwirkt, verschieden aktiviert (AKIRAV et al., 2001).

Die Arbeitsgruppe LAUDIEN führte die Wirkung der Gedächtnisblockierung bei Goldfischen durch Proteinsynthesehemmer auf den Einfluss von Stress zurück (s. 4.5.1) und stellte die Beteiligung der Proteinbiosynthese an stressfreien Dressuren in Frage (LAUDIEN, 1975, 1977; SCHARPEKANT, 1979; SCHARPEKANT & LAUDIEN, 1980; LAUDIEN et al., 1986). Die hier festgestellten Befunde sprechen allerdings gegen diese Interpretation der von LAUDIEN und Mitarbeitern durchgeführten Experimente (s. 4.5.1).

Verglichen mit dem Shuttle-Box Training wird das operante Farbunterscheidungstraining als stressarm betrachtet. Deswegen dürfte bei diesem Trainingsparadigma der Stress auch keine großen Auswirkungen auf die Gedächtnisbildung haben. Goldfische, die die Verhaltensapparatur schon im Vortraining kennengelernt hatten, machten auf den Experimentator keinen gestressten Eindruck. Im Unterschied dazu schwammen Fische, die schreckhaft waren, oft keine Futterbox an und hielten sich nur in einer Ecke des Aquariums auf. Diese Tiere lernten die an sie gestellte Aufgabe im Allgemeinen nicht. Ein weiterer Stressfaktor waren die durchgeführten Injektionen. Nach dem Einbringen in das MS 222 enthaltende Wasser zeigten die Fische Anzeichen von Stress, wie beschleunigte Atembewegungen und Fluchtreflexe. Dass das Prozedere der Injektionen aber keinen Einfluss auf die Gedächtniskonsolidierung hatte, zeigten mit dem Präimmunserum injizierte Fische, die keine Erinnerungsdefizite hatten und im Test ebenso gut waren, wie nicht injizierte Tiere (Abb. 14). Auch die zur Motivierung der Fische eingesetzte Futterdeprivation war für die Goldfische als Stressor sicher nicht in dem Ausmaße erheblich, wie die in den Studien von CABIB und Mitarbeitern als Stressor eingesetzte Futterdeprivationen bei Mäusen, die solange hungerten, bis sie nur noch 75 % ihres ursprünglichen Körpergewichtes besaßen (CABIB et al., 1995; CABIB & CASTELLANO, 1997). Für die Farbunterscheidungsdressur verwendete Fische zeigten trotz zweiwöchigem Futterentzug keinen Gewichtsverlust und wurden in der Vordressur dann alle zwei Tage aus den Schläuchen gefüttert. Fütterungen, die mehrere Tage ausbleiben oder auch nur alle zwei Tage durchgeführt werden, schaden den Fischen nicht (MAYLAND, 1990).

Aus der Literatur ist bekannt, dass Stress die Expression von Zelladhäsionsmolekülen und deren Modifikation beeinflusst (MERINO et al., 2000; VENERO et al., in Vorbereitung). Vorhergehende Studien zeigten u. a., dass bei gestressten Fischen die Ependymin mRNA,

mit einem Minimum nach zwei Stunden, signifikant unter den Kontrolllevel absinkt (ROTHER et al., 1995). Es besteht die Möglichkeit, dass die Transkription der Ependyminogene von humoralen Faktoren, wie z. B. Steroidhormonen reguliert wird (SCHMIDT, 1995; SCHMIDT et al., 1995). Möglicherweise liefert das Abklingen der Stressreaktion das Signal dafür, die Ependyminsynthese über neugebildete mRNA wieder aufzunehmen (SCHMIDT, 1998). Biologisch wichtige Lernsituationen sind immer mit Stress verbunden (SCHMIDT, 1998) und die Abnahme des Stresses nach erfolgreicher Bewältigung eines Problems könnte im Organismus zur Gedächtniskonsolidierung beitragen.

4.9 Ausblicke und offene Fragen

Die für die vorliegende Studie neu entwickelte futterbelohnte, operante Farbunterscheidungsdressur bietet neben den zahlreichen mit Stress versehenen Verhaltensparadigmen die Möglichkeit, verschiedene, schon bei den oben genannten Paradigmen durchgeführte Experimente, unter stressarmen Bedingungen zu verwirklichen. Mit Hilfe von anti-Ependymin-Antikörper-Injektionen 30 Minuten nach der Verhaltensakquisition konnte die Gedächtniskonsolidierung blockiert werden. Hier stehen aber noch Experimente zu Zeitverläufen der Gedächtnisinhibition aus, wie sie vor und nach der Verhaltensakquisition einer aktiven Meidedressur von PIRONT und SCHMIDT (1988) durchgeführt wurden. Während der Experimente der vorliegenden Untersuchung wurde festgestellt, dass der Ependymingehalt der ECF neun Stunden nach der Verhaltensakquisition bei Lernern signifikant gegenüber dem naiver Kontrolltiere ansteigt und auch bei übertrainierten Tieren und Nichtlernern etwas höher war. Hier böten sich in Zukunft Untersuchungen zur Ependymintranskription und -translation nach der Farbunterscheidungsdressur an. Weiterhin könnte die Verteilung von Immunogoldmarkierten anti-Ependymin-Antikörpern an Neuronen des Tectum opticum nach der neuen Dressur untersucht werden. Wie schon von PRADEL (1998) nach einer Meidedressur bei Zebrafischen, sollte zukünftig die Expression der Zelladhäsionsmoleküle NCAM und L1, wie auch des Substratadhäsionsmoleküls Tenascin C nach operanter Dressur geprüft werden. Möglich wären auch cerebrale Injektionen mit Antikörpern gegen obige Zell- und Substratadhäsionsmoleküle nach operanter Konditionierung. Wichtig wäre zudem die Aufklärung der Einflüsse von Stress auf die Gedächtniskonsolidierung und die

Ependyminmessage. Bestimmungen des Cortisolspiegels vor und nach dem Lernen verschiedener Dressuren wären wichtige Voraussetzungen zum Verständnis der Rolle des Stresses. Wenn z. B. Fische, die die vorliegende Farbunterscheidungsdressur nicht erlernten (Nichtlerner), die gestressteren Tiere wären, müsste der gegenüber lernenden Tieren etwas geringere Ependymingehalt in der ECF dieser Tiere u. a. auch in diesem Zusammenhang betrachtet werden.

5. Zusammenfassung

Lernen ist eine adaptive Verhaltensmodifikation, durch die das Verhalten auf Grund individueller Erfahrung so verändert wird, dass es der neuen Situation besser angepasst ist. Die durch Lernprozesse bewirkten adaptiven Verhaltensänderungen tragen so zum Überleben des Individuums bei. Die Bildung eines Gedächtnisses kann in zwei Phasen unterteilt werden, in die Akquisition eines Kurzzeitgedächtnisses und die Fixierung eines Langzeitgedächtnisses. Die Überführung des Erlernten aus dem Kurzzeitgedächtnis in das Langzeitgedächtnis wird als Konsolidierung bezeichnet. Sie ist von der Proteinsynthese abhängig. Zur biochemischen und zellbiologischen Untersuchung der Gedächtnisbildung an Fischen wurden bisher vorwiegend negativ verstärkte Meidedressuren eingesetzt. Um möglichst stressarme Bedingungen zur Erforschung der Gedächtniskonsolidierung zu schaffen, wurde hier eine stressarme, futterbelohnte operante Farbunterscheidungsdressur für Goldfische entwickelt. Der Fisch muss dabei eine mit einem roten Farbsignal versehene, die Belohnung enthaltende Futterbox von drei mit grünem Signal versehenen Futterboxen unterscheiden und anschwimmen. Anders als andere Farbkombinationen brachte nur die Rotdressur, das heißt die Auswahl eines verstärkten roten Signals aus drei grünen, ein zur Erforschung der Gedächtnisbildung günstiges Verhältnis von 55 % Lernern gegenüber 45 % Nichtlernern hervor und war für die Tiere lange erinnerbar.

