

# **MERPs im Gehirn der Hausmaus:**

**Untersuchung ihrer möglichen Bedeutung für die  
Verhaltensplastizität  
durch *in-situ* Hybridisierung, reverse Transkriptase-  
Polymerase Kettenreaktion sowie immunhistochemische  
Methoden**

## **Dissertation**

vorgelegt von

**David Hinchliffe**

(Diplom Biologe)

zur Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium*

(Dr. rer. nat.)

Eingereicht am Fachbereich Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gießen, April 2013

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit (ZBB) der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit von Mai 2008 bis April 2013 unter der Leitung von Prof. Dr. Rupert Schmidt angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Holger Zorn  
Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie  
(FB08)

1. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Schmidt  
Zentrale Biotechnische Betriebseinheit (ZBB)  
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. Tina E. Trenczek  
Institut für Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie (FB08)  
Justus-Liebig-Universität Gießen

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abstract</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Zusammenfassung</b> .....	<b>3</b>
<b>3. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
3. 1 Formen des Gedächtnis .....	6
3. 2 Extrazelluläre Matrix .....	8
3. 3 Ependymin .....	9
3. 4 Ependymin Related Proteins .....	11
<b>4. Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
4. 1 Material .....	14
4. 1. 1 Chemikalien .....	14
4. 1. 2 Gebrauchswaren .....	15
4. 1. 3 Geräte .....	15
4. 1. 4 Verwendete Software .....	16
4. 1. 5 Synthetische Oligonukleotide .....	16
4. 1. 6 Radioaktivität .....	17
4. 1. 7 Enzyme und Kits .....	18
4. 1. 8 Antiseren .....	18
4. 1. 9 Objektträger .....	18
4. 2 Versuchstiere .....	19
4. 3 Methoden .....	20
4. 3. 1 Morris Water Maze .....	20
4. 3. 2 Gehirn Präparation .....	21
4. 3. 3 Herstellung der Kryoschnitte für ISH und IF .....	22
4. 3. 4 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion .....	22
4. 3. 5 <i>In-situ</i> Hybridisierung .....	30
4. 3. 6 Immunhistochemie .....	36
<b>5. Ergebnisse</b> .....	<b>42</b>
5. 1 Lernverhalten der Mäuse im Morris Water Maze .....	42
5. 2 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion .....	49
5. 3 <i>In-situ</i> Hybridisierung .....	58
5. 4 Immunhistochemie .....	70

<b>6. Diskussion .....</b>	<b>81</b>
6. 1 Lernverhalten der Mäuse im Morris Water Maze .....	81
6. 1. 1 Testmodell .....	81
6. 1. 2 Trainingsmethode Morris Water Maze und Anmerkungen zur Präparation .....	82
6. 1. 3 Schwimm- und Lernverhalten .....	83
6. 1. 4 Einteilung der Gruppen „Lerner“ und „nicht-Lerner“ .....	85
6. 1. 5 Wahl der Tötungszeitpunkte .....	86
6. 2 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion .....	87
6. 2. 1 Kontrollen .....	87
6. 2. 2 Überlegungen zu den Korrekturberechnungen .....	89
6. 2. 3 Die Genexpression der MERP1 und MERP2 mRNA im Zeitverlauf ..	90
6. 3 <i>In-situ</i> Hybridisierung .....	97
6. 3. 1 Kontrollen .....	97
6. 3. 2 Überlegungen zu den rechnerischen Korrekturen .....	97
6. 3. 3 Die MERP2 mRNA Synthese im Zeitverlauf .....	99
6. 3. 4 Die MERP2 mRNA Lokalisation im Zeitverlauf .....	101
6. 4 Immunhistochemie .....	104
6. 4. 1 Die primären Antikörper und deren Aussagekraft .....	104
6. 4. 2 Antikörpermarkierungen der meningealen Bereiche .....	105
6. 4. 3 Antikörpermarkierungen am Hippocampus .....	106
6. 4. 4 Verteilung des MERPs auf zellulärer Ebene .....	106
6. 5 Ausblicke .....	108
<b>7. Literatur .....</b>	<b>110</b>
<b>8. Danksagung .....</b>	<b>118</b>
<b>9. Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>119</b>

## Abkürzungsverzeichnis

0-K	Null-Kontrolle
Abb.	Abbildung
AMPA	<i><math>\alpha</math>-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
Bkg	<i>Background</i>
bp	Basenpaar
Bq	Becquerel
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CA	<i>cornu ammonis</i>
CCD	<i>charged coupled device</i>
cDNA	<i>copyDNA</i>
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	desoxy-Nukleotid Tri-Phosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Epdr	Ependymin related
ERP	Ependymin Related Protein
EtBr	Ethidiumbromid
EZM	Extrazelluläre Matrix
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
gRNA	gesamt RNA
hkg	<i>housekeeping gene</i>
HSW	Halswirbelsäule
HWZ	Halbwertszeit
IF	Immunfluoreszenz
IGG	Immunglobulin G
ISH	<i>in-situ</i> Hybridisierung
LfdNr.	Laufende Nummer
LTP	<i>Long Term Potentiation</i>
MERP	Mammalian Ependymin Related Protein
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mumer	murine mammalian ependymin related
MWM	Morris Water Maze
NCAM	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NP40	Ethylphenylpolyethylenglykol
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>

QL	quantum level
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raum Temperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
SR	Sonde Randomisiert
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TDT	Terminale Desoxynukleotidyl Transferase
tRNA	transfer RNA
UCC-1	<i>upregulated in colorectal cancer gene-1</i>
vergl.	vergleiche

## 1. Abstract

Tests were performed to analyse the Ependymin related protein MERP in *Mus musculus* after a learning paradigm. The findings and conclusions are outlined below.

1. The organisms used, C57BL/6J inbred mice, are approved in performing the implemented learning paradigm, a spacial learning task named after its inventor Richard Morris, the Morris Water Maze. By analyzing their performances, the mice could be classified as “learner” or “non-learner”. Hence, the requirements were given to carry out the intended experiments.
2. Time-dependent progressions of the MERP2 mRNA synthesis after a learning event have been received using *in-situ* hybridisation, as well as reverse transcriptase-PCR. Though two kinds of analysis methods have been used, both progressions resemble each other. A first increase in the mRNA concentration is presumably related to stress generated during the learning paradigm. After declining, a second increase of the measured data could be seen, but the maximum could not be detected. This bimodal progression has similarities to the one received for Ependymin after conditioning of goldfish. Furthermore, different groups reported similar time-dependent progressions for other proteins. MERP1 could only be detected by using RT-PCR. Its low abundance and marginal change in its concentration leads to the conclusion that the MERP1 might be a duplication of the evolutionary older gen, the MERP2. This could have resulted in a loss-of-function (or at least, a strong decline in its expression level).
3. Localisation of the MERP2 mRNA revealed another analogy with the goldfish Ependymin. Apparently, the place of the synthesis is within the area of the meninx. A preference for the right dorsal hemisphere has been discussed. Ependymocysts represent excellent candidates to be these synthesising cells.
4. Immunohistochemical analysis produced several results. On the one hand, signals could be detected in the area of the meninx, similar to the localisation of the MERP2 mRNA. Furthermore, antibody-staining could be seen at cells of endomeningeal invaginations and coating cells of the dorsal third ventricle. Both results are homologous with the findings for Ependymin in goldfish. MERPs could also be detected at structures of the hippocampus, especially at the CA3-area and the dentate gyrus. Those tissues play an important role within the spacial orientation, as well as the long term consolidation. Using confocal fluorescence microscopy, assumptions of MERP distributed in circle-like shapes at the hippocampale area could be confirmed. This might be an evidence of fibre building and is therefore consistent with the working hypothesis for the action of Ependymin during memory consolidation in goldfish.

These results implicate two conclusions:

1. Based on the MERP2 analogies with its related protein, the Ependymin, in every field analysed, a similar function within the mouse brain might be possible and even likely. Therefore, participation during the consolidation of the neuronal connections could be possible, as well as a role within the axonal guiding.
2. In contrast with the Ependymin, MERP2 is not the predominant protein of the extracellular fluid. It rather is another component of the orchestra of molecules within the extracellular matrix and joins in during the plasticity of the brain and its consolidation of neuronal connectivity.

## 2. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an dem Ependymin-verwandten Protein MERP in der Hausmaus nach einem Lernparadigma vorgenommen. Im Folgenden werden die gewonnenen Erkenntnisse und die daraus resultierenden Schlussfolgerungen kurz zusammengefasst.

1. Das verwendete Testmodell, Mäuse des Inzucht Stamms C57BL/6J, haben sich bewährt, um das hier angewendete Lernparadigma durchzuführen. Dabei handelte es sich um einen Lernversuch zur räumlichen Orientierung, das Morris Water Maze. Anhand der durchgeführten Auswertungen konnte das angestrebte Lernziel erreicht und die Organismen eindeutig in die Gruppen der „Lerner“ und der „nicht-Lerner“ eingeordnet werden. Somit war die Voraussetzung zur Durchführung der nachfolgenden Versuche gegeben.
2. Sowohl durch die *in-situ* Hybridisierung, als auch durch die reverse Transkriptase-PCR sind Zeitverlaufskurven für die mRNA Synthese des MERP2 im Anschluss an ein Lernereignis erstellt worden. Beide Kurven ähnelten sich in der Form des Kurvenverlaufs, trotz unterschiedlicher Untersuchungsmethoden. Der erhaltene Verlauf zeigte einen ersten Anstieg, welcher vermutlich im Zusammenhang mit dem Stress des Lernparadigmas steht. Nach einem Absinken der Kurve schließt sich eine weitere Steigung an, deren Maximum jedoch nicht detektiert werden konnte. Dieser zweigipflige Verlauf ähnelt jedoch dem des Ependymins, welcher nach einer Konditionierung im Goldfisch erhalten wurde. Von mehreren anderen Arbeitsgruppen wurden ähnliche Zeitverläufe für weitere Proteine beschrieben. Eine Verlaufskurve für das MERP1 konnte nur durch die RT-PCR aufgenommen werden. Dessen geringes Vorkommen und seine wenig veränderten Konzentrationen lassen auf eine Duplikation des evolutionär älteren Gens, des MERP2, schließen, mit resultierendem Funktionsverlust (oder zumindest starker Expressions-Verminderung bei der Duplikation).
3. Die Lokalisierung der mRNA des MERP2 ergab eine weitere Übereinstimmung zum Goldfisch Ependymin. Der Syntheseort liegt anscheinend im Bereich der Meninx, wobei eine Präferenz der dorsalen, rechten Hemisphäre diskutiert wurde. Die Ependymocyten stellen dabei hervorragende Kandidaten als synthetisierende Zellen dar.
4. Die immunhistochemischen Untersuchungen des Proteins ergaben mehrere Ergebnisse. Zum einen wurden Signale im Bereich der Meninx entdeckt, homolog zur Lage der MERP2 mRNA. Des Weiteren sind Antikörpermarkierungen an endomeningealen Invaginationen und an auskleidenden Zellen des dorsalen dritten Ventrikels detektiert worden. Beides ist übereinstimmend mit den Erkenntnissen aus den Ependymin-Untersuchungen am Goldfisch. Ebenso wurde das MERP an Strukturen des Hippocampus, vor allem der CA3-Region und des Gyrus dentatus, registriert. Diese spielen eine Rolle bei der räumlichen Orientierung und der Langzeitgedächtnisbildung.

Anhand von konfokalen Aufnahmen konnte die Vermutung bestätigt werden, dass sich das MERP in zirkulär-verlaufenden Schlingen im Bereich des Hippocampus anordnet. Dies könnte ein Hinweis auf eine Faser-Bildung sein und somit im Einklang zur Arbeitshypothese über die Funktionsweise des Ependymins beim Goldfisch stehen.

Aus diesen Ergebnissen ergeben sich folgende Schlussfolgerungen:

1. Auf Grund der vielen Übereinstimmungen des MERP2 mit seinem verwandten Protein, dem Ependymin, in allen beobachteten Bereichen, ist auch eine ähnliche Funktion innerhalb des Mausgehirns durchaus möglich und sogar wahrscheinlich. Somit wäre eine Rolle bei der Stabilisierung von neuronalen Verbindungen ebenso denkbar, wie eine Beteiligung an der Richtungsführung des axonalen Wachstums.
2. Im Gegensatz zum Ependymin handelt es sich beim MERP2 nicht um das prädominante Protein der extrazellulären Flüssigkeit. Vielmehr scheint es ein weiterer Bestandteil des Orchesters an Molekülen der extrazellulären Matrix zu sein und dort im Zusammenspiel mit weiteren Molekülen eine Rolle bei der Plastizität des Gehirns und der allgemeinen Stabilität der neuronalen Verbindungen zu übernehmen.