Mit Hilfe von in-vivo-Inhibierungen wurde die Beteiligung der Proteinbiosynthese an der Gedächtniskonsolidierung nach der Verhaltensakquisition der belohnten operanten Dressur ermittelt. Injektionen von Puromycin in den tectalen Hirnventrikel 30 Minuten nach dem Erlernen der Farbunterscheidung resultierte in einem schlechteren Gedächtnis, wenn die Fische drei Tage später getestet wurden. Puromycin blockierte also die Gedächtniskonsolidierung. Auch das Gedächtnis übertrainierter Fische wurde durch Injektionen mit Puromycin beeinflusst. Dieses Ergebnis kann evtl. in Bezug auf die Rekonsolidierungshypothese verstanden werden, welche annimmt, dass bereits konsolidierte Gedächtnisinhalte nach Abruf im "retrieval" vorübergehend störanfällig werden.

Die Bildung eines Langzeitgedächtnisses wird teilweise durch ultrastrukturelle Modifikationen synaptischer Verbindungen im ZNS vermittelt. Einige Zelladhäsionsmoleküle, deren Beteiligung an der Stabilisierung von Kontakten zwischen Zellen oder

zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix während der Ontogenese nachgewiesen wurde, sind ebenfalls an der synaptischen Plastizität nach dem Lernen beteiligt. Das Substratadhäsionsmolekül Ependymin unterstützt die Zell-Substrat-Adhäsion und die Steuerung neuronaler Wachstumskegel *in vitro*. Es ist außerdem beim Goldfisch an der retinotectalen Regeneration nach Läsionen des optischen Nerven *in situ* beteiligt. Mit Hilfe von Injektionen eines anti-Ependymin-Antikörpers in den IV. Hirnventrikel sollte die Beteiligung von Ependymin an der Gedächtniskonsolidierung untersucht werden. Injektionen 30 Minuten nach der Verhaltensakquisition führten zu einer Verschlechterung des Gedächtnisses im Test. Übertrainierte Fische, denen der Antikörper appliziert worden war, wiesen ein normales Erinnerungsvermögen auf. Mit Hilfe eines Radioimmunoassays (RIA) wurde der Ependymin Gehalt der extrazellulären Flüssigkeit (ECF) und der cytoplasmatischen Fraktion des Goldfischgehirns 5,5 und neun Stunden nach der Verhaltensakquisition untersucht. 5,5 Stunden nach der Verhaltensakquisition war der Ependymin Gehalt der ECF von Lernern geringfügig, nach neun Stunden war er signifikant höher als derjenige naiver Fische. In der cytoplasmatischen Fraktion sank der Ependymin Gehalt nach neun Stunden, verglichen mit dem nach 5,5 Stunden, leicht ab, was für eine Umverteilung des Ependymins vom Cytoplasma in die ECF neun Stunden nach der Verhaltensakquisition spricht.

Mittels der [¹⁴C]-2-Desoxyglukosetechnik wurden verschiedene Gehirnregionen auf ihre Stoffwechselaktivität während der appetitiven Farbunterscheidungsdressur untersucht. Mittels quantitativer Szintigraphie konnte ein signifikant erhöhter Energieverbrauch im Tectum opticum von Fischen, die die Farbunterscheidungsdressur erlernt hatten, festgestellt werden. Fische, welche die Aufgabe nicht erlernten, zeigten dagegen nur geringfügige Stoffwechselveränderungen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine Abhängigkeit der Gedächtniskonsolidierung von der Proteinbiosynthese, auch nach dem Erlernen einer stressarmen Belohnungsdressur. Wie schon bei einer aktiven Meidedressur an Zebrafischen festgestellt, weisen die Ergebnisse auf eine Funktion des Tectum opticum bei assoziativen Lernvorgängen beim Goldfisch hin. Auch eine Beteiligung des extrazellulären Matrixproteins Ependymin an der Gedächtniskonsolidierung nach operanter Farbunterscheidungsdressur konnte nachgewiesen werden.

6. Literatur

ABEL, T. & K. M. LATTAL (2001): Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr. Op. Neurobiol.* 11: 180-187.

ADAMS, D. S. & V. E. SHASHOUA (1994): Cloning and sequencing the genes encoding goldfish and carp ependymin. *Gene* 141: 237-241.

AGRANOFF, B. W. & P. D. KLINGER (1964): Puromycin effect on memory fixation in the goldfish. *Science* 146: 952-953.

AGRANOFF, B. W., R. E. DAVIS & J. J. BRINK (1965): Memory fixation in the goldfish. *PNAS* 54: 788-793.

AGRANOFF, B. W., R. E. DAVIS, L. CASOLA & R. LIM (1967): Actinomycin D blocks formation of memory of shock-avoidance in goldfish. *Science* 158: 1600-1601.

AGRANOFF, B. W., C. W. COTMAN & M. D. UHLER (1999): Learning and memory.. In: SIEGEL, G. J., B. W. AGRANOFF, R. W. ALBERS, S. K. FISHER & M. D. UHLER (Eds): *Basic neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects*, pp. 1027-1052. 6th edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, New York.

AKIRAV, I., C. SANDI & G. RICHTER-LEVIN (2001): Differential activation of hippocampus and amygdala following spatial learning under stress. *Eur. J. Neurosci.* 14: 719-725.

ALBERT, J. S., N. YAMAMOTO, M. YOSHIMOTO, N. SAWAI & H. ITO (1999): Visual thalamotelencephalic pathways in the sturgeon *Acipenser*, a non-teleost actinopterygian fish. *Brain Behav. Evol.* 53: 156-172.

ALCOCK, J. (1993): *Animal behavior. An evolutionary approach*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.

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

ARAMI, S., M. JUCKER, M. SCHACHNER & H. WELZL (1996): The effect of continuous intraventricular infusion of L1 and NCAM antibodies on spatial learning in rats. *Behav. Brain Res.* 81: 81-87.

ARENDS, R. J., R. VAN DER GAAG, G. J. MARTENS, S. E. WENDELAAR BONGA & G. FLIK (1998): Differential expression of two pro-opiomelanocortin mRNAs during temperature stress in common carp (*Cyprinus carpio*). *J. Endocrinol.* 159: 85-91.

BAILEY, C. H. & E. R. KANDEL (1993): Structural changes accompanying memory storage. *Ann. Rev. Physiol.* 55: 397-426.

BAILEY, C. H., D. BARTSCH & E. R. KANDEL (1996): Toward a molecular definition of long-term memory storage. *PNAS* 93: 13445-13452

BALDWIN, A. E., M. R. HOLAHAN, K. SADEGHIAN & A. E. KELLEY (2000): N-methyl-D-aspartate receptor-dependent plasticity within a distributed corticostriatal network mediates appetitive instrumental learning. *Behav. Neurosci.* 114: 84-98.

BEAUCHAMP, R. D. & J. S. ROWE (1977): Goldfish spectral sensitivity: a conditioned heart rate measure in restrained or curarized fish. *Vision Res.* 17: 617-624.

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

BERTAINA, V. & C. DESTRADE (1995): Differential time courses of c-fos mRNA expression in hippocampal subfields following acquisition and recall testing in mice. *Brain Res. Cogn. Brain Res.* 2: 269-275.

BERTAINA-ANGLADE, V., G. TRAMU & C. DESTRADE (2000): Differential learning-stage dependent patterns of c-Fos protein expression in brain regions during the acquisition and memory consolidation of operant task in mice. *Eur. J. Neurosci.* 12: 3803-3812.

BLISS, T. (2000): Die physiologischen Grundlagen des Gedächtnisses. In: ROSE, S. P. R. (Hrs.): *Gehirn, Gedächtnis und Bewußtsein. Eine Reise zum Mittelpunkt des Menschseins* (Deutsche Ausgabe), pp. 108-133. Lübbe, Bergisch Gladbach.

BLISS, T. & G. L. COLLINGRIDGE (1993): A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39.

BODZNICK, D. (1990): Elasmobranch vision: multimodal integration in the brain. *J. Exp. Zool. Suppl.* 5: 108-116.

BONE, Q. & N. B. MARSHALL (1985): *Biologie der Fische*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

BURKA, E. R., S. K. BALLAS & S. M. SABESIN (1975): Toxic effects of puromycin on erythrocyte membranes which is unrelated to inhibition of proteinsynthesis. *Blood* 45: 21-27.

BUTLER, A. B. (2000): Topography and topology of the teleost telencephalon: a paradox resolved. *Neurosci. Lett.* 293: 95-98.

CABIB, S. & C. CASTELLANO (1997): Impairments produced by amphetamine and stress on memory storage are reduced following a chronic stressful experience. *Psychopharmacol.* 129: 161-167.

CABIB, S., A. ZOCCHI & S. PUGLISI-ALLEGRA (1995): A comparison of the behavioral effects of minaprine, amphetamine and stress. *Psychopharmacology* 121: 73-80.

CAREW, T. J., E. T. WALTERS & E. R. KANDEL (1981): Associative learning in *Aplysia*: cellular correlates supporting a conditioned fear hypothesis. *Science* 211: 501-504.

CHARD, T. (1977): *An introduction to radioimmunoassays and related techniques*.

CLAAS, B. (1994): Removal of eyes in early larval stages alters response of the clawed toad, *Xenopus laevis*, to surface waves. *Physiol. Behav.* 56: 423-428.

CLAYTON, D. F. (2000): The genomic action potential. *Neurobiol. Learn. Mem.* 74: 185-216.

COHEN, D. H., T. A. DUFF & S. O. E. EBBESSON (1973): Electrophysiological identification of a visual area in shark telencephalon. *Science* 182. 492-494.:

CORDERO, M. I. & C. SANDI (1998): A role for brain glucocorticoid receptors in contextual fear conditioning: dependence upon training intensity. *Brain Res.* 786: 11-17.

CORREA, S. A. L., K. GRANT & A. HOFFMANN (1998): Afferent and efferent connections of the dorsoventral telencephalon in an electrosensory teleost, *Gymnotus carapo*. *Brain Behav. Evol.* 52: 81-98.

DAVIS, R. E. & L. R. SQUIRE (1984): Protein synthesis and memory: a review. *Psychol. Bull.* 96: 518-559.

DE QUERVAIN, D. J.-F., B. ROOZENDAAL & J. L. MCGAUGH (1998): Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394: 787-791.

DEZAZZO, J. & T. TULLY (1995): Dissection of memory formation: from behavioral pharmacology to molecular genetics. *TINS* 18: 212-218.

DOUGLAS, R. H. (1996): Goldfish use visual angle of a familiar landmark to locate a food source. *J. Fish Biol.* 49: 532-536.

DOUGLAS, R. H. & C. W. HAWRYSHYN (1990): Behavioural studies of fish vision: an analysis of visual capabilities. In: DOUGLAS, R. H. & M. B. A. DJAMGOZ (Eds.): *The visual system of fish*, pp. 373-418. Chapman and Hall, Cambridge.

DUDAI, Y. (1996): Consolidation: fragility on the road to the engram. *Neuron* 17: 367-370.

DUDEL, J., R. MENZEL & R. F. SCHMIDT (Hrsg.) (1996): *Neurowissenschaft. Vom Molekül zur Kognition*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg und New York.

EBBESSON, S. O. E. & H. VANEGAS (1976): Projections of the optic tectum in two teleost species. *J. Comp. Neurol.* 165: 161-180.

ELOFSSON, U. O., I. MAYER, B. DAMSGARD & S. WINBERG (2000): Intermale competition in sexually mature arctic charr: effects on brain monoamines, endocrine stress responses, sex hormone levels, and behavior. *Gen. Comp. Endocrinol.* 118: 450-460.

FERRY, B., B. ROOZENDAAL & J. L. MCGAUGH (1999): Role of norepinephrine in mediating stress hormone regulation of long-term memory storage: A critical involvement of the amygdala. *Biol. Psychiatry* 46: 1140-1152.

FIELDS, R. D. & K. ITOH (1996): Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *TINS* 19: 473-480.

FINGER, T. E. (1983): The gustatory system in teleost fish. In: NORTHUTT, R. G. & R. E. DAVIS (Eds.): *Fish neurobiology*, pp. 285-309. University of Michigan Press, Ann Arbor.

FLEXNER, J. B., L. B. FLEXNER & E. STELLAR (1963): Memory in mice as affected by intracerebral puromycin. *Science* 141: 57-59.

FRAKER, P. J. & J. C. SPECK (1978): Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenylglycouril. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 80: 849-857.

FRANCK, D. (1985): *Verhaltensbiologie. Einführung in die Ethologie.* Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

FUCHS, E & G. FLÜGGE (1998): Stress, glucocorticoids and structural plasticity of the hippocampus. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23: 295-300.

FUCHS, E., G. FLÜGGE, F. OHL, P. LUCASSEN, G. K. VOLLMANN-HONSDORF & T. MICHAELIS (2001): Psychosocial stress, glucocorticoids, and structural alterations in tree shrew hippocampus. *Physiol. Behav.* 73: 285-291.

GANIM, R. B., E. L. PECKOL, J. LARKIN, M. L. RUCHHOEFT & J. S. CAMERON (1998): ATP-sensitive K⁺ channels in cardiac muscle from cold-acclimated goldfish: characterization and altered response to ATP. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 119: 395-401.

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

GARCIA, J., W. G. HANKINS & K. W. RUSINIAK (1974): Behavioral regulation of the milieu interne in man and rat. *Science* 185: 824-831.

GIBBS, M. A. & D. P. M. NORTHMORE (1998): Spectral sensitivity of the goldfish torus longitudinalis. *Vis. Neurosci.* 15: 859-865.

GLAGOW, M. & J.-P. EWERT (1999): Apomorphine alters prey-catching patterns in the common toad: behavioral experiments and [¹⁴C]-deoxyglucose brain mapping studies. *Brain Behav. Evol.* 54: 223-242.

GOELET, P., V. F. CASTELUCCI, S. SCHACHNER & E. R. KANDEL (1986): The long and the short of long-term memory - a molecular framework. *Nature* 322: 419-422.

GREENBERG, M. E., E. B. ZIFF & L. A. GREEN (1986): Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science* 234: 80-83.

GREGORIO-KING, C. C., J. L. MCLEOD, F. MCL. COLLIER, G. R. COLLIER, K. A. BOLTON, G. J. VAN DER MEER, J. APOSTOLOPOULUS & M. A. KIRKLAND (2002): MERP1: a mammalian ependymin-related protein gene differentially expressed in hematopoietic cells. *Gene* 286: 249-257.

GROOTENDORST, J., M. S. OITZL, S. DALM, L. ENTHOVEN, M. SCHACHNER, E. R. DE KLOET & C. SANDI (2001): Stress alleviates reduced expression of cell adhesion molecules (NCAM, L1), and deficits in learning and corticosterone regulation of apolipoprotein E knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 14: 1505-1514.