### 3. Einleitung

Die Frage nach der Ursache und dem Erlangen eines bestimmten Verhaltens eines Organismus gehört zu den grundlegenden Fragestellungen der Biologie und Psychologie. Bis heute werden die zu Grunde liegenden Mechanismen kontrovers diskutiert und führten in der Vergangenheit zu verschiedensten Strömungen innerhalb der Wissenschaft. Besonders die Richtungen des *Behaviorismus*, sowie der Ethologie stehen einander besonders kritisch gegenüber. Die Grundlagen des Behaviorismus legte Watson Anfang des 20. Jahrhunderts (Watson, 1913). Durch seine *stimulus-response* Theorie wollte er die Betrachtungsweise des Verhaltens auf rein naturwissenschaftlich beobachtbare Grundlagen basieren, „innere Aspekte“ spielten für ihn demnach keine Rolle. Aufbauend auf seine Theorien entwickelte Burrhus Frederic Skinner diese Theorien weiter und radikalisierte sie (Skinner, 1953). In seinen Arbeiten schloss er nun eine Bedeutung der inneren Beweggründe eines Organismus zu einem bestimmten Verhalten nicht mehr aus. Jedoch führte er die inneren Beweggründe ebenfalls auf seine Theorie zurück, dass ein akquiriertes Verhalten eine Konsequenz aus vorangegangenen Verhalten und deren Einfluss auf die Umwelt des betreffenden Organismus darstellt. Für die Vertreter des radikalen Behaviorismus steht somit der Einfluss der Umwelt als Auslöser eines erlernten Verhaltens fest. Dem gegenüber positionieren sich die Anhänger der klassischen vergleichenden Verhaltensforschung. Bereits 1910 führte der deutsch Zoologe Oskar Heinroth den Begriff der Ethologie in die Verhaltensbiologie ein (Heinroth, 1910). Darauf basierend entwickelte der österreichische vergleichende Anatom und Zoologe Konrad Lorenz die Instinktlehre (Lorenz, 1978). Diese besagt, dass Verhalten durch das Erbgut bestimmt sei und sich aus Instinktbewegungen, welche durch Schlüsselreize ausgelöst werden, aufbaut.

Die Diskussion über die korrekte Deutung des Verhaltens ist noch nicht abschließend geklärt und es haben sich bis heute viel weitere Varianten der verschiedenen Theorien entwickelt. Auch auf die molekulare Ebene sind diese theoretischen Überlegungen übertragbar: Führt ein äußerer Einfluss zu einer Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden und schließlich zur veränderten Genexpression durch Transkriptionsfaktoren oder reguliert das Erbgut durch die Expression von Molekülen der Signaltransduktionswege schon ab der ersten Zellteilung bei der Entstehung eines Embryos diesen Prozess von vorneherein selbst? Eine eindeutige Antwort scheint zurzeit noch nicht möglich, jedoch spricht viel für einen Einfluss beider Überlegungen auf das Akquirieren des Verhaltens. In der vorliegenden Arbeit wird ein Protein untersucht, das Mammalian Ependymin Related Protein (MERP), welches durch seine veränderte Expressionsrate nach einem Lernparadigma Einfluss auf die Langzeitgedächtnisbildung haben könnte und somit das Verhalten des Organismus beeinflussen würde. Auch hier scheint ein Äußerer Einfluss in Form von physischem und psychischem Stress durch das gewählte Lernparadigma nicht ausgeschlossen zu sein, doch ebenso kann eine Reaktion auf die veränderten äußeren Umstände erst durch die gesteigerte Expression des beobachteten Gens stattfinden, welches durch die DNA festgelegt ist.

Eine klärende Antwort zu diesem ideologischen Disput der Verhaltensbiologie liefert diese Arbeit freilich nicht. Der Schwerpunkt liegt auf der Analyse des MERP und dessen Funktion innerhalb des Gehirns der Hausmaus in einem verhaltensabhängigen Kontext. Dennoch kann auch hier im Kleinen gezeigt werden,

dass eine eindeutige Unterscheidung zwischen „äußeren Reizen“ und „inneren Erbfaktoren“ im Zusammenhang mit der Langzeitgedächtnisbildung nicht so einfach durchgeführt werden kann.

Im weiteren Verlauf der Einleitung werden die wichtigsten Zusammenhänge und Hintergründe von den Arten des Gedächtnisses über das namensgebende Ependymin hin zum untersuchten MERP erläutert.

### 3. 1 Formen des Gedächtnis

Unter dem Begriff des Gedächtnisses versteht man die Fähigkeit des Organismus erlernte Informationen abzuspeichern und wieder abrufbar zu halten. Die Art des Erlernten, sowie die Dauer des Abspeicherns sind die Grundlagen der Definition der verschiedenen Gedächtnisarten. Grundsätzlich wird hierbei zwischen drei verschiedenen Formen unterschieden: das sensorische Gedächtnis / Ultrakurzzeitgedächtnis, das Kurzzeitgedächtnis / Arbeitsgedächtnis und das Langzeitgedächtnis.

#### a Sensorisches Gedächtnis / Ultrakurzzeitgedächtnis

Hierbei handelt es sich um die Informationen, welche durch unsere Sinnessysteme aufgenommen werden. Diese Informationen werden zum größten Teil jedoch nicht an das Kurzzeitgedächtnis weitergeleitet. Nur die weitergeleiteten Informationen haben die Möglichkeit ins Bewusstsein des Organismus zu gelangen. Hier erfolgt somit eine Filterung der aufgenommenen Informationen. Es lassen sich verschiedene Ultrakurzzeitspeicher für die einzelnen Sinnessysteme ausmachen, welche jeweils spezifisch für diese sind. Ein berühmtes Beispiel hierfür ist der Versuch von Johann Andreas von Segner von 1740 zum Ikonischen Gedächtnis, dem sensorischen Gedächtnis der visuellen Informationen: Er ließ eine glühende Kohle an ein Rad montieren und dieses rotieren. Die Dauer, bis sich ein durchgängiges rotes Band durch die Drehung der Kohle ergab, lag bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von geschätzten 100 ms. Das heißt, wenn nach weniger als diesen 100 ms die glühende Kohle erneut die gleiche Stelle nach einer Umdrehung erreichte, so lag dessen Positionsinformation für diese Stelle noch immer vor. Georg Sperling war einer der ersten Wissenschaftler, der sich der Untersuchung dieser Form des Gedächtnisses widmete (Sperling, 1963).

#### b Kurzzeitgedächtnis / Arbeitsgedächtnis

Beim Kurzzeitgedächtnis handelt es sich um Informationen, welche vom sensorischen Gedächtnis weitergeleitet wurden und in das Bewusstsein des Organismus gelangt sind. Hier werden diese Informationen kurzfristig, Sekunden bis Minuten, ständig bereit gehalten und können weiter verwendet werden. Sollte dies jedoch nicht der Fall sein, gehen diese Informationen nach dem genannten Zeitraum verloren.

Seit einiger Zeit setzt sich statt des Begriffs des Kurzzeitgedächtnisses immer mehr der des Arbeitsgedächtnisses und dessen Bedeutung durch. Hierbei handelt es sich um eine Erweiterung des „*modal model*“ (Atkinson and Shiffrin, 1968) durch Allen Baddeley und Graham Hitch (Baddeley and Hitch, 1974). Wurde bisher angenommen, es handele sich bei dem Kurzzeitgedächtnis um ein einheitliches System, so wird das Arbeitsgedächtnis in mehrere Module unterteilt: die phonologische Schleife, der räumlich visuelle Notizblock, sowie den episodischen

Puffer (später von Baddeley hinzugefügt; Baddeley, 2000). Diese Module werden von der „zentralen Exekutive“ koordiniert.

### c Langzeitgedächtnis

Um Informationen dauerhaft verfügbar zu machen, müssen sie sich vom Kurzzeitgedächtnis / Arbeitsgedächtnis ausgehend manifestieren. Dieser Vorgang spielt sich im Bereich von Stunden ab. Unter anderem ist ein Grund hierfür die benötigte neu-Synthese von Proteinen (Flexner et al., 1963; Agranoff et al., 1966; Scharpekant und Laudien, 1980). Beim Langzeitgedächtnis handelt es sich jedoch nicht um eine einheitliche Struktur, sondern es kann zwischen verschiedenen Speicherleistungen unterschieden werden. Grundsätzlich unterscheidet man hier zwischen dem deklarativen und dem prozeduralen Gedächtnis. Das deklarative Gedächtnis wird weiter unterschieden in ein episodisches (Fakten und Ereignisse die eigene Person betreffend) und ein semantisches Gedächtnis (allgemeine Fakten und Ereignisse). Das prozedurale Gedächtnis speichert Informationen, welche für unbewusste Abläufe benötigt werden, zum Beispiel motorische Bewegungsabläufe.

Der genaue molekulare Ablauf der Langzeitgedächtnisbildung ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Einige Abläufe gelten jedoch als gesichert. So spielt die Langzeit Potenzierung (LTP) bei der Stabilisierung von synaptischen Verbindungen und somit bei der Konsolidierung von Informationsübertragungs-Wegen, eine entscheidende Rolle. Das Auftreten der LTPs am Hippocampus des Kaninchens wurde von Lømo und Bliss gezeigt (Bliss and Lømo, 1973). Diese Region spielt eine entscheidende Rolle bei der räumlichen Gedächtnisbildung des Säugers.

Bereits Donald Hebb prägte den Ausspruch „*what fires together, wires together*“ (Hebb, 1949). Damit sollte ausgedrückt werden, dass Zellen, welche eine Synapse häufig verwenden, diese Synapse auch weiterhin bevorzugt verwenden. Dies gilt als eine mögliche Grundlage der synaptischen Plastizität. Der molekulare Vorgang der LTP beruht auf dem postsynaptischen Vorhandensein von zwei Arten der Glutamat-Rezeptoren: Der AMPA-Rezeptor und der NMDA-Rezeptor. Durch Aktionspotenziale an der Präsynapse wird Glutamat in den synaptischen Spalt freigesetzt. Dieses bindet an die AMPA-Rezeptoren, welche daraufhin ihre Ionen-Leitfähigkeit erhöhen und nach überschreiten eines Schwellenwertes ein exzitatorisches postsynaptisches Potenzial auslösen. In Folge dessen werden die NMDA-Rezeptoren durch Abstoßung des Magnesium-Blocks ebenfalls aktiviert. Es kommt zu einem Kalzium-Einstrom, wodurch sich dessen Konzentration innerhalb der Postsynapse erhöht und die Proteinkinase C, sowie die Kalzium-/Calmodulin-abhängigen Kinasen aktiviert werden. Hierdurch werden verschiedenste Prozesse ausgelöst. Unter anderem werden weitere Glutamat-Rezeptoren in die Postsynapse eingebaut, die bereits vorhandenen werden weiter sensibilisiert und es erfolgen Umbildungsprozesse des Cytoskeletts. Auch retrograde Prozesse werden in Gang gesetzt. Vor allem Stickstoff-Monoxid scheint an der Postsynapse freigesetzt zu werden und auf die Präsynapse zu wirken.

Über das Signalsystem der *second-messenger* werden also in Folge der LTP verschiedene Kaskaden in Gang gesetzt. An deren Ende kann die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren stehen, welche direkten Einfluss auf die Genexpression nehmen. Diese werden auch als *third-messenger* bezeichnet.

### 3. 2 Extrazelluläre Matrix

Bei der extrazellulären Matrix (EZM) handelt es sich um die Bestandteile des tierischen Organismus, welche die Zellen umgeben. Ihre Hauptaufgaben liegen in der Stabilisierung der Zellen, dem Trennen von Geweben, der Wasserspeicherung und der Vermittlung von interzellulärer Kommunikation. Ihre Bestandteile sind den beiden Gruppen der Fasern und der in Lösung vorliegenden Moleküle unterteilt. Im Folgenden werden diese Kategorien näher beschrieben und wichtige Vertreter aufgeführt.

#### a Fasern

Die Aufgabe der Fasern liegt in der Stabilisierung der EZM und somit des von ihnen umgebenen Gewebes. Die größte Untergruppe der Fasern wird durch die Kollagene gestellt. Diese können sich durch Polymerisation zu verschiedenen strukturellen Arten von Fasern zusammenlagern und somit die Zugfestigkeit in die beanspruchten Richtungen sicherstellen. Um die elastischen Eigenschaften zu gewährleisten, werden weitere Untergruppen, besonders die Elastine und die Fibrilline, benötigt.