GROTEWIEL, M. S., C. D. O. BECK, K. H. WU, X.-R. ZHU & R. L. DAVIS (1998): Integrin-mediated short-term memory in drosophila. *Nature* 391: 455-460.

GUZOWSKI, J. F. & J. L. MCGAUGH (1997): Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. *PNAS* 94: 2693-2698.

HAWRYSHYN, C. W. & R. BEAUCHAMP (1985): Ultraviolet photosensitivity in goldfish: an independent UV retinal mechanism. *Vision Res.* 25: 11-20.

HAWRYSHYN, C. W. & W. N. MCFARLAND (1987): Cone photoreceptor mechanisms and the detection of polarized light in fish. *J. Comp. Physiol. A* 160: 459-465.

HAZEL, J. R. (1984): Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. *Am. J. Physiol.* 246: 460-470.

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

HINDE, R. A. (1973): *Das Verhalten der Tiere*. Suhrkamp Verlag, Frankfurt a. Main.

HISATOMI, O., T. SATOH, L. K. BARTHEL, D. L. STENKAMP, P. A. RAYMOND & F. TOKUNAGA (1996): Molecular cloning and characterisation of the putative ultraviolet-sensitive visual pigment of goldfish. *Vision Res.* 36: 933-939.

HORNER, J. L., N. LONGO & M. E. BITTERMAN (1961): A shuttle box for fish and a control circuit of general applicability. *Am. J. Psychol.* 74: 114-120.

HUBLEY, M. J., B. R. LOCKE & T. S. MOERLAND (1997): Reaction-diffusion analysis of the effects of temperature on high-energy phosphate dynamics in goldfish skeletal muscle. *J. Exp. Biol.* 200: 975-88.

HYDE, P. S. & E. I. KNUDSEN (2002): The optic tectum controls visually guided adaptive plasticity in the owl's auditory space map. *Nature* 415: 73-76.

INGLE, D. J. (1965): Interocular transfer in goldfish. Color easier than pattern. *Science* 149: 1000-1002.

ITO, H., M. YOSHIMOTO, J. S. ALBERT, N. YAMAMOTO & N. SAWAI (1999): Retinal projections and retinal ganglion cell distribution patterns in a sturgeon (*Acipenser transmontanus*), a non-teleost actinopterygian fish. *Brain Behav. Evol.* 53: 127-141.

JAKOBSEN, M. & R. M. GAZE (1964): Types of visual response from single units in the optic tectum and optic nerve of the goldfish. *Q. J. Exp. Physiol.* 49:199-209.

JOHANSSON, D., G. E. NILSSON & K. B. DØVING (1997): Anoxic depression of light-evoked potentials in retina and optic tectum of crucian carp. *Neurosci. Lett.* 237: 73-76.

KAGEYAMA, G. H. & R. L. MEYER (1987): Immunohistochemical localisation of GABA, CHAT, glutamate and aspartate in the visual system of goldfish and mice. *Soc. Neurosci. Abstr.* 13: 860.

KAISER, R. & G. GOTTSCHALK (1972): *Elementare Tests zur Beurteilung von Meßdaten.* B. I.-Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien und Zürich.

KÁLMÁN, M. (1998): Astroglial architecture of the carp (*Cyprinus carpio*) brain as revealed by immunohistochemical staining against glial fibrillary acidic protein (GFAP). *Anat. Embryol.* 198: 409-433.

KARDONG, K. V. & H. BERKHOUDT (1999): Rattlesnake hunting behavior: correlations between plasticity of predatory performance and neuroanatomy. *Brain Behav. Evol.* 53: 20-28.

KIRSCH, J. A., M. H. HOFMANN, J. MOGDANS & H. BLECKMANN (2002): Responses of diencephalic neurons to sensory stimulation in the goldfish, *Carassius auratus*. *Brain Res. Bull.* 57: 419-421.

KLAR, M. & K.-P. HOFFMANN (2002): Visual direction-selective neurons in the pretectum of the rainbow trout. *Brain Res. Bull.* 57: 431-433.

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

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

KOTRSCHAL, K. M. J., R. BRANDSTÄTTER, A. GOMAHN, H. JUNGER, M. PALZENBERGER & M. ZAUNREITER (1991): Brain and sensory systems. In: WINFIELD, I. J. & J. S. NELSON (Eds.): *Cyprinid fishes. Systematics, biology and exploitation*, pp. 284-331. Chapman and Hall,

KOTRSCHAL, K. M. J., VAN STRAADEN & R. HUBER (1998): Fish brains: evolution and environmental relationships. *Rev. Fish Biol. Fisheries* 8: 373-408.

KRUSE, J., R. MAILHAMMER, H. WERNECKE, A. FAISSNER, I. SOMMER, C. GORIDIS & M. SCHACHNER (1984): Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1. *Nature* 311: 152-155.

KRUSE, J., G. KEILHAUER, A. FAISSNER, R. TIMPL & M. SCHACHNER (1985): The J1 glycoprotein – a novel nervous system cell adhesion molecule of the L2/HNK-1 family. *Nature* 316: 146-148.

KULTZ, D. & G. N. SOMERO (1996): Differences in protein patterns of gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis* after osmotic and thermal acclimation. *J. Comp. Physiol. B* 166: 88-100.

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

LAMB, C. F. & T. E. FINGER (1995): Gustatory control of feeding behavior in goldfish. *Physiol. Behav.* 57: 483-488.

LAMPRECHT, J. (1992): *Biologische Forschung: Von der Planung bis zur Publikation*. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.

LANDER, E. S. et al. (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.

LAUDIEN, H. (1975): Über die Wirkung der Protein-Biosynthese auf Aktivität und Lernverhalten beim Goldfisch (*Carassius auratus auratus* L.). Z. Tierpsychol. 38: 436-443.

LAUDIEN, H. (1977): Langzeitgedächtnis und Proteinsynthese. Versuche mit Goldfischen (*Carassius auratus auratus* L.). Zool. Anz. Jena 199: 19-28.

LAUDIEN, H., J. FREYER, R. ERB & D. DENZER (1986): Influence of isolation stress and inhibited protein biosynthesis on learning and memory in goldfish. Physiol. Behav. 38: 621-628.

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

LIENERT, G. A. (1973): Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik. Bd. I, Anton Hain Verlag, Meisenheim am Glan.

LITVIN, O. O. & K. V. ANOKHIN (2000): Mechanisms of memory reorganisation during retrieval of acquired behavioral experience in chicks: the effects of protein synthesis inhibition in the brain. Neurosci. Behav. Physiol. 30: 671-678.

LOPEZ, J. C., C. BROGLIO, F. RODRIGUEZ, C. THINUS-BLANC & C. SALAS (1999): Multiple spatial learning strategies in goldfish (*Carassius auratus*). Anim. Cogn. 2: 109-120.

LOPEZ, J. C., V. P. BINGMAN, F. RODRIGUEZ, Y. GOMEZ & C. SALAS (2000 a): Dissociation of place and cue learning by telencephalic ablation in goldfish. Behav. Neurosci. 114: 687-699.

LOPEZ, J. C., C. BROGLIO, F. RODRIGUEZ, C. THINUS-BLANC & C. SALAS (2000 b): Reversal learning deficit in a spatial task but not in a cued one after telencephalic ablation in goldfish. Behav. Brain Res. 109: 91-98.

LORENZ, K. (1969): Innate basis of learning. In: PRIBRAM, H. (Ed.): On the biology of learning. Harcourt, New York.

LORENZ, K. (1973): Die Rückseite des Spiegels. Versuch einer Naturgeschichte menschlichen Erkennens. Piper Verlag, München.

LOSCERTALES, M., S.P. R. ROSE & C. SANDI (1997): The corticosteroid synthesis inhibitors metapyrone and amoinoglutethimide impair long-term memory for a passive avoidance task in day-old chicks. *Brain Res.* 796: 357-361.

LOTTSPPEICH, F. & H. ZORBAS (1998): Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 19: 265-275.

LYNCH, G. & M. BAUDRY (1984): The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. *Science* 8: 1057-1063.

LYONS-WEILER, J. & G. A. HOELZER (1997): Escaping from the felsenstein zone by detecting long branches in phylogenetic data. *Mol. Phylogen. Evol.* 8: 375-384.

MAGARINOS, A. M. & B. S. MCEVEN (1995): Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience* 69: 89-98.

MAGARINOS, A. M., J. M. GARCIA-VERDUGO & B. S. MCEVEN (1997): Chronic stress alters synaptic terminal structure in the hippocampus. *PNAS* 94: 14002-14008.

MANABE, T., H. TOGASHI, N. UCHIDA, S. C. SUZUKI, Y. HAYAKAWA, M. YAMAMOTO, H. YODA, T. MIYAKAWA, M. TAKEICHI & O. CHISAKA (2000): Loss of cadherin-11 adhesion receptor enhances plastic changes in hippocampal synapses and modifies behavioral responses. *Mol. Cell. Neurosci.* 15: 534-546.

MANSUY, I. M., D. G. WINDER, T. M. MOALLEM, M. OSMAN, M. MAYFORD, R. D. HAWKINS & E. R. KANDEL (1998): Inducible and reversible gene expression with the rtTA system for the study of memory. *Neuron* 21: 257-265.

MATTIOLI, R., E. M. SANTANGELO, A. C. C. COSTA & L. VASCONCELOS (1997): Substance P facilitates memory in goldfish in an appetitively motivated learning task. *Behav. Brain Res.* 85: 117-120.

MAYLAND, H. J. (1990): Süßwasseraquarium. Falken-Verlag, Niedernhausen.

McFARLAND, D. (1989): *Biologie des Verhaltens. Evolution, Physiologie, Psychologie.* VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

MCGARRY, R. C., S. L. HELFAND, R. H. QUARLES & J. C. RODER (1983): Recognition of myelin-associated glycoprotein by the monoclonal antibody HNK-1. *Nature* 306: 376-378.

MCGAUGH, J. L. (2000): Memory-a century of consolidation. *Science* 287: 248-251.

MEEK, J. (1981): A golgi-electron microscopic study of goldfish optic tectum. I. Description of afferents, cell types, and synapses. *J. Comp. Neurol.* 199: 149-173.

MEEK, J. (1981): A golgi-electron microscopic study of goldfish optic tectum. II. Quantitative aspects of synaptic organization. *J. Comp. Neurol.* 199: 175-190.

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. Rev.* 6: 247-297.

MEEK, J. (1990): Tectal morphology: connections, neurones and synapses. In: DOUGLAS, R. H. & M. B. A. DJAMGOZ (Eds.): *The visual system of fish*, pp. 239-277. Chapman and Hall, Cambridge.

MERINO, J.J., M. I. CORDERO & C. SANDI (2000): Regulation of hippocampal cell adhesion molecules NCAM and L1 by contextual fear conditioning is dependent upon time and stressor intensity. *Eur. J. Neurosci.* 12: 3283-3290.

MILBRANDT, J. (1987): A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science* 238: 797-799.

MISANIN, J. R., R. R. MILLER & D. J. LEWIS (1968): Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of consolidated memory trace. *Science* 160: 554-555.

MORITA, Y. & T. E. FINGER (1985): Topographic and laminar organization of the vagal gustatory system in the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Comp. Neurol.* 238: 187-201.

MORRIS, M. E., N. ROBERT & V. E. SHASHOUA (1986): Stimulus evoked changes in extracellular calcium in optic tectum of the goldfish: possible role in neuroplasticity. *Ann. NY Acad. Sci.* 481: 375-377.

MÜLLER-SCHMID, A., H. RINDER, F. LOTTSPEICH, E. M. GERTZEN & W. HOFFMANN (1992): Ependymins from the cerebrospinal fluid of salmonid fish: gene structure and molecular characterization. *Gene* 118: 189-196.

MÜLLER-SCHMID, A., B. GANß, T. GORR & W. HOFFMANN (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.

MUNTZ, W. R. A. & J. R. CRONLY-DILLON (1966): Colour discrimination in goldfish. *Anim. Behav.* 14: 351-355.

MURRAY, M. (1982): A quantitative study of the reinnervation of the goldfish optic tectum following optic nerve crush. *J. Comp. Neurol.* 209: 352-362.

NADER, K., G. E. SCHAFE & J. E. LE DOUX (2000): Fear memory requires protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406: 722-726.

NEALE, J. H., P. D. KLINGER & B. W. AGRANOFF (1973): Camptothecin blocks memory of conditioned avoidance in the goldfish. *Science* 179: 1243-1246.

NEUMEYER, C. (1985): An ultraviolet receptor as a fourth receptor type in goldfish colour vision. *Naturwissenschaften* 72: 162-163.

NEUMEYER, C. (1988): Das Farbsehen des Goldfisches. Thieme Verlag Stuttgart, New York.

NIMMICH, I., S. ERDMANN, U. MELCHERS, S. CHTARBOVA, U. FINKE, S. HENTSCH, I. HOFFMANN, M. OERTEL, W. HOFFMANN & O. MÜLLER (2001): The novel ependymin related gene UCC1 is highly expressed in colorectal tumor cells. *Cancer Lett.* 165: 71-79.

ODA, Y., K. KAWASAKI, M. MORITA, H. KORN & H. MATSUI (1998): Inhibitory long-term potentiation underlies auditory conditioning of goldfish escape behaviour. *Nature* 394: 182-185.

OHL, F. & E. FUCHS (1998): Memory performance in tree shrews: effects of stressful experiences. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23: 319-323.

OHL, F., T. MICHAELIS, G. K. VOLLMANN-HONSDORF, C. KIRSCHBAUM & E. FUCHS (2000): Effect of chronic psychosocial stress and long-term cortisol treatment on hippocampus-mediated memory and hippocampal volume: a pilot-study in tree shrews. *Psychoendocrinol.* 25: 357-363.

ONISHI, K. (1989): Telencephalic function implicated in food-reinforced color discrimination learning in the goldfish. *Physiol. Behav.* 46: 707-712.

ONISHI, K. (1997): Effects of telencephalic ablation on short-term memory and attention in goldfish. *Behav. Brain Res.* 86: 191-199.

ORTI, G. & A. MEYER (1996): Molecular evolution of ependymin and the phylogenetic resolution of early divergences among euteleost fishes. *Mol. Biol. Evol.* 13: 556-573.

OVERLI, O., T. G. POTTINGER, T. R. CARRICK, E. OVERLI & S. WINBERG (2001): Brain monoaminergic activity in rainbow trout selected for high and low stress responsiveness. *Brain Behav. Evol.* 57: 214-224.

OVERLI, O., T. G. POTTINGER, T. R. CARRICK, E. OVERLI & S. WINBERG (2002): Differences in behaviour between trout selected for high- and low-stress responsiveness. *J. Exp. Biol.* 205: 391-395.

OVERMIER, J. B. & R. L. PATTON (1982): Teleost telencephalon and memory for delayed reinforcers. *Physiol. Psychol.* 10: 74-78.

PATEL, S. N., N. S. CLAYTON & J. R. KREBS (1997): Spatial learning induces neurogenesis in the avian brain. *Behav. Brain Res.* 89: 115-128

PAWLOW, I. P. (1927): *Conditioned reflexes*. Oxford University Press, Oxford.

PAWLOW, I. P. (1928): *Lectures on conditioned reflexes*. New York.