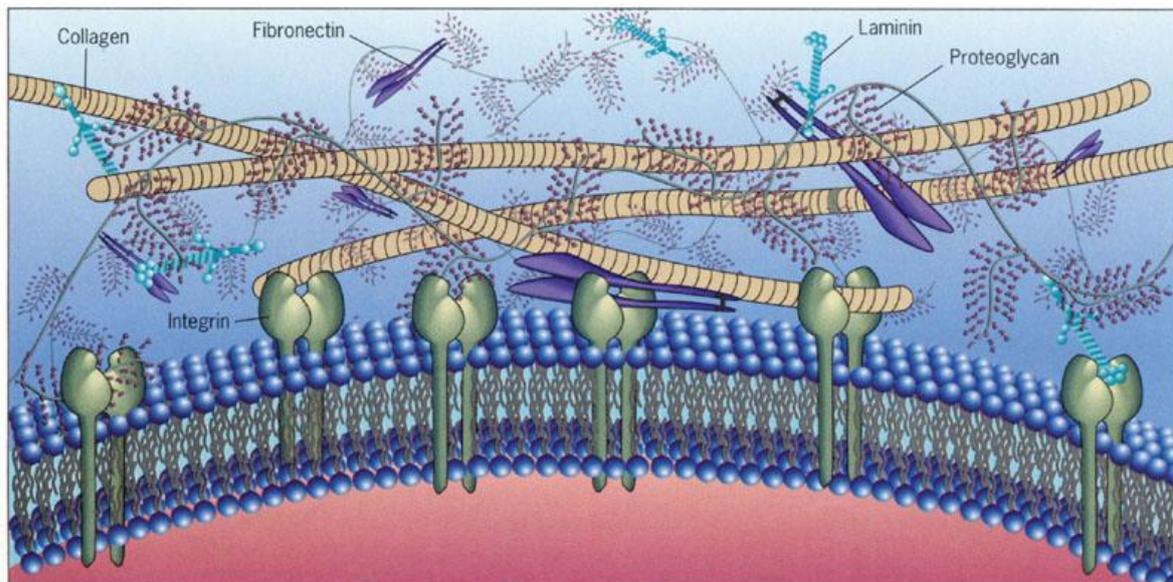
#### b Gelöste Moleküle

Die Gruppe der gelösten Moleküle lässt sich weiter in verschiedene Untergruppen unterteilen. Diese können unterschiedliche Aufgaben erfüllen und je nach Bedingungen gelöst vorliegen oder an den Fasern, bzw. den Zellen gebunden vorliegen.

Eine große Untergruppe stellen die Proteoglykane dar. Dabei handelt es sich um Glukosaminoglykane, welche an Proteine der EZM gekoppelt sind. Auf Grund ihrer Ladungseigenschaften und osmotischen Eigenschaften sind sie unter anderem für die Wasserspeicherung zuständig. Ebenfalls können sie verschiedene Botenstoffe (z.B. Wachstumsfaktoren) binden und somit in der EZM speichern. Wichtige Vertreter dieser Klasse sind Heparansulfat und Dermatan-sulfat. Ebenfalls von Bedeutung ist Hyaluronsäure. Hierbei handelt es sich jedoch um ein Glukosaminoglykan, welches nicht an ein Protein gekoppelt ist.

Eine weitere wichtige Untergruppe stellen die Glykoproteine dar, bei denen es sich um Proteine handelt, an welche eine oder auch viele Kohlenhydratgruppen kovalent gebunden sind. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Zell-Zell und Zell-EZM Kommunikation. Wichtige Vertreter sind Laminin und Fibronectin, welche beide Zelladhäsionseigenschaften aufweisen. Laminin bildet Kollagen-ähnliche Strukturen (jedoch eher netzartig als faserig) und bindet an Kollagen und andere Moleküle der EZM. Fibronectin bindet ebenfalls an Kollagen, gleichzeitig kann es aber auch mit Zellen durch Bindung an Membran-assoziierte Rezeptoren in Kontakt treten. Durch diese Interaktion werden intrazelluläre Signalwege aktiviert, in dessen Folge es zu Veränderungen des Cytoskeletts kommt. Somit mediiert das Fibronectin die Bewegung der Zelle innerhalb der EZM. Der membranständige Rezeptor ist das Integrin. Dieser Rezeptor spielt auch bei vielen anderen zelladhäsionsvermittelten Prozessen eine wichtige Rolle.

(Die Informationen wurden zusammengetragen nach Ayad et al., 1998; Alberts et al., 2004; Plopper, 2007.)



**Abb. 3.1: Bestandteile der extrazellulären Matrix.** In der Abbildung sind wichtige Bestandteile und deren Interaktionsmöglichkeiten aufgeführt. Während das Kollagen vor allem für die Stabilität zuständig ist, spielen das Laminin und das Fibronectin in Verbindung mit dem zellmembranständigen Rezeptor Integrin eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell, bzw. Zell-EZM Kommunikation.

Die Abbildung ist der Internetseite [jpkc.scu.edu.cn](http://jpkc.scu.edu.cn) entnommen und unter der Adresse <http://jpkc.scu.edu.cn/ywwy/zbsw%28E%29/pic/ech4-1.jpg> abrufbar (stand 10.04.2013).

### 3.3 Ependymin

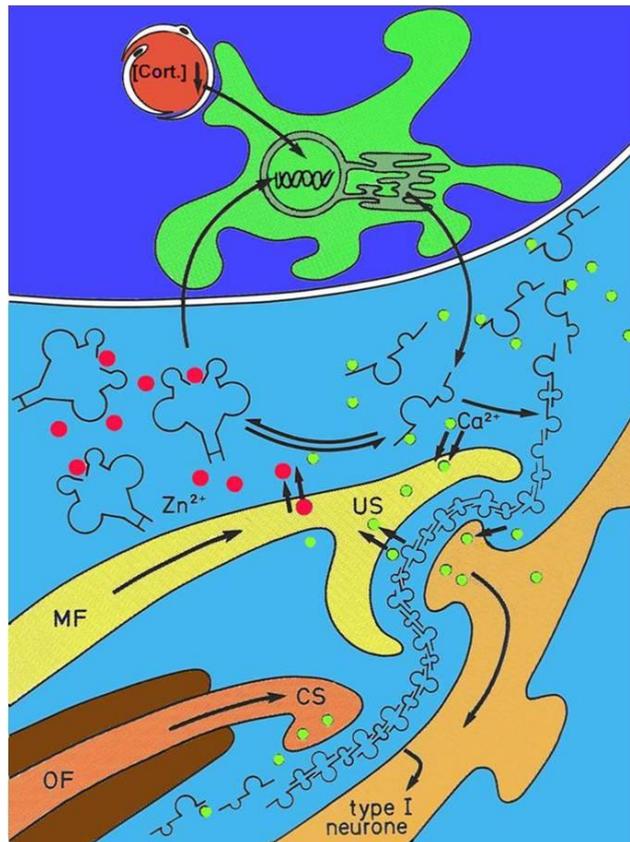
Bei den Ependymin Molekülen handelt es sich um Glykoproteine, welche im Gehirn des Goldfisches entdeckt wurden. Es gibt drei verschiedene Formen der Ependymine mit den Molekulargewichten von 26 kD, 31 kD und 37 kD (Shashoua, 1976). Der Unterschied im Gewicht der drei Moleküle kommt durch die Art ihrer Glykolisierung zustande. Ersterstes ist unglykolisiert, während das Zweite einfach, das dritte zweifach verzuckert vorliegt, obwohl alle Varianten jeweils zwei N-Glykolisierungsstellen aufweisen (Schmidt and Marktscheffel, 1990). Innerhalb dieser Kohlenhydratketten beinhalten sie ein L2/HNK-1 Epitop, welches charakteristisch für Zelladhäsionsmoleküle ist (Kruse et al., 1985; Shashoua, 1986). Das Präpro-Ependymin besteht aus 216 Aminosäuren und besitzt eine, für sekretorische Proteine typische, lipophile Signalsequenz (Königstorfer et al., 1989b). Des Weiteren tragen die Moleküle an ihren Verzuckerungen Bindungsstellen für Kalzium (Schmidt and Makiola, 1992). Herrscht in der Umgebung der Moleküle ein Mangel an Kalzium, so bilden sie untereinander lange Fasern aus, sie polymerisieren (Schmidt and Shashoua, 1981; Shashoua, 1989, 1991). 31 kD und 37 kD Ependymine können untereinander Hetero- oder Homodimere bilden, welche durch eine Bindung eines Zinkions stabilisiert werden (Schmidt and Makiola, 1992).

Zuerst wurden das Ependymin in periventriculären Zellen des Ependyms entdeckt, woraufhin sie ihren Namen erhalten haben (Benowitz and Shashoua, 1977; Shashoua, 1977). Später konnte jedoch gezeigt werden, dass sie in den Fibroblasten der Endomeninx gebildet werden (Rother, 1992). Sie werden in die Cerebrospinalflüssigkeit sezerniert und machen dort 14% des gesamten Proteinbestands aus (Schmidt and Shashoua, 1981). Nachdem die Fische einem

Lerntraining (u.a. *shock-avoidance* Konditionierung) unterzogen wurden, konnte ein Abfall der Ependymin-Konzentration um 19% festgestellt werden (Schmidt, 1987; Shashoua and Hesse, 1989). Nach einer Stunde stieg die Ependymin-Konzentration im Cytoplasma (Schmidt, 1987), nach drei bis vier Stunden auch wieder in der Cerebrospinalflüssigkeit wieder an (Schmidt, 1987; Shashoua and Hesse, 1989). Neben diesen ersten Untersuchungen des Ependymins im Bezug zu Lernereignissen, wurden Versuche mit Antiseren gegen das Ependymin durchgeführt (Shashoua and Moore, 1978; Piront and Schmidt, 1988). Erneut wurde eine *shock-avoidance* Konditionierung durchgeführt. Unbehandelte Fische erinnerten sich erfolgreich, dem Stromreiz auszuweichen, wohingegen Fische, welchen bis zu 24 Stunden nach der Akquisition das Anti-Ependymin Antiserum in den Hirnventrikel injiziert wurde, diese Lernleistung nicht konsolidiert hatten (Piront and Schmidt, 1988). Wurde die Injektion jedoch vor dem Lerntest durchgeführt, ergaben sich keine Unterschiede zu den Kontroll-Fischen. In Folge dessen wird dem Ependymin eine Rolle bei der Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses zugesprochen.

Die gesammelten Erkenntnisse führten zur Entwicklung einer Arbeitshypothese der molekularen Wirkweise des Ependymins (Shashoua and Schmidt, 2004): Sie beruht auf zwei miteinander verknüpften Regelkreisen. Der erste spiegelt dabei die biologische Relevanz der abgebildeten Situation wider, der zweite berücksichtigt die in bestimmten Neuronen durch äußere Reize erzeugten Erregungen.

Durch eine Stressverursachende Situation steigt die Konzentration des Cortisols zunächst im Blut an. Wird ein neues Verhalten erfolgreich ausgeführt, so sinkt die Cortisolkonzentration wieder auf Ruhewerte ab. Durch das Abfallen der Cortisolkonzentration wird die Expression der Gene innerhalb der Ependyminsynthetisierenden Fibroblasten gesteigert und mehr Ependymin in die Cerebrospinalflüssigkeit sezerniert. Erreicht ein Aktionspotential eine Präsynapse, so sinkt in deren Umgebung der Kalziumgehalt in der extrazellulären Flüssigkeit, da das Kalzium in die synaptischen Elemente aufgenommen wird. Hierdurch bilden die Ependymine nun Fasern durch Polymerisation aus, welche als Gerüst für diese Synapse dienen können. Erzielt diese Synapse einen verhaltensrelevanten Effekt, welcher einen positiven Einfluss auf den Organismus hat, so sinkt infolge dessen auch der Stress und somit auch die Cortisol-Konzentration innerhalb der Fibroblasten. Desweiteren würde dieser positive Effekt bedeuten, dass diese Synapse fortlaufend und häufig genutzt würde, sprich, es würde ständig Kalzium aufgenommen werden. Somit würde das polymerisierte Ependymingerüst aufrechterhalten bleiben. Es würde nach einer Stabilisierungsphase jedoch auch kein weiteres gelöstes Ependymin aus der Cerebrospinalflüssigkeit auspolymerisieren, wodurch sich wieder die ursprüngliche Kalzium-Konzentration einstellen würde. An dieser Stelle schließt sich der erste regulatorische Kreis: Mittels Zinkionen können Dimerisierungen von Ependymin Molekülen stabilisiert werden. Diese können in dieser Form erneut in die Fibroblasten aufgenommen werden und über Signaltransduktionswege auf die Ependymin-Expression einwirken. In der Abbildung 3.2 sind die beiden Regelkreise graphisch dargestellt.



**Abb. 3.2: Arbeitshypothese zur molekularen Wirkungsweise des Ependymins bei der synaptischen Konsolidierung.** Da es sich in der Graphik um eine beispielhafte Regulation während der durch Licht gesteuerten aktiven Meidekonditionierung handelt, werden hier zwei synaptische Verbindungen auf ein Typ I Neuron verstärkt. Zum Einen die Erregung, welche den unkonditionierten Stimulus (US) der Marginal-Faser (MF) repräsentiert, zum Anderen die Erregung, welche den konditionierten Stimulus (CS) der optischen Faser (OF) repräsentiert. Durch diese Verknüpfung wird erreicht, dass der optische Reiz zu einer Fluchtreaktion des Fisches führt, so dass er dem *shock* ausweicht und infolgedessen der Stress (Cortisol-Konzentration) gesenkt wird. Die Abbildung ist „Shashoua and Schmidt, 2004“ entnommen.

### 3. 4 Ependymin Related Proteins

Bereits 1986 konnten Schmidt und Mitarbeiter nachweisen, dass pyramidale Neurone des Ratten-Hippocampus in Zellkultur Anti-Ependymin Antiseren kreuzreaktiv binden konnten (Schmidt et al., 1986). Erst viele Jahre später wurde bestätigt, dass es Ependymin-verwandte Proteine auch in anderen Organismen gibt. Durch die ständige Erweiterung von Gendatenbanken konnten viele weitere Vertreter einer ganzen Familie von Ependymin-verwandten Proteinen gefunden werden, die *Ependymin Related Proteins* (ERPs). Zuerst wurde ein menschliches Homolog zum Ependymin in Zellkulturen von Darmkrebszellen gefunden, welches dort hochreguliert auftrat. Durch diesen Befund wurde es mit dem Namen *upregulated in colorectal cancer gene-1* (UCC1) versehen (Nimmrich et al., 2001). Nahezu zeitgleich wurde von einer anderen Arbeitsgruppe das gleiche Gen entdeckt und analysiert. Sie stellten fest, dass das UCC1 eine unvollständige Version darstellt. Sie konnten die gesamte Gensequenz aufdecken und nannten es, in Anlehnung an das ursprüngliche Molekül, *Mammalian Ependymin Related Protein 1* (MERP1)

(Gregorio-King et al., 2002). Anzumerken ist jedoch, dass es sich hier um das humane Homolog zum Ependymin handelt, nicht um das murine Molekül. Im Laufe der Zeit wurden immer weitere Vertreter der Ependymin-Familie gefunden, sowohl in den verschiedensten Organismen, als auch in verschiedenen Geweben. So wurden sogar Vertreter in so basalen Organismen wie der Seegurke und dem Seeigel entdeckt (Suarez-Castillo et al., 2004). Bis zum Jahr 2007 wurden bereits 74 Vertreter der Ependymin-Familie gezählt, infolgedessen die Arbeitsgruppe um Suarez-Castillo eine Einteilung der Vertreter in vier verschiedene Gruppen, basierend auf deren phylogenetischer Abstammung, durchführte (Suarez-Castillo and García-Arrarás, 2007):

- *FishBrain*: Diese Proteine kommen nur im Gehirn von Knochenfischen vor. Das ursprüngliche Ependymin gehört dieser Gruppe an.
- *FishTj*: Vertreter dieser Gruppe kommen ebenfalls nur bei den Fischen vor, sind jedoch nicht auf das Gehirn als Gewebe beschränkt.
- *MERP*: Eine hohe Heterogenität zeichnet diese Gruppe aus. Die Proteine sind weder Gewebe spezifisch, noch kommen sie ausschließlich bei Säugern vor, wie der Name implizieren würde. Die Gruppe ist lediglich nach dem ersten bekannten Mitglied benannt, dem humanen MERP1. Die hier untersuchten murinen MERP1 und MERP2 sind dieser Gruppe zugeordnet.
- *Basal*: In dieser Gruppe sind Vertreter der basalen Organismen zu finden. Manteltiere, Lanzettfischchen (Deuterostomia), sowie Mollusken (Protostomia) sind Vertreter dieser Gruppe.

Die meisten Untersuchungen wurden bisher am humanen MERP1 durchgeführt, sowie an dessen murinen Pendanten, dem muMERP1 und muMERP2. Allen gemein ist eine hohe Konservierung bestimmter Sequenzen. Allen voran die vier Cysteine an den Positionen 42,113,172 und 210 könnten eine wichtige Rolle bei der Faltung und somit der Struktur des Proteins spielen (Apostolopoulos et al., 2001). Für das humane MERP1 vermuten Gregorio-King und Mitarbeiter für diese Cysteine die Eigenschaft, dass sie, homolog zum Ependymin, an einer Dimerisierung mit einem weiteren MERP1 beteiligt sein könnten (Gregorio-King et al., 2002). Diese Vermutungen werden weiter dadurch bestärkt, dass auch die Hydrophathie-Profile der ERPs sich äußerst ähnlich darstellen (Apostolopoulos et al., 2001). Anhand dieser Profile wurde vermutet, dass eine transmembranäre Struktur durchaus möglich sei. Dazu passend wird für das humane MERP1 vermutet, dass es sich aus einem transmembranären, einem intrazellulären und einem extrazellulären Bestandteil zusammensetzt. Der extrazelluläre Anteil ähnelt hierbei dem Ependymin, der intrazelluläre jedoch der cytoplasmatischen Domäne der transmembranären Glycoprotein-Familie der Protocadherine (Gregorio-King et al., 2002).

Die Eigenschaften des humanen MERP1 scheinen jedoch vor allem beim muMERP1 ebenfalls anzutreffen zu sein. Ihre Sequenzübereinstimmung beträgt im *open reading frame* 99%. Zwischen dem muMERP1 und dem muMERP2 liegt diese Aminosäure-Übereinstimmung jedoch lediglich bei 78% (Apostolopoulos et al., 2001). Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass das humane MERP1 und das murine MERP1 zeitgleich und später als das murine MERP2 im phylogenetischen Vergleich entstanden sind, wahrscheinlich durch eine Duplikation des Gens (Suarez-Castillo et al., 2007).

Über die intrazelluläre Lokalisation des murinen MERPs wurde kontrovers diskutiert. Kollmann und Mitarbeiter zeigten, dass in Mausfibroblasten das MERP in der lysosomalen Matrix vorliegt (Kollmann et al., 2005). Della Valle und Mitarbeiter widersprachen dem jedoch und lokalisierten das MERP ebenfalls im Lysosom, jedoch gelöst (Della Valle et al., 2006). Somit ist die intrazelluläre Verteilung des MERPs weiter umstritten. Jedoch scheint es nicht nur am oder im Lysosom zu lokalisieren zu sein, da sowohl dem humanen MERP1, als auch den murinen MERP1 und MERP2 gemeinsam ist, dass sie charakteristische Sekretionssequenzen aufweisen. Somit wäre eine Ortung des Moleküls innerhalb von Transportvesikeln weniger überraschend und wahrscheinlicher gewesen (Apostolopoulos et al., 2001; Gregorio-King et al, 2002; Suarez-Castillo et al, 2007).

Im Hinblick auf die Entdeckung immer neuer Mitglieder der Ependymin-Familie und die gewebeübergreifende Verbreitung, sind die Funktionen der Moleküle außerhalb des Goldfischgehirns noch recht unbekannt. Es liegt in der Natur des Menschen, dass ein besonderes Interesse den ERPs in der Säugerfamilie gegenüber gilt. In dieser Arbeit soll anhand des Modellorganismus' der Hausmaus überprüft werden, ob neben der phylogenetischen, einer eventuellen strukturellen, auch eine mögliche funktionelle Verwandtschaft zwischen dem im Gehirn exprimierten murinen MERP1 und 2 und dem namensgebenden Ependymin des Goldfisches besteht. Daher wurden die Mäuse einer räumlichen Lernaufgabe unterzogen, dem Morris Water Maze, und im Anschluss daran die Gehirne entnommen und für verschiedene Versuchsansätze weiterverwendet. Zum einen sollte mittels *in-situ* Hybridisierung der Bildungsort innerhalb des Gehirns bestimmt werden. Desweiteren sollte sowohl durch die gleiche Methode, als auch durch die reverse Transkriptase PCR eine Zeitverlaufskurve der mRNA Expression erstellt werden. Abschließend wurde mit immunhistochemischen Methoden versucht, das Protein innerhalb des Mausgehirns zu lokalisieren. Diese Ergebnisse sollten den Kenntnisstand über die murinen MERPs des Mausgehirns verbessern und sie der Entschlüsselung ihrer Funktion näher bringen.

## 4. Material und Methoden

### 4. 1 Material

#### 4. 1. 1 Chemikalien

50 x Denhardts	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Hybaid GmbH Heidelberg
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bovine Serum Albumin (BSA)	AppliChem, Darmstadt
Dextransulfat	AppliChem, Darmstadt
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	AppliChem, Darmstadt
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	AppliChem, Darmstadt
Dinatriummonohydrogenphosphat-dihydrat	Fluka, Steinheim
Dithiothreitol (Clelands Reagenz; DTT)	Roth, Karlsruhe
Essigsäureanhydrid	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethylphenylpolyethylenglykol (Nonidet P40; NP40)	Shell Chemicals
Formaldehyd	Sigma, Steinheim
Formamid	Roth, Karlsruhe
Gelatine	Sigma, Steinheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycogenlösung	Novagen, Darmstadt
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, Steinheim
Hering-Sperma DNA	Merck, Darmstadt
Kalium-Chrom(III)-Sulfat (Chromalaun)	Uni-Klinikum, Gießen
Isopropanol	Sigma, Steinheim
2-Methylbutan (Isopentan)	Roth, Karlsruhe
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	VWR, Haasrode, Belgien
mRNA Aufreinigungs Kit <i>Straight A's</i> <sup>TM</sup>	Novagen, Darmstadt
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Serva, Heidelberg
PCR-Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
5 x Reaktionspuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase-ExitusPlus	AppliChem, Darmstadt
Reverse Transkriptase Kit <i>Revert Aid</i> <sup>TM</sup>	Fermentas, St. Leon-Rot
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Thionin (C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub> SCl)	Merck, Darmstadt
Triethanolamin-Base	Aldrich, Steinheim
Tri-Reagent	Sigma, Steinheim
Tris HCl	Roth, Karlsruhe

Tris Base  
t-RNA aus Hefe  
Tween 20

Roth, Karlsruhe  
Boehringer Mannheim,  
AppliChem, Darmstadt

#### 4. 1. 2 Gebrauchswaren

Aluminiumfolie  
Einbettmedium für Gefrierschnitte für Laborgebrauch  
Glaswaren  
Handschuhe  
Objektträger/Deckgläschen  
Pasteurpipetten  
Photokleber  
  
Präparierbesteck  
Präzisionswischtücher  
Pipettenspitzen  
Plastikwaren  
Reaktionsgefäße  
Screens

Toppits, Minden  
Jung, Nussloch  
MAGV, Rabenau  
MAGV, Rabenau  
MAGV, Rabenau  
MAGV, Rabenau  
Marabu,  
Bietigheim-Bissingen  
MAGV, Rabenau  
Kimberly-Clark, Dallas  
MAGV, Rabenau  
MAGV, Rabenau  
Eppendorf, Hamburg  
Fuji Film, Freiburg

#### 4. 1. 3 Geräte

Chemilmager  
  
*Eraser*  
Feinwaage  
Einbett-Plattform  
  
Fluoreszenzmikroskop AX 70  
Flüssigszintillationszähler  
*Liquid Scintillation Analyser*  
*Tri-Carb 2900 TR*  
Microimager  
  
Microtom HM 500 OM  
Microtom Hyrax C20  
Nanophotometer  
Phosporimager FLA 7000  
Thermocycler PTC-100  
  
Thermocycler GenAmp  
Thermocycler 60  
Tischzentrifuge BioFuge 13  
Wasserbad GFL 1083

AlphaInnotech Corp.,  
Hess. Oldendorf  
Raytest, Straubenhardt  
Satorius  
Feinmechanische  
Werkstatt; JLU Gießen  
Olympus, Hamburg

PerkinElmer, Rodgau  
Biospace,  
Paris/Frankreich  
Microm, Walldorf  
Zeiss, Jena  
Implen, München  
Fuji Film, Freiburg  
MJReserch,  
Minnesota/USA  
PerkinElmer, Rodgau  
Bachofer, Reutlingen  
Heraeus  
GFL, Burgwedel

#### 4. 1. 4 Verwendete Software

Chemilmager	AlphaEase™ v5.1 AlphaInnotech Corp., Hess. Oldendorf
Chemilmager	AIDA Image Analyzer v4.22 Raytest, Straubenhardt
Fluoreszenzmikroskop	AnalySIS, Soft Imagine System GmbH, Münster
Mikrolmager	Betavision Analysis, Biospace, Paris/Frankreich
Phosporlmager	AIDA Image Analyzer v4.22 Raytest, Straubenhardt

#### 4. 1. 5 Synthetische Oligonukleotide

Die beiden für die ISH verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG, Ebersberg synthetisiert und im lyophilisierten Zustand erworben, mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 10 µM (10 pmol / µl) eingestellt und als Stocklösung bei -20°C gelagert. Verwendet wurde eine Konzentration von 2 pmol / µl.