PENCES, B. & I. TÖLG (1993): *Goldfische und Kois*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.

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

PLACHTA, D., J. MOGDANS & H. BLECKMANN (1999): Responses of midbrain lateral line units of the goldfish, *Carassius auratus*, to constant-amplitude and amplitude-modulated water wave stimuli. *J. Comp. Physiol. A* 185: 405-417.

PLATENIK, J., N. KURAMOTO & Y. YONEDA (2000): Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life Sci.* 67: 335-364.

POTTINGER, T. G., W. E. YEOMANS & T. R. CARRICK (1999): Plasma cortisol and 17 β -oestradiol levels in roach exposed to acute and chronic stress. *J. Fish Biol.* 54: 525-532.

PRADEL, G. (1998): *Neurale Zelladhäsionsmoleküle bei der Gedächtnisbildung nach einer Meidekonditionierung im Zebrabärbling*. Dissertation im Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt.

PRADEL, G., R. SCHMIDT & M. SCHACHNER (1997): Metabolic changes in the optic tectum of the zebrafish brain analysed by [14 C]-2-deoxyglucose after active avoidance conditioning. In: ELSNER, N. & H. WÄSSLE (Eds.): *Neurobiology: from membrane to mind*, p. 653. Thieme Verlag, Stuttgart.

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

PRADEL, G., R. SCHMIDT & M. SCHACHNER (2000): Involvement of L 1.1 in memory consolidation after active avoidance conditioning in zebrafish. *J. Neurobiol.* 43: 389-403.

PRECHTL, J. C., G. VON DER EMDE, J. WOLFART, S. KARAMÜRSEL, G. N. AKOEV, Y. N. ANDRIANOV & T. H. BULLOCK (1998): Sensory processing in the pallium of a mormyrid fish. *J. Neurosci.* 18: 7381-7393.

PRZYBYSLAWSKI, J., P. & S. J. SARA (1997): Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav. Brain Res.* 84: 241-246.

QUATERMAIN, D. & B. S. MCEVEN (1970): Temporal characteristics of amnesia induced by protein synthesis inhibitor: determination by shock level. *Nature* 228: 677-678.

RADULOVIC, J., A. RÜHMANN, T. LIEPOLD & J. SPIESS (1999): Modulation of learning and anxiety by corticotropin-releasing factor (CRF) and stress: differential roles of CRF receptors 1 and 2. *J. Neurosci.* 19: 5016-5025.

RAND-WEAVER, M., T. G. POTTINGER & J. P. SUMPTER (1993): Plasma somatolactin concentrations in salmonid fish are elevated by stress. *J. Endocrinol.* 138: 509-515.

REICHERT, H. (1990): *Neurobiologie*. Thieme Verlag, Stuttgart.

RIEHL, R. & H. A. BAENSCH (1996): *Aquarien Atlas Bd. 3, 4. Auflage*. Mergus Verlag, Melle.

RINDER, H., T. H. BAYER, E.-M. GERTZEN & W. HOFFMANN (1992): Molecular analysis of the ependymin gene and functional test of its promotor region by transient expression in *Brachydanio rerio*. *DNA Cell. Biol.* 11: 425-432.

RODRIGUEZ, F., J. C. LOPEZ, J. P. VARGAS, C. BROGLIO, Y. GOMEZ & C. SALAS (2002): Spatial memory and hippocampal pallium through vertebrate evolution: insights from reptiles and teleost fish. *Brain Res. Bull.* 57: 499-503.

RODRIGUEZ-MOLDES, I., P. MOLIST, F. ADRIO, M. A. POMBAL, S. E. PÉREZ, J. YANEZ, M. MANDADO, O. MARIN, J. M. LOPEZ, A. GONZALEZ & R. ANADÓN (2002): Organisation of cholinergic systems in the brain of different fish groups: a comparative analysis. *Brain Res. Bull.* 57: 331-334.

RØNN, L. C. B., B. P. HARTZ & E. BOCK (1998): The neural cell adhesion molecule (NCAM) in development and plasticity of the nervous system. *Experimental Gerontology* 33: 853-864.

RØNN, L. C. B., V. BEREZIN & E. BOCK (2000): The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing. *Int. J. Dev. Neurosci.* 18: 193-199.

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

ROSE, S. P. R. (1995 a): Glycoproteins and memory formation. *Behavioural Brain Research* 66: 73-78.

ROSE, S. P. R. (1995 b): Cell-adhesion molecules, glucocorticoids and long-term-memory formation. *Trends in Neuroscience* 18: 502-506.

ROTH, G. & M. F. WULLIMANN (1996): Evolution der Nervensysteme und der Sinnesorgane. In: DUDEL, J., R. MENZEL & R. F. SCHMIDT (Eds.): *Neurowissenschaft. Vom Molekül zur Kognition*, pp. 1-31. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg und New York.

ROTHER, S., R. SCHMIDT, W. BRYSCH & K.-H. SCHLINGENSIEPEN (1990): Synthesis and ultrastructural distribution of ependymins in goldfish brain analysed by in situ hybridization and immunogold labelling. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 371: 1031.

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

ROTTLAND, J. & L. TORT (1997): Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. *J. Fish Biol.* 51: 21-28.

SAIDEL, W. M., K. MARQUEZ-HOUSTON & A. B. BUTLER (2001): Identification of visuel pallial telencephalon in the goldfish, *Carassius auratus*: a combined cytochrome oxidase and electrophysiological study. *Brain Res.* 919: 82-93.

SALAS, C., C. BROGLIO, F. RODRIGUEZ, J. C. LOPEZ, M. PORTAVELLA & B. TORRES (1996): Telencephalic ablation in goldfish impairs performance in a spatial constancy problem but not in a cued one. *Behav. Brain Res.* 79: 193-200.

SALAS, C., L. HERRERO, F. RODRIGUEZ & B. TORRES (1997): Tectal codification of eye movements in goldfish studied by electrical microstimulation. *Neuroscience* 78: 271-288.

SANDI, C., S. P. R. ROSE, R. MILEUSNIC & C. LANCASHIRE (1995): Corticosterone facilitates long-term memory formation via enhanced glycoprotien synthesis. *Neurosci.* 69: 1087-1093.

SANDI, C., J. J. MERINO, M. I. CORDERO, K. TOUYAROT & C. VENERO (2001): Effects of chronic stress on contextual fear conditioning and hippocampal expression of the neural cell adhesion molecule, its polysialylation, and L1. *Neurosci.* 102: 329-339.

SARA, S. J. (2000): Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn. Mem.* 7: 73-84.

SARA, S. J., P. ROULLET & J. PRZYBYSLAWSKI (1999): Consolidation of memory for odor-reward association: β -adrenergic receptor involvement in the late phase. *Learn. Mem.* 6: 88-96.

SAVAGE, G. E. (1968): Temporal factors in avoidance learning in normal and forebrainless goldfish (*Carassius auratus*). *Nature* 218: 1168-1169.

SCHACHNER, M. (1997): Neural recognition molecules and synaptic plasticity. *Curr. Op. Cell Biol.* 9: 627-634.

SCHACHNER, M. & R. MARTINI (1995): Glycans and the modulation of neural-recognition molecule function. *TINS* 18: 183-191.

SCHARPEKANT, S. (1979): Über den Einfluß von Inhibitoren der Proteinbiosynthese auf Negativ- und Positivdrücken beim Goldfisch. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

SCHARPEKANT, S. & H. LAUDIEN (1980): Einfluß gehemmter Proteinbiosynthese auf Lern- und Gedächtnisleistungen von Positiv- und Negativdrücken beim Goldfisch (*Carassius auratus auratus* L., Pisces, Cyprinidae). *Zool. Jb. Physiol.* 84: 125-145.