Mumer 2.5

5' - AGA AGA ACA GCA AGA TCC TAT GAA ACT TGG ATC GGC GTT TAT ACA  
GCC AAG GAT TGT TAT CCG G - 3'

Bp = 64

Mumer SR

5' - GTC GAG ATA CGT GAT CGG TAA ACG TAG TCA CGA TAA TGC AGA GTA  
AGT CCA ACA GTC ACT ATT G - 3'

Bp = 64

Mumer 2.5	antisense	Länge = 64 Bp	MW = 11135 g/mol
		TM = 69,23 °C	

Mumer SR	randomisiert	Länge = 64 Bp	MW = 11135 g/mol
		TM = 69,23 °C	

Die Bezeichnung Mumer bezieht sich auf das Protein und bedeutet murine mammalian ependymin related 2. Die .5 bezieht sich auf die chronologische Reihenfolge, in welcher verschiedene Sonden auf ihre Eignung für die ISH getestet wurden. SR steht für „Sonde Randomisiert“ und bezieht sich auf die Sonde Mumer 2.5. Diese Sonde wurde als Kontrolle zur verwendeten Sonde benutzt und besteht aus der gleichen Anzahl an den jeweiligen Nukleotiden, jedoch in einer

randomisierten Reihenfolge. Auch Kontrollen mit nicht-komplementären sog. *sense*-Sonden wurden getestet. Diese haben eine zur Zielsequenz identische Basen-Zusammensetzung und können somit nicht an ihr binden. Jedoch erwiesen sich in diesen Versuchsreihen die randomisierten Sonden als zuverlässiger.

Die thermodynamische Schmelztemperatur  $T_m$  für die Oligonukleotide konnte nicht so ohne Weiteres berechnet werden. Zwar gibt es Berechnungsmöglichkeiten für Sonden mit einer Länge über 250 Bp, die hier verwendeten Sonden waren jedoch wesentlich kürzer. Eine empirische Bestimmung von  $T_m$  ist jedoch unabhängig von einer Berechnungsmöglichkeit von Nöten, da es eine hohe Variabilität an Reaktionsbedingungen besteht. Grundsätzlich gilt aber, dass die Schmelztemperatur von RNA:DNA-Hybriden 10 - 15°C und die von RNA:RNA-Doppelsträngen 20 - 25°C höher liegen, als die Schmelztemperaturen von DNA:DNA-Doppelsträngen (Jackson et al., 1994).

Für die Reverse Transkriptase PCR wurden folgende Primer verwendet:

m1eppr1<sub>for</sub> = 5' - GCC AGG TTA TGT ACC AGC CAA A - 3' Bp = 22  
 m1eppr8<sub>rev</sub> = 5' - GTT GAG CCC GTC GTA GGA - 3' Bp = 18

m2eppr1<sub>for</sub> = 5' - ACC AGT GTG CAA AGA TCC CC - 3' Bp = 21  
 m2eppr2<sub>rev</sub> = 5' - GTC TCC TGG ACC GGA TAA CA - 3' Bp = 20

mbetaacpr1<sub>for</sub> = 5' - TGT TAC CAA ACT GGG ACG ACA - 3' Bp = 21  
 mbetaacpr2<sub>rev</sub> = 5' - TCT CAG CTG TGG TGG TGA AG - 3' Bp = 20

m = mammalian; 1 bzw. 2 = MERP1 bzw. 2; eppr = ependymin related protein primer; betaacpr =  $\beta$ -Actin primer; 1, 2 bzw. 8 = Laufende Nummern; for = forward; rev = reverse.

Die Primer wurden in einer Konzentration von 100  $\mu$ M aufbewahrt. Synthetisiert wurden sie von der Firma Operon, Hilden.

#### 4. 1. 6 Radioaktivität

[ <sup>35</sup> S]- $\alpha$ -dATP	46,3 TBq / mmol	9,25 MBq / 20 $\mu$ l
	1250 Ci / mmol	250 $\mu$ Ci / 20 $\mu$ l
	PerkinElmer, Rodgau	

#### 4. 1. 7 Enzyme und Kits

DNase I und Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
Reverse Transkriptase und Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
Ribolock	Fermentas, St. Leon-Rot
Straight A's Systems Reagent	Novagen, Darmstadt
Taq-DNA-Polymerase I und Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
Terminale Desoxynukleotidyl Transferase (TDT)	Fermentas, St. Leon-Rot

#### 4. 1. 8 Antiseren

<u>Name</u>	<u>Erzeuger-Organismus</u>
Anti-Ependymin <i>Perseus</i>	Kaninchen
Anti-Ependymin <i>Beteigeuze</i>	Kaninchen
Anti-Epdr I	Kaninchen
Anti-GFAP	Kaninchen
Präimmunes Kaninchenserum	Kaninchen
IGG Alexa 488	Ziege
IGG Alexa 568	Ziege

*Perseus*, *Beteigeuze* und präimmune Kaninchenserum wurden von Prof. Dr. R. Schmidt, Zentrale Biotechnische Betriebseinheit, Gießen bezogen. *Perseus* bindet als Immunogen das deglykosylierte monomere, cytoplasmatische Ependymin, *Beteigeuze* das bi-N-glykosylierte monomere, cytoplasmatische  $\beta$ -Ependymin. Anti-Epdr I wurde von der Firma Abnova, Heidelberg bezogen, dessen Immunogen ist das humane Epdr I Protein. Anti-GFAP, IGG Alexa 488 und IGG Alexa 568 wurden von der Firma Invitrogen, Darmstadt bezogen.

#### 4. 1. 9 Objektträger

##### 1.9.1 Chromalaun-Gelatine beschichtete Objektträger

0,5% Gelatine  
0,05% Chromalaun  
0,02% Natriumazid  
→ In ddH<sub>2</sub>O lösen.

Objektträger in die Lösung tauchen und über Nacht trocknen lassen.

## 1.9.2 Gelatine beschichtete Objektträger (RNase-frei)

Kochen in Seifenlauge 15 Min lang

→ Spülen mit E-Wasser

→ Spülen mit ddH<sub>2</sub>O

Waschen in 25%iger Salzsäure- / 96%igem Ethanol-Gemisch 10 Min lang

→ Spülen mit ddH<sub>2</sub>O

→ Spülen mit DEPC-H<sub>2</sub>O

→ Trocknen im Sterilisator bei 180°C 6 Std lang

Tauchen in 0,5% Gelatine-Lösung (in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst)

→ Trocknen im Sterilisator bei 40°C 12 Std lang

→ 1x wiederholen

Objektträger in RNase- und staubfreien Behältern bis zur Verwendung aufbewahren

## 4. 2 Versuchstiere

Tierart: Inzuchtmaus Stamm C57BL/6J

Geschlecht: Weiblich

Alter: 3 - 4 Wochen

Ab der zweiten postnatalen Woche wird die Maus nicht mehr als Nestling bezeichnet. Sie beginnt das Nest nicht mehr zufällig, sondern gezielt zu verlassen. Daher ist der zu erwartende Stress im Versuchsansatz nicht höher einzuschätzen, als er in der Natur beim Erkunden des Lebensraums auftreten könnte. Die Entscheidung fiel zu Gunsten von 3 - 4 Wochen alten Tiere, da die zentralnervöse Plastizität zu diesem Entwicklungszeitpunkt noch stark ist, aber mit fortschreitendem Alter nachlässt. Entsprechend ist in diesem Entwicklungszustand die zu erwartende Konzentration des MERP1 und des MERP2 am höchsten.

Farbe: Schwarz

Lieferant: Charles River Germany  
Niederlassung Sulzfeld  
Sandhof Weg 7  
97633 Sulzfeld

Ursprung: Die Zuchtkolonie dieses Stammes ist mit Original JAX Mice (eingetragenes Handelszeichen des The Jackson Laboratory) aufgebaut und wird systematisch mit pedigreed Zuchtpaaren von The Jackson Laboratory erneuert. (Charles River, 2013)

JAX™ Stock Nummer: 000664

Haltung: Die Haltung der Mäuse erfolgte im Tierstall der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit unter Standardbedingungen (Raumtemperatur 22°C, relative Luftfeuchte 60 ± 5%, zwölfstündiger Tag-/Nacht-Rhythmus). Die Versuchstiere wurden in Gruppen von 2-6 Mäusen mit dem Standardeinstreu (Alltromin® G10) in Kunststoffkäfigen (Makrolon® Normtyp II und III) gehalten. Alle Tiere erhielten Trinkwasser und Standardfutter (Alltromin® Nr. 1320, Alltromin, Lage) *ad libitum*.

Mäuse sind klassische Modellorganismen für die biomedizinische Forschung. Für das Verständnis menschlicher Erkrankungen ist die Maus eines der wichtigsten Versuchstiere. Das Erbgut von Mensch und Maus gleicht sich weitgehend und bildet ein Kerngenom, das entwicklungsgeschichtlich zu erklären ist. Denn Nagetiere zählen nach den Primaten zu unseren nächsten Verwandten. Mehr als 90 Prozent der Mausgene haben eine Entsprechung beim Menschen. Außerdem wurden für fast alle beim Menschen bekannten Krankheitsgene Pendanten bei der Maus gefunden und viele der bereits aufgeklärten molekularbiologischen Mechanismen lassen sich von der Maus auf den Menschen übertragen. Daher wurden die durchgeführten Versuche an diesem Mausstamm durchgeführt. Desweiteren zeigt der ausgewählte Mausstamm ein gutes Lernverhalten im Morris-Water-Maze (Morris, 1984; Stavnezer et al., 2002; Wolff et al., 2002).

Eine in den letzten Jahren immer häufiger verwendete Methode in der medizinischen Forschung ist, gezielte Mutationen im Erbgut der Maus herzustellen und auf diese Weise bestimmten Krankheiten auf den Grund zu gehen. Die Herstellung von so genannten *Knock-out*- oder *Knock-in*-Tieren ist bei Mäusen wesentlich leichter als bei anderen Nagetieren wie z.B. der Ratte. Es stehen C57BL/6J Mausstämmen zur Verfügung, die eine genetische Veränderung in verschiedenen neuronalen Zelladhäsionsmolekülen besitzen (Cremer et al., 1994; Frints et al., 2003; Law et al., 2003). Als ein Test auf die Auswirkungen auf das Lernvermögen dieser Mausmutanten spielt das Morris Wasserlabyrinth bis heute eine wichtige Rolle (Albarran-Zeckler et al., 2012; Lowry et al., 2013; Lugo et al., 2012).

## 4. 3 Methoden

### 4. 3. 1 Morris-Water Maze

Bei diesem räumlichen Lernversuch handelt es sich um eine Trainingsmethode mit Hilfe eines Wasserlabyrinths (Morris Water Maze; MWM).

Für die Durchführung des Versuchs wird eine Wanne mit Wasser gefüllt, in der es eine kleine, für die Mäuse unsichtbare Plattform, 5 mm unter dem Wasserspiegel, gibt. Das Wasser hat eine Temperatur von 24°C und ist mit Milchpulver getrübt. Die Wanne hat einen Durchmesser von 1 m, der Durchmesser der Plattform beträgt 8 cm. Die Versuchstiere werden in 2 Trainingseinheiten von 120 Sek. trainiert. Die Mäuse haben 2 min. Zeit, die Plattform im Wasser zu finden, nachdem sie vorsichtig in das Wasser gelassen worden sind. Sollten die Mäuse die Plattform nicht innerhalb der angegebenen Zeit entdecken, werden sie nach dieser Zeit vom Experimentator

auf die Plattform geleitet. Alle Mäuse, welche die Plattform erreicht haben, verbleiben dort für einen Zeitraum von 30 Sek., um sich die räumliche Lage der Plattform einprägen zu können. Dazu sind in der Umgebung Symbole zur Orientierung angebracht. Durch das Absetzen auf Zellstoffpapier werden die Mäuse im Anschluss getrocknet. Die zweite Trainingseinheit erfolgt nach einer Pause von 5 min. Bis zudem Beginn der nächsten zwei Trainingseinheiten haben die Tiere eine Pause von 30 min. Diese Pausen verbringen die Mäuse bei Artgenossen in ihren Käfigen, in denen sie Wasser und Nahrung *ad libitum* gereicht bekommen.

Nach dem MWM wurden die Mäuse erneut zu ihren Artgenossen gebracht. Dort verblieben sie bis zum Zeitpunkt der Präparation. Dieser Zeitpunkt war abhängig davon, zu welcher der folgenden vier Gruppen sie zugeteilt wurden:

1. Tötungszeitpunkt nach dem Lernerfolg: 30 Minuten
2. Tötungszeitpunkt nach dem Lernerfolg: 60 Minuten
3. Tötungszeitpunkt nach dem Lernerfolg: 120 Minuten
4. Tötungszeitpunkt nach dem Lernerfolg: 180 Minuten

Schema des Ablaufs des Morris Water Maze:

- Erste Trainingseinheit; Dauer: maximal 150 Sekunden
- Erreichen der Plattform oder geleiten zur Plattform nach 120 Sekunden; Verbleib auf der Plattform: 30 Sekunden
  
- Pause im Transportkäfig; Dauer: 5 Minuten
  
- Zweite Trainingseinheit; Dauer: maximal 150 Sekunden
- Erreichen der Plattform oder Geleiten zur Plattform nach 120 Sekunden; Verbleib auf der Plattform: 30 Sekunden
  
- Pause im Käfig mit den Artgenossen; Dauer: 30 Minuten
  
- Dritte Trainingseinheit; Dauer: maximal 150 Sekunden;
- etc. bis das Lernziel erreicht wurde.
  
- Verbleib im Käfig mit den Artgenossen bis zur Präparation; Dauer: Abhängig von der Einteilung in die Gruppen „30 Minuten“, „60 Minuten“, „120 Minuten“ oder „180 Minuten“.
- Präparation

#### **4. 3. 2 Gehirn Präparation**

Die Tötung der Versuchstiere erfolgt durch eine Luxation der Halswirbelsäule (HWS) ohne Betäubung. Anästhetika würden eventuell auf die Ergebnisse der Untersuchungen der molekularbiologischen Lernmechanismen Einfluss nehmen, da sie mit den zu erforschenden biochemischen Funktionen interferieren könnten. Des Weiteren gilt die Tötung durch Luxation der HWS als schmerzloseste Methode (Arbeitsgemeinschaft der Tierschutzbeauftragten in Baden-Württemberg) und ist somit im Einklang mit dem TierSchG, §4 (1).

Anschließend wurden die Tiere dekapitiert. Das Fell wurde vom Nacken her über die Schädeldecke gezogen, der Schädel durch zwei Lateralschnitte geöffnet und das Gehirn mit einer gebogenen Pinzette aus der Schädelhöhle heraus präpariert. Das Gehirn wurde anschließend kurz in kaltem 1 x PBS gespült und je nach Verwendungszweck weiterverarbeitet.

Für die RT-PCR wurden die Gehirne in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur zeitnahen Verwendung bei -20°C gelagert.

Für die Immunfluoreszenz, sowie die *in-situ* Hybridisierung wurden die frisch präparierten Gehirne in eine eigens angefertigte Kupferform mit Gefriereinbettmedium (Jung-Einbettmedium für Gefrierschnitte, für Laborgebrauch, Leica Microsystems, Nussloch) gelegt. Die Kupferform bestand aus einer quaderförmigen „Plattform“ mit abnehmbaren Seitenwänden, an der ein Stiel befestigt war. Mit Hilfe des Stiels konnte das Gehirn in stickstoffgekühltes, schmelzendes Isopentan (-160°C) eingetaucht werden. Anschließend wurden die Seitenwände über der „Plattform“ entfernt und das Gehirn entnommen. Gefrorene Gehirne wurden bis zur Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt oder direkt weiterverarbeitet.

#### **4. 3. 3 Herstellen der Kryoschnitte für die ISH und IF**

Es wurden 12 µm dicke Schnitte in einem Gefriermikrotom (HM 5000M, Microm oder Hyrax C20, Zeiss) bei -22°C Box- und -20°C Objekttemperatur ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) angefertigt. Die Schnitte für die ISH wurden auf Gelatine, die Schnitte für die IF wurden auf Chromalaun-Gelatine beschichteten Objektträgern aufgenommen und auf einer Heizplatte bei 37°C 10 Minuten lang getrocknet. Die so vorbereiteten Schnitte wurden sofort weiter verarbeitet.

#### **4. 3. 4 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion**

Die Methode der Reversen Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine Methode, um die Genexpression auf dem Niveau der mRNA darzustellen. Das Verfahren beruht auf drei grundlegenden Mechanismen: Als Erstes muss die RNA isoliert werden. Daraufhin wird diese mittels der Reversen Transkriptase in eine komplementäre Sequenz umgeschrieben. Somit ist sie identisch zur entsprechenden, dieser RNA zu Grunde liegenden, DNA. Daher wird diese Sequenz auch als *copyDNA* oder cDNA bezeichnet. Im letzten Schritt wird diese cDNA amplifiziert. Hierdurch ergeben sich Konzentrationen, welche hoch genug sind, um sie ihrer Größe nach mittels Gelelektrophorese aufzutrennen und nachzuweisen.

Bei dieser Methode handelt es sich um eine semiquantitative Analyse der mRNA Expression: Beim Auswerten werden die Ergebnisse in Gruppen zusammengefasst und im Verhältnis zu einem *housekeeping gene* (hkg) verglichen. Theoretisch müsste es bei jedem Zyklus der PCR zu einer Verdoppelung der vorhandenen DNA kommen. Jedoch ist es in der Praxis eher richtig, von einer Vermehrungsrate von 1,7 bis 1,9, seltener sogar von 1,5 bis 2,0 auszugehen (Pfaffel, 2004). Bei der sogenannten *real time quantification*-PCR (RTq-PCR) wird mittels Fluoreszenz-Signal die Konzentration der DNA nach jedem Zyklus der PCR bestimmt. Somit lässt

sich die kurze Phase der wirklichen exponentiellen Vermehrungszyklen der PCR erfassen. Daraus kann auf die genaue Ausgangskonzentration der ursprünglich eingesetzten Proben geschlossen werden.

Ein Vorteil der semiquantitativen Untersuchung ist der Abgleich der Ergebnisse mit einem hkg. Durch dieses Verfahren werden die Ergebnisse nicht nur in einen Zusammenhang mit einem Gen gesetzt, welches sein Expressionsmuster nicht verändert, sondern sie werden ebenfalls von weiteren individuellen Schwankungen innerhalb des Versuchsablaufs bereinigt, da auch das Referenzgen diesen unterworfen war. Somit sollte es beim Vergleich der endgültigen Werte miteinander zu geringeren Varianzen kommen.

Alle Versuchsschritte wurden nach den Herstellerangaben der jeweiligen Kits durchgeführt. Veränderungen der Herstellerprotokolle erfolgten auf Grundlage eigener und laborinterner Versuche (Schmidt, 2011; Schmidt und Hinchliffe, 2012).

#### 4. 3. 4. 1 Isolierung der gesamt-RNA

Die Isolierung der gesamt-RNA (gRNA) ist der erste Schritt, um eine semiquantitative Aussage über die MERP1 und MERP2 mRNA-Konzentration zu machen. Hierzu werden zuerst die Zellen der zuvor präparierten Mausgehirne aufgeschlossen. Das erfolgt mechanisch durch einen Mörser. Zusätzlich wird mit der Zugabe des so genannten TRI-Reagent eine chemische Isolation erreicht. Die Grundlage des TRI-Reagent bilden Untersuchungen von Chomczynski und Mitarbeitern. Die Methode umfasst neben der Denaturierung durch Guanidiniumthiocyanat, einem sehr effektiven Protein- Denaturierungsmittel, durch das auch RNAsen und andere Enzyme inaktiviert werden, auch eine Phenol-Chloroform Extraktion in einem Reaktionsschritt (Chomczynski and Sacchi; 1987). Die Ergebnisse waren sehr überzeugend und das Reaktionsprotokoll wurde im Laufe der Zeit weiterentwickelt. Unter anderem wurde die RNA-Präzipitation aus der flüssigen Phase durch den Einsatz von Isopropanol in Verbindung mit einer hohen Salzkonzentration dem Protokoll hinzugefügt (Chomczynski and Mackey; 1995).

Am Ende dieses ersten Schritts erhält man die gRNA und kann diese zum einen photometrisch auf ihre Konzentration untersuchen, zum anderen können Teile der Proben zur Kontrolle mittels Gelelektrophorese verwendet werden (vergl. 3.4.6).

Isolation:	100 mg Gewebe / 5-10 x 10 <sup>6</sup> Zellen in 1 ml TRI-Reagent in einem Homogenisator aufbrechen
Zentrifugation:	10 Min bei 12.000 g → Überstand abnehmen und 5 Min bei RT stehen lassen
Fällung:	200 µl Chloroform pro 1 ml eingesetztem TRI-Reagent → Gemisch 15 Sek resuspendieren → 5 Min bei RT stehen lassen → bei 4°C 15 Min bei 12.000 g abzentrifugieren
Phasentrennung:	obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen
RNA-Präzipitation:	500 µl Isopropanol / ml TRI-Reagent → Inkubation bei RT, 5 Min → bei 4°C 10 min bei 8.000 g zentrifugieren → Überstand verwerfen und Sediment mit 200 µl 75 % Ethanol waschen und anschließend trocknen lassen
Lösen:	in 200 µl DEPC-H <sub>2</sub> O

#### 4. 3. 4. 2 Selektive Anreicherung der mRNA

Während dieses Schritts wird die mRNA von der restlichen RNA getrennt. Dies erfolgt durch den Einsatz sogenannter *Magnetight™ Oligo(dT) Particles*. Dabei handelt es sich um Magnetkugeln, an welche oligo-dT-Nukleotide (in diesem Fall sind es 25 Basen) angeheftet sind. Sie können an den Poly A-Schwanz der mRNA binden. Durch den Einsatz eines Magneten kann nun der Komplex aus *Magnetight™ Oligo(dT) Particles* (Novagen, Straight A's Systems Reagent-Kit) und mRNA vom Rest der rRNA getrennt werden. Um eventuelle Proteinkontaminationen zu entfernen erfolgt anschließend noch eine Isopropanol-Fällung. Der Lysispuffer und der Waschpuffer entstammen ebenfalls dem Straight A's Systems Reagent-Kit.

Ansatz: 10 µg gRNA entspricht 20 % des Gesamtvolumen  
200 µg *Magnetight™ Oligo(dT) Particles*  
mit Lysispuffer auffüllen auf 100% Gesamtvolumen  
→ Inkubation bei RT 5 Minuten lang  
→ Rückhalten der gebundenen mRNA an den  
Metallpartikeln mit einem Magneten  
→ Überstand verwerfen

Waschen: 50 µl Waschpuffer pro Ansatz  
→ Partikel mit Magneten zurückhalten  
→ 1 x wiederholen  
→ in 500 µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendieren

Lösen der mRNA: Suspension bei 60°C 15 Minuten lang erwärmen  
→ freigewordene Partikel mit Magneten zurückhalten  
→ Überstand in neues Reaktionsgefäß überführen

Fällungsansatz: Überstand  
2 µl Glykogen (10 mg/ml)  
50 µl Natriumacetat (3 M)  
0,6 Vol. Isopropanol  
  
→ Zentrifugation bei 13 000 g 10 Minuten lang bei RT  
→ Überstand verwerfen  
→ Bodensatz mit 300 µl 70% Ethanol waschen  
→ eventuell kurz anzentrifugieren  
→ Ethanol abgießen  
→ trocknen ca. 15 Minuten lang

Lösen: in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O

Bei anhaltender, deutlich erkennbarer Trübung der Lösung (bräunlich; durch erhalten gebliebene *Magnetight™ Oligo(dT) Particles*), Wiederholen des Schritts „Lösen der mRNA“.