SHELLART, N. A. M. (1990): The visual pathways and central non-tectal processing. In: DOUGLAS, R. H. & M. B. A. DJAMGOZ (Eds.): *The visual system of fish*, pp. 345-372. Chapman and Hall, Cambridge.

SCHLUMPF, B. E. & R. E. DAVIS (1985): Vision in goldfish following bilateral tectal ablation. *Behav. Brain Res.* 18: 193-199.

SCHMIDT, J. T. & J. A. FREEMAN (1980): Electrophysiological evidence that retinotectal synaptic transmission in the goldfish is nicotinic cholinergic. *Brain Res.* 187: 129-142.

SCHMIDT, J. T. & M. SCHACHNER (1999): 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. & V. E. SHASHOUA (1988): Antibodies to ependymin block the sharpening of the regenerating retinotectal projection in goldfish. *Brain Res.* 446: 269-284.

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

SCHMIDT, R. (1986): Biochemical participation of glycoproteins in memory consolidation after two different training paradigms in goldfish. In: MATTHIES, H. (Ed.): Learning and memory: Mechanisms of Information Storage in the Nervous System, Advances in the Biosciences Vol. 59, pp. 213-222. Pergamon, Oxford.

SCHMIDT, R. (1987): Changes in subcellular distribution of ependymins in goldfish brain induced by learning. J. Neurochem. 48: 1870-1877.

SCHMIDT, R. (1989): Glycoproteins involved in long-lasting plasticity in the teleost brain. Progress in zoology, Vol. 37. In: RAHMANN (Ed.): Fundamentals of memory formation: neuronal plasticity and brain function, pp. 327-339. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

SCHMIDT, R. (1995): Cell-adhesion molecules in memory formation. Behavioral Brain Research 66: 65-72.

SCHMIDT, R. (1997): Regulated expression of the CNS-specific cell adhesion molecule ependymin after acquisition of an active avoidance behaviour provides a possible mechanism for memory consolidation. In: TEELKEN & KORF (Eds.): Neurochemistry, pp. 869-876. Plenum Press, New York.

SCHMIDT, R. (1998): Was lernen wir daraus, wie Fische lernen? Spiegel der Forschung. Wissenschaftsmagazin der Justus-Liebig-Universität Gießen. 15. Jahrgang Nr. 1: 81-90.

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

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

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

SCHMIDT, R. & V. E. SHASHOUA (1983): Structural and metabolic relationships between goldfish brain glycoproteins participating in functional plasticity of the central nervous system. *J. Neurochem.* 40: 652-660.

SCHMIDT, R., S. ROTHER & W. K. SCHWERDTFEGER (1990): Glycoproteins of the extracellular matrix mediate plasticity in the CNS. In: SCHWERDTFEGER, W. K. & P. GERMROTH (Eds.): *The forebrain in nonmammals: New aspects of structure and development.* Springer-Verlag, pp. 17-28. Berlin, Heidelberg.

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

SCHMIDT, R., J. HOHMANN & O. HELLER (1999): Extracellular matrix proteins induced by conditioning of goldfish and zebrafish are recovered at synaptic membranes in the optic tectum. *J. Neurochem.* 73 Suppl.: 92.

SCHMIDT, R. F. (1987): Lernen, Gedächtnis, Erinnerung. In: SCHMIDT, R. F. (Hrsg.): *Grundriß der Neurophysiologie*, pp. 314-320. Springer Verlag, Berlin und Heidelberg.

SCHUMAN, E. M. (1997): Synapse specificity and long-term information storage. *Neuron* 18: 339-342.

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

SEKIGUCHI, T., A. YAMADA & H. SUZUKI (1997): Reactivation-dependent changes in memory states in the terrestrial slug *Limax flavus*. *Learn. Mem.* 4: 356-364.

SHARMA, S. C. (1972): Redistribution of visual projections in altered optic tecta of adult goldfish. *PNAS* 69: 2637-2639.

SHASHOUA, V. E. (1968): RNA changes in goldfish brain during learning. *Nature* 217: 238-240.

SHASHOUA, V. E. (1976): 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. (1977): Brain 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. (1979): Brain metabolism and the acquisition of new behaviors. III. Evidence for secretion of two proteins into the brain extracellular fluid after training. *Brain Res.* 166: 349-358.

SHASHOUA, V. E. (1985): The role of brain extracellular proteins in neuroplasticity and learning. In: *Cellular and molecular neurobiology*, vol. 5: Activity-dependent synaptic changes, pp. 183-207. Plenum Press, New York.

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. & G. W. HESSE (1989): Classical conditioning leads to changes in extracellular concentrations of ependymin in goldfish brain. *Brain Res.* 484: 333-339.

SHASHOUA, V. E. & M. E. MOORE (1978): Effects of antisera of β and γ goldfish brain proteins on the retention of a newly acquired behavior. *Brain Res.* 148: 441-449.

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

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

SHASHOUA, V. E., D. ADAMS & A. BOYER-BOITEAU (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.

SHIMIZU, M., N. YAMAMOTO, M. YOSHIMOTO & H. ITO (1999): Fiber connections of the inferior lobe in a percomorph teleost, *Thamnaconus (Navodon) modestus*. Brain Behav. Evol. 54: 127-146.

SKINNER, B. F. (1938): The behavior of organisms. Appleton-Century-Crofts, New York.

SMERASKI, C. A., T. V. DUNWIDDIE, L. DIAO & T. E. FINGER (1999): NMDA and non-NMDA receptors mediate responses in the primary gustatory nucleus in goldfish. Chem. Senses 24: 37-46.

SOKOLOFF, L., M. REIVICH, C. KENNEDY, M. H. DES ROSIERS, C. S. PATLAK, K. D. PETTIGREW, O. SAKURADA & M. SHINOHARA (1977): The [¹⁴C]-deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albion rat. J. Neurochem. 28: 897-916.

SPERRY, R. W. (1963): Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. PNAS 50: 703-710.

SPRINGER, A. D. & A. S. MEDNICK (1985): Topography of the retinal projection to the superficial pretectal parvicellular nucleus of goldfish: a cobaltous-lysine study. J. Comp. Neurol. 237: 239-250.

SQUIRE, L. R. (2000): Gedächtnis und Gehirnsysteme, pp. 83-107. In: ROSE, S. P. R. (2000): Gehirn, Gedächtnis und Bewußtsein. Eine Reise zum Mittelpunkt des Menschseins (Deutsche Ausgabe). Lübbe, Bergisch Gladbach.

STERRER, S., A. KÖNIGSTORFER & W. HOFFMANN (1990): Biosynthesis and expression of endymin homologous sequences in zebrafish brain. Neuroscience 37: 277-284.

STORK, O. & H. WELZL (1999): Memory formation and the regulation of gene expression. Cell. Mol. Life Sci. 55: 575-592.

STREKALOVA, T., C. T. WOTJAK & M. SCHACHNER (2001): Intrahippocampal administration of an antibody against the HNK-1 carbohydrate impairs memory consolidation in an inhibitory learning task in mice. Mol. Cell. Neurosci. 17: 1102-1113.

- STRYER, L. (1995): Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- TANCK, M. W. T., G. H. R. BOOMS, E. H. EDING, S. E. WENDELAAR BONGA & J. KOMEN (2000): Cold shocks: a stressor for common carp. *J. Fish Biol.* 57: 881-894.
- TANG, J. P., E. SHIMIZU, G. R. DUBE, C. RAMPON, G. A. KERCHNER, M. ZHUO, G. LIU & J. Z. TSIEN (1999): Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401: 63-69.
- TANG, S.-J., K.-H. SUN, G.-H. SUN, G. LIN, W.-W. LIN & M.J. CHUANG (1999): Cold-induced ependymin expression in zebrafish and carp brain: implications for cold acclimation. *FEBS Lett.* 459: 95-99.
- TAUBENFELD, S. M., M. H. MILEKIC, B. MONTI & C. M. ALBERINI (2001): The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBP β . *Nature Neurosci.* 4: 813-818.
- THORNDIKE, E. L. (1911): Animal intelligence. Macmillan, New York.
- TISCHMEYER, W. & R. GRIMM (1999): Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 564-574.
- TIUNOVA, A., K. V. ANKHIN, M. SCHACHNER & S. P. R. ROSE (1998): Three time windows for amnesic effect of antibodies to cell adhesion molecule L1 in chicks. *Neuroreport* 9: 1645-1648.
- TORRES, B., M. P. PEREZ-PEREZ, L. HERRERO, M. LIGERO & P. A. NUNEZ-ABADES (2002): Neural substrata underlying tectal eye movement codification in goldfish. *Brain Res. Bull.* 57: 345-348.
- TRAVIS, J. C. (1977): Fundamentals of RIA and other ligand assays. Scientific Newsletters Inc., Anaheim, California.
- TSAI, K. J., S. K. CHEN, Y. L. MA, W. L. HSU & E. H. Y. LEE (2002): *sgk*, a primary glucocorticoid-induced gene, facilitates memory consolidation of spatial learning in rats. *PNAS* 99: 3990-3995.

TUMOSA, N., W. K. STELL, C. D. JOHNSON & M. L. EPSTEIN (1986): Putative cholinergic interneurons in the optic tectum of goldfish. *Brain Res.* 370: 365-369.

UEDA, H. (1997): Multiple forms of AMPA-typ glutamate receptor mRNA phenotypes in goldfish retina and tectum. *Gen. Pharmac.* 29: 575-581.

URICH, K. (1990): *Vergleichende Biochemie der Tiere.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart und New York.

VANEGAS, H. & S. O. E. EBBESSON (1976): Telencephalic projections in two teleost species. *J. Comp. Neurol.* 165: 181-195.

VANEGAS, H. & H. ITO (1983): Morphological aspects of the teleostean visual system: a review. *Brain Res. Rev.* 6: 117-137.

VANEGAS, H., S. O. E. EBBESSON & M. LAUFER (1984): Morphological aspects of the teleostean optic tectum. In: VANEGAS, H. (Ed.): *Comparative neurology of the optic tectum*, pp. 93-120. Plenum Press, New York and London.

VARGAS, J. P., F. RODRIGUEZ, J. C. LOPEZ, J. L. ARIAS & C. SALAS (2000): Spatial learning-induced increase in the argyrophilic nucleolar organizer region of dorsolateral telencephalic neurons in goldfish. *Brain Res.* 865: 77-84.

VENERO, C., T. TILLING, I. HERMANS-BORGMEYER, R. SCHMIDT, M. SCHACHNER & C. SANDI (in press): Chronic stress induces opposite changes in the mRNA expression of the neural cell adhesion molecules NCAM and L1.

VENTER, J. C. et al. (2001): The sequencing of the human genome. *Science* 291: 1304-1351.

VIGH, B., I. VIGH-TEICHMANN, M. J. MANZANO E SILVA & A. N. VAN DEN POL (1983): Cerebrospinal fluid-contacting neurons of the central canal and terminal ventricle in various vertebrates. *Cell Tissue Res.* 231: 615-621.

VIGH-TEICHMANN, I. & B. VIGH (1983): The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Arch. Histol. Jpn. 46: 427-468.

WAGNER, H.-J. (2001): Brain areas in abyssal demersal fishes. Brain Behav. Evol. 57: 301-316.

WALKER, R. M. & P. H. JOHANSEN (1977): Anaerobic metabolism in goldfish (*Carassius carassius*). Can. J. Zool. 55: 1304-1311.

WARING, C. P. , R. M. STAGG & M. G. POXTON (1996): Physiological responses to handling in the turbot. J. Fish Biol. 48: 161-173.

WASSERMAN, E. A. & R. R. MILLER (1997): What's element about associative learning? Ann. Rev. Psychol. 48: 573-607.

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

WINBERG, S. & O. LEPAGE (1998): Elevation of brain 5-HT activity, POMC expression, and plasma cortisol in socially subordinate rainbow trout. Am. J. Physiol. 274: 645-654.

WOOLF, C. J., G. H. WILLIES, H. R. HEPBURN & C. ROSENDORFF (1974): Time dependence of a neurochemical correlate of a learning task: a non-disruptive approach to memory consolidation. Experimentia 30: 760-762.

WULLIMANN, M. F. (1994): The teleostean torus longitudinalis: a short review on its structure, histochemistry, connectivity, possible function and phylogeny. Eur. J. Morphol. 32: 235-242.

WULLIMANN, M. F. (1998): The central nervous system. In: Evans, D. H. (Ed.): The physiology of fishes, pp. 245-282. CRC Press, Boca Raton und New York.

WULLIMANN, M. F., B. RUPP & H. REICHERT (1996): Neuroanatomy of the zebrafish brain: a topological atlas. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston und Berlin.

XU, X. (1997): NMDA receptor antagonist MK-801 selectively impairs learning of the contiguity of the conditioned stimulus and unconditioned stimulus in goldfish. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58: 491-496.

XU, X. & R. E. DAVIS (1992): N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 impairs learning but not memory fixation or expression of classical fear conditioning in goldfish (*Carassius auratus*). *Behav. Neurosci.* 106: 307-314.

XU, X., P. KLINGER & R. DAVIS (1995): Comparative anterograde amnesic and anticonvulsant effects of two types of NMDA receptor antagonists: MK-801 and HA-966. *Psychopharmacol.* 117: 333-339.

XU, X., T. RUSSEL, J. BAZNER & J. HAMILTON (2001): NMDA receptor antagonist AP5 and nitric oxide synthase inhibitor 7-NI affect different phases of learning and memory in goldfish. *Brain Res.* 889: 274-277.

YAGER (1967): Behavioural measures and theoretical analysis of spectral sensitivity and spectral saturation in the goldfish, *Carassius auratus*. *Vision Res.* 7: 707-727.

YAGER, D. (1968): Behavioural measures of the spectral sensitivity of the dark-adapted goldfish. *Nature* 220: 1052-1053.

YALOW, R. S. (1977): Radioimmunoassay: a probe for fine structure of biologic systems, Nobel lecture 8 Dec. 1977. *Physiol. Med.* 447-468.

YALOW, R. S. & S. A. BERSON (1959): Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* 184: 1648-1649.

YAMANE, Y., Y. YOSHIMOTO & H. ITO (1996): Area dorsalis pars lateralis of the telencephalon in a teleost (*Sebasticus marmoratus*) can be divided into dorsal and ventral regions. *Brain Behav. Evol.* 48: 338-349.

YAMAMOTO, N., M. YOSHIMOTO, J. S. ALBERT, N. SAWAI & H. ITO (1999): Tectal fiber connections in a non-teleost actinopterygian fish, the sturgeon *Acipenser*. *Brain Behav. Evol.* 53: 142-155.

YEO, C. H. & G. E.. SAVAGE (1975): The tectal commissure and interocular transfer of a shape discrimination in the goldfish. *Exp. Neurol.* 49: 291-298.

YEO, C. H. & G. E.. SAVAGE (1976): Mesencephalic and diencephalic commissure and interocular transfer in the goldfish. *Exp. Neurol.* 53: 51-63.

ZOTTOLI, S. J., K. J. RHODES & E. J. MUFSON (1987): Comparison of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase staining patterns in the optic tectum of the goldfish *Carassius auratus*. A histochemical and immunocytochemical analysis. *Brain Behav. Evol.* 30: 143-159.