#### 4. 3. 4. 3 Reinigung der mRNA von genomischer DNA

Auch wenn im ersten Schritt der Aufreinigung die gRNA von allen anderen Zellkomponenten getrennt wurde, ist es nicht zu verhindern, dass sich ein Anteil der genomischen DNA dennoch mit in der gRNA-Lösung befindet. Dieser Anteil wurde während der mRNA-Aufreinigung weiter verringert, jedoch noch immer nicht vollkommen eliminiert. Daher wird im Folgenden ein DNase-Verdau mittels der Endonuklease DNase I durchgeführt. Diese Nuklease spaltet Einzelstrang- und Doppelstrang-DNA in Oligo- und Mononukleotide durch Hydrolyse zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxygruppe zweier Nukleotide, wodurch es zur Bildung von Nukleosid-5'-Phosphaten kommt. Somit spielt die verunreinigende genomische DNA bei der anschließenden reversen Transkription keine Rolle mehr.

Ansatz: 1 µg mRNA in 8 µL DEPC-H<sub>2</sub>O lösen  
1 µl 10x DNase I - Puffer  
→ 100 mM Tris-HCl (pH 7.5, 25°C),  
25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>  
1 µl DNase I (1 U / µl)

→ 45 Minuten lang inkubieren bei 37°C

Reaktionsstopp: Zugabe von 1 µl EDTA (25 mM)  
→ 10 Minuten lang erhitzen auf 65°C

#### 4. 3. 4. 4 Reverse Transkription

Die in den vorherigen Schritten erzeugte mRNA wird nun mittels Moloney Murines Leukämievirus (M MuLV) Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die M MuLV Transkriptase stammt aus Retroviren und wurde zur kommerziellen Verwendung modifiziert. Benannt ist sie nach ihrem Entdecker John B. Moloney (Moloney, 1960). Da es sich bei diesem Enzym um eine DNA-Polymerase handelt, benötigt sie zum Start der Reaktion einen Primer. Da hier mRNA in cDNA umgeschrieben werden soll, werden als Primer Oligo(d)T-Primer verwendet. Diese mehrere Basen langen Thyminen können sich an den Poly-Adenosin-Schwanz der mRNA an deren 3'-Ende anlagern und bilden somit den Ausgangspunkt zur Polymerisierung des mRNA-Stücks.

Zusätzlich werden in dem Ansatz, neben dem mRNA-Template, der Reversen Transkriptase und den Oligo (d)T-Primern, auch desoxy-Nukleotid Tri-Phosphate (dNTP) gebraucht. Diese bilden die Bausteine, welche als komplementären Basen zur cDNA zusammengesetzt werden.

Ferner wird zu der Reaktion ein RNase Inhibitor hinzugegeben. Somit soll der ungewollte Abbau der mRNA verhindert werden.

Abgestoppt wird die Reaktion durch Inaktivierung mittels Hitze.

Ansatz: 0,5 - 1 µg mRNA  
0,5 µg Oligo(dT)<sub>18</sub>- Primer  
→ in einem Volumen von 12 µL lösen  
→ 5 Minuten lang denaturieren bei 70°C  
→ auf Eis kühlen

Zugabe von: 4 µl 5x Reverse Transkriptase-Puffer  
→ 50 mM Tris-HCl (pH 8.3, 25°C), 75 mM KCl,  
3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT  
2 µl dNTP- Mix (10 mM)  
1 µl RiboLock™ RNase Inhibitor  
→ 5 Minuten lang vorinkubation bei 37°C

Zugabe von: 1 µl RevertAid™ Reverse Transkriptase (200 u/µl)  
→ 60 Minuten lang inkubieren bei 42°C

Reaktionsstopp: 10 Minuten lang erhitzen auf 70°C

#### 4. 3. 4. 5 Polymerase Kettenreaktion

Im abschließenden Schritt des Versuchs wird die zuvor hergestellte cDNA amplifiziert. Zu diesem Zweck wird eine DNA-Polymerase, die *Taq*-DNA-Polymerase I, verwendet. Hierbei steht das *Taq* für *Thermus aquaticus* und beschreibt den Organismus, in welchem dieses thermostabile Enzym entdeckt wurde. Die Hitzebeständigkeit resultiert hierbei wohl aus der Mutation von zwei *cold shock proteins* (Perl et al., 2000). Durch diese Veränderung ist es der *Taq*-Polymerase möglich, Temperaturen von 95°C auszuhalten, ohne ihre Funktionalität zu verlieren. Dies ist die Grundvoraussetzung dafür, dass die PCR überhaupt automatisiert und somit effizient als eine der gängigsten Labormethoden eingeführt werden konnte.

Die Aufgabe der Polymerase ist es, die vorhandene cDNA zu erkennen, an sie zu binden und diese dann zu vervielfältigen. Um die cDNA aber zu amplifizieren benötigt sie Primer. Diese Primer sind kurze Oligonukleotide, welche komplementär zu einer bestimmten Stelle der cDNA sind. Daher bestimmt ihre Sequenz, an welchem Punkt sie sich anlagern können und somit auch den Startpunkt der Polymerase. Zu jeder zu vervielfältigenden Sequenz müssen zwei Primer zugegeben werden. Der erste definiert auf dem ersten Strang die Startsequenz, der zweite definiert die Startsequenz auf dem zweiten Strang. Somit umschließen sie den Abschnitt der cDNA, welcher vervielfältigt wird. Damit sich die Primer jedoch an die Stränge anlagern können, müssen diese zuvor durch Erhitzen denaturiert werden. Wäre die DNA-Polymerase nicht thermostabil, so müsste man nun erneut das Enzym hinzugeben. So jedoch kann die Reaktion ohne erneute Zugabe weiter ablaufen.

Durch das Abkühlen auf eine Temperatur von etwa 5 - 10°C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer ergeben sich nun beste Bedingungen für die Anlagerung der Primer an die Matrizenstränge (*annealing*). Das Abkühlen auf diese Temperatur muss möglichst schnell ablaufen, damit eine Rückbildung zu DNA-Doppelsträngen verhindert wird.

Nachdem sich die Primer anlagern konnten, wird nun die Temperatur weiter auf 37°C gesenkt. Nun herrschen ideale Bedingungen dafür, dass die *Taq*-Polymerase ihre enzymatische Aktivität aufnehmen und mit dem Herstellen des komplementären Stranges beginnen kann (Elongation). Hierbei arbeitet sie vom 3'-Ende der cDNA in Richtung 5'-Ende. Somit haben wir nach dem ersten Zyklus der PCR Kopien, welche nur auf einer Seite durch den Startpunkt des ersten Primers definiert ist. Im zweiten Zyklus, welcher identisch abläuft, wird die Sequenz des zweiten Primer gebunden und somit auch dieses Ende definiert.

Damit die Amplifikation möglich ist, werden neben dem Enzym, den cDNA-Matrizen und den Primern noch weitere Bestandteile gebraucht. Wie schon bei der Reversen Transkriptase Reaktion werden auch hier dNTPs benötigt, welche als Bausteine für die neusynthetisierten DNA-Stränge dienen. Des Weiteren muss ein DNA-Polymerase-Puffer zugegeben werden. Dieser dient in erster Linie zur Stabilisierung der idealen Umgebungsbedingungen für das Enzym. Zusätzlich wird ebenfalls noch MgCl<sub>2</sub> hinzugegeben. Das Magnesium ist als Co-Faktor essentiell für die Funktion der Polymerase.

Durch das mehrmalige Durchlaufen dieser Zyklen wird die Konzentration der untersuchten cDNA-Sequenz immer weiter erhöht, so dass diese am Ende hoch genug ist, um einen Nachweis durch eine Gelelektrophorese zu ermöglichen. In dem hier beschriebenen Versuch wurden die Sequenzen vom MERP1, MERP2, sowie vom  $\beta$ -Actin (*housekeeping gene*; Kontrolle) amplifiziert.

Ansatz:	2	$\mu$ l	cDNA	(200 ng / $\mu$ l)
	1	$\mu$ l	Primer 1	(10 pmol / $\mu$ l)
	1	$\mu$ l	Primer 2	(10 pmol / $\mu$ l)
	0,5	$\mu$ l	dNTP-Mix	(je 2 mM)
	2	$\mu$ l	10x PCR-Puffer	
			→ 100 mM Tris-HCl (pH 8.8, 25°C),	
			500 mM KCl	
	1,6	$\mu$ l	25 mM MgCl <sub>2</sub>	
	1	$\mu$ l	Taq DNA Polymerase	(1 U / $\mu$ l)
	11,9	$\mu$ l	DEPC-H <sub>2</sub> O	

→ Die Anzahl der Zyklen betrug 28

#### 4. 3. 4. 6 Auswertung durch Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese handelt es sich um eine Möglichkeit, Moleküle anhand ihrer Größe und Ladung aufzutrennen. Durch das Anfertigen eines Gels und das Anlegen einer definierten Spannung über dieses Gel, werden die Parameter der Auftrennung bestimmt. Je größer die Spannung zwischen den beiden Polen der Gelkammer ist, desto schneller wandern die negativ geladenen Moleküle in Richtung der positiv geladenen Anode.

Der andere entscheidende Parameter für die Auftrennung ist die Beschaffenheit des Gels. Zum einen ist es wichtig, aus welchen Bestandteilen es gefertigt wurde. Bei der hier verwendeten Agarose-Gelelektrophorese kommt es zu Quervernetzungen und somit zu einem bestimmten Widerstand gegenüber der Wanderung der Moleküle in Richtung der Anode. Eine Neutralisierung der Ladung (wie bei der SDS PAGE der Proteine) ist nicht notwendig, da keine unterschiedlich geladenen Proteine, sondern gRNA, bzw. cDNA aufgetrennt werden. Aufgrund ihres Phosphat-Rückgrats sind alle Moleküle negativ geladen und wandern in Richtung der Anode.

Damit die aufgetrennten Nukleinsäuren auch ausgewertet werden können, müssen sie sichtbar gemacht werden. Dazu wird dem Gel, bzw. direkt dem Gemisch, welches auf das Gel aufgetragen wird, Ethidiumbromid (EtBr) hinzugefügt. Das EtBr hat die Eigenschaft, dass es in den Polynukleinsäuren interkaliert und sich sein Absorptionsspektrum dabei verschiebt. Seine Fluoreszenz-Emission erhöht sich deutlich (Borst, 2005). Somit erkennt man ein deutliches Signal, sobald EtBr an DNA/RNA gebunden und mit ultraviolettem Licht angeregt wird.

Zur Untersuchung der Nukleinsäure-Produkte wurden zwei unterschiedliche Agarosegele verwendet. Für die Analyse der gRNA wurde ein 1%iges 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS) Gel mit 37%igem Formaldehyd in DEPC-H<sub>2</sub>O verwendet. Ebenfalls wurde neben den gRNA-Proben ein *Marker* (*GeneRuler™ High Range RNA Ladder*, Fermentas) mit auf das Gel aufgebracht. Dieser enthält die beiden ribosomalen RNA (rRNA) Untereinheiten der Eukaryoten, die 28S- und die 18S-rRNA. Wenn in den Proben diese Banden deutlich zu sehen sind, so ist das ein eindeutiges Indiz dafür, dass die gRNA dort noch intakt ist. Somit dient diese Analyse als Kontrolle für die gRNA.

10x MOPS (1 l):            41,2 g MOPS  
                                  10,9 g Natriumacetat + 3H<sub>2</sub>O  
                                  3,7 g EDTA  
                                  800 ml DEPC-H<sub>2</sub>O  
                                  pH 7,0 mit NaOH eingestellt

→ ad 1000 ml DEPC-H<sub>2</sub>O

Gel (250 ml):            2,5 g Agarose  
                                  180 ml DEPC-H<sub>2</sub>O

→ schmelzen und auf ca. 60°C abkühlen lassen

25 ml 10x MOPS  
 45 ml 37%iges Formaldehyd

Um die cDNA nachzuweisen, wurde ein 2%iges Tris-Bor-EDTA-Gel (TBE) verwendet. Da es sich hierbei um cDNA handelt, konnte auf den Einsatz von DEPC-H<sub>2</sub>O verzichtet werden. Als *Marker* diente hier die Molekulargewichtsleiter *GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder* und deren Auftragspuffer der Firma Fermentas.

5x TBE (1 l):            54 g Tris-Base  
                                  27,5 g Borsäure  
                                  20 ml EDTA (0,5 M; pH 8,0)

→ ad 1000 ml DEPC-H<sub>2</sub>O

Gel (250 ml):            5 g Agarose  
                                  245 ml DEPC-H<sub>2</sub>O

→ schmelzen und auf ca. 60°C abkühlen lassen

1 µl EtBr

In beiden Fällen wurde die gleiche Spannung angelegt und das gleiche Zeitprotokoll verwendet; in Abhängigkeit von der verwendeten Gel-Größe.

Zeitablauf 250 mL:        30 Min 80 V  
                                  270 Min 120 V

Zeitablauf 50 mL:         30 Min 60 V  
                                  60 Min 100 V

Auch die aufzutragende Probenzusammensetzung war in beiden Fällen identisch.

Probe:            5,5 µl Probe + 5,5 µl Auftragspuffer + 1 µl EtBr  
Marker:          3,5 µl Marker + 7,5 µl Auftragspuffer + 1 µl EtBr

→ Auftragsvolumen: jeweils 10 µl

Auftragspuffer:        10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% Bromphenolblau, 0.03% Xylene  
                                  Cyanol FF, 60% Glycerin, 60 mM EDTA

#### 4. 3. 4. 7 Chemilmager

Zur Detektion der gRNA, bzw. der amplifizierten cDNA wurde EtBr verwendet. Dieses lässt sich durch bestrahlen mit ultraviolettem Licht deutlich sichtbar machen (vgl. Punkt 3.4.6). Hierzu wurde der Chemilmager 4400 mit dem Lichtkabinett Multimage™ der Firma AlphaInnotech Corp. verwendet. Der Chemilmager beinhaltet 6 UV-Leuchtstoffröhren, welche das aufgebraute Gel von unten bestrahlen. Oberhalb des Gels befindet sich in der Decke des Kabinetts eine CCD-Kamera, welche Aufnahmen von dem Gel machen und an einen Computer weiterleiten kann.

#### 4. 3. 5 *In-situ* Hybridisierung

Die *in-situ* Hybridisierung ist eine Methode, welche die Möglichkeit eröffnet, Polynukleinsäuren mittels Sonden in Geweben, Zellen, Zellkernen und Chromosomen sichtbar zu machen. Die *in-situ* Hybridisierung ist überaus nützlich, um sowohl DNA- als auch RNA-Sequenzen in Geweben, Zellen und intrazellulären Strukturen bis hin zu einzelnen Chromosomen zu lokalisieren. Im Gegensatz zur Nukleinsäureanalyse durch eine Southern- oder Northern-Blot Hybridisierung wird bei dieser Technik das Hybridisierungssignal nicht auf einer Trägermembran, sondern direkt im biologischen Präparat (*in-situ*) sichtbar. Bedeutung hat diese Technik auch für Untersuchungen räumlicher und zeitlicher Expressionsmuster von Genen erlangt.

Einerseits präpariert man das biologische Material für die ISH. Andererseits markiert man eine Nukleinsäuresequenz („Sonde“) durch Einbau eines radioaktiven oder nichtradioaktiven Markers. Unter kontrollierten experimentellen Bedingungen hybridisiert dann die einzelsträngige Sonde mit einer komplementären einzelsträngigen Nukleinsäuresequenz des biologischen Präparats. Das neu gebildete, doppelsträngige Molekül lässt sich auf Grund seiner Markierung nachweisen und die Stelle, an der die Hybridisierung stattgefunden hat, durch mikroskopische und digitale Verfahren sichtbar machen. Die Nachweismethode hängt von der Markierung der Sonde ab.



#### 4. 3. 5. 2 Sondenaufreinigung

Zur Aufreinigung des Reaktionsansatzes wurde eine Ethanol-Fällung durchgeführt. An deren Ende konnte die markierte Sonde aliquotiert bei -80°C bis zu 3 Wochen gelagert werden. Mittels Flüssigszintillationsmessung wurde die Effektivität der Markierung, sowie die später einzusetzende Menge der Sonde bestimmt.

Reaktionsansatz:	markierte Sonden	49	µl
	DEPC-dH <sub>2</sub> O	50	µl
	Glykogenlösung (10 mg/mL)	4	µl
	t-RNA (500 µg/µL)	2	µl
	Natriumacetat (3 M; pH 5,2)	10	µl
	Ethanol (100%; 0°C)	<u>285</u>	<u>µl</u>
		400	µl
	→ Resuspendieren		

3 Stunden lang bei -80°C inkubieren  
1 Stunde zentrifugieren bei 13 000 rpm, 4°C

Sediment mit 400 µl Ethanol (80%) waschen (abzentrifugieren)  
→ 2 x wiederholen

40 Minuten lang lufttrocknen  
Lösen in 50 µl DEPC-ddH<sub>2</sub>O  
→ 1 µl zur Aktivitätsbestimmung abnehmen!

Aliquotieren der Sondenlösung entsprechend der zu verwendenden Menge

#### 4. 3. 5. 3 Fixierung der Kryoschnitte

Unmittelbar nach dem Anfertigen der Kryoschnitte wurden diese fixiert. Dies dient sowohl der Konservierung der Gewebestruktur als auch dem Eindämmen der Aktivität von RNAsen und anderer abbauender Enzyme. Man muss jedoch beachten, dass eine zu starke Fixierung das Eindringen der Sonde in das Gewebe erschwert. Hier wurde eine Quervernetzung mit Paraformaldehyd vorgenommen.

Quervernetzung:	Paraformaldehyd (4%; 0°C)	5	Minuten
Waschen:	1 x PBS → 2 x wiederholen	5	Minuten
Entwässern: (fakultativ)	Ethanol (70% in DEPC-H <sub>2</sub> O)	1	Minute
	Ethanol (80% in DEPC-H <sub>2</sub> O)	1	Minute
	Ethanol (90% in DEPC-H <sub>2</sub> O)	1	Minute
	Ethanol (reinst)	1	Minute
	30 Minuten lang an der Luft trocknen		

Lösungen:

10x PBS (1l):            2,70 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O  
                              14,31 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
                              87,66 g NaCl  
                              ad 1000 ml DEPC-H<sub>2</sub>O, pH 7,4  
                              → autoklavieren

#### 4. 3. 5. 4 Acetylierung der Kryoschnitte

Ein weiterer Vorbehandlungsschritt ist die Acetylierung der Gewebeschnitte. Dieser Schritt dient der Neutralisierung von positiv geladenen Molekülen und basischen Proteinen zur Verhinderung unspezifischer Bindungen der Sonde.

3 Minuten lang in 0,1 M Triethanolamin in DEPC-H<sub>2</sub>O, pH 8 inkubieren

10 Minuten lang im gleichen Puffer (Triethanolamin) mit 0,25% (v/v) Essigsäureanhydrid acetylieren

Entwässern:            Ethanol (70% in DEPC-H<sub>2</sub>O) 1 Minute  
                              Ethanol (80% in DEPC-H<sub>2</sub>O) 1 Minute  
                              Ethanol (90% in DEPC-H<sub>2</sub>O) 1 Minute  
                              Ethanol (reinst)                1 Minute  
                              30 Minuten lang an der Luft trocknen

#### 4. 3. 5. 5 Prähybridisierung

Die Kryoschnitte werden in eine mit 50 % Formamid, 4x *saline sodium citrate* (SSC) befeuchtete, verdunstungssichere Kammer gebracht. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen und das Gewebe an die Umgebungsbedingungen anzupassen, wird zunächst mit Prähybridisierungslösung (die Hybridisierungslösung, aber ohne Sonde und ohne Dextransulfat) prähybridisiert. Das Präparat wird mit einem Ring aus Photokleber umrandet. Erst dann wird die Lösung auf die Objektträger gegeben und mit einem Deckplättchen bedeckt.

Feuchte Kammer herstellen:    50% Formamid und 4x SSC  
2 Stunden lang bei 37°C mit Prähybridisierungspuffer inkubieren (100 µl je Schnitt)

Lösungen:

20 x SSC (250 ml):            43,8 g        NaCl  
                                      22,05 g        Natriumcitrat-dihydrat  
                              ad 200 ml        ddH<sub>2</sub>O  
                                      →            pH 7,0 einstellen  
                              ad 250 ml        ddH<sub>2</sub>O  
                                      250 µl        DEPC  
                                      →            autoklavieren

(Prä-)Hybridisierungspuffer (20 ml):	200	µl	Hepes	(1 M; pH 7,5)
	2,4	ml	NaCl	(1 M)
	2	ml	DTT	(1 M)
	4	µl	EDTA	(0,5 M; pH 7,5)
	4	ml	50 % Dextransulfat	
	400	µl	50x Denhardts	
	10	ml	100 % Formamid, salzfrei	
	200	µl	DNA	(10 µg / µl)
			→ aus Heringssperma	
	500	µl	Hefe tRNA	(10 µg/µl)

Der Prä-Hybridisierungspuffer entspricht dem Hybridisierungspuffer, jedoch ohne Sonde und Dextransulfat. Das Volumen wird durch DEPC-H<sub>2</sub>O ergänzt.

#### 4. 3. 5. 6 Hybridisierung

Die Sondenlösung wird so mit Hybridisierungspuffer verdünnt, dass 100 µl 10 kBq enthalten. Zur Herstellung dieser Mischung wird zuvor die benötigte Menge an Sonde (sie ergibt sich aus der Radioaktivität der markierten Oligonukleotide, der Objekträgerzahl und der Pipettiersicherheit) bei 95°C denaturiert, sofort auf Eis gestellt, und dort mit dem Hybridisierungspuffer gemischt.

Prähybridisierungspuffer entfernen

Hybridisierungslösung auf die Schnitte geben (100 µl je Schnitt)  
Aktivität: 10 kBq

18 Stunden lang die Schnitte bei 37°C inkubieren.

#### 4. 3. 5. 7 Post-Hybridisierung

Die Waschschritte nach der Hybridisierung erfolgen meist unter stringenteren Bedingungen als die Hybridisierung selbst, damit locker gebundene Sonden entfernt werden und nur die nahezu perfekt gepaarten Hybridmoleküle gebunden bleiben. In der Regel liegt die Temperatur beim Waschen ungefähr 15 - 20°C unter der Schmelztemperatur eines perfekt gepaarten Doppelstrangs, sodass etwa 85 % der Sondenbasen statistisch an die Zielsequenzen binden. Die für ein optimales Signal erforderliche Stringenz der Waschprozedur (also Salz-Konzentration, Temperatur und Dauer) muss für Sonde und Präparat empirisch ermittelt werden. Zum Waschen werden die Objektträger in ein SSC-Bad überführt und mehrmals darin auf und ab bewegt, bis sich die Deckgläser abnehmen lassen.

Deckgläser entfernen

Posthybridisieren:	5	Min	RT	1	x SSC	
	5	Min	RT	1	x SSC	
	1	Std	RT	1	x SSC	Schüttler
	1	Std	42°C	0,1	x SSC	
	30	Min	RT	0,1	x SSC	
	1	Min	RT		NH <sub>4</sub> Cl (300 mM)	70% EtOH
	1	Min	RT		NH <sub>4</sub> Cl (300 mM)	90% EtOH

Trocknen: 30 Minuten lang an der Luft

#### 4. 3. 5. 8 Auswertung

In diesen Versuchen war es wichtig, eine möglichst hohe Auflösung zu erhalten, um die radioaktiv markierten Sonden der ISH genau im Gewebe des Mausgehirns lokalisieren zu können. Hierzu wurden zwei verschiedene Geräte eingesetzt.

##### 1. Phosphorimager

Der Phosphorimager kann mit Hilfe eines Zwischenmediums die Radioaktivität in Form von Lumineszenz in digitaler Form wiedergeben. Das Zwischenmedium, ein sogenannter *Screen*, ist eine Kunststoffplatte, auf welche eine Schicht mit Kristallen aufgebracht ist. Diese bestehen zumeist aus einem BaFBrEu-Gitter, das in regelmäßigen Abständen „Elektronen-Löcher“ in Form von Eu<sup>3+</sup>-Ionen besitzt. Trifft auf diese Ionen nun  $\beta$ -Strahlung, so werden die Elektronen dort gebunden, aus Eu<sup>3+</sup> wird Eu<sup>2+</sup>. Die Eu<sup>2+</sup> Ionen passen aber nicht optimal in die räumliche Struktur des Kristallgitters. Daher ist schon eine niederenergetische Strahlung in der Lage das Elektron vom Eu<sup>2+</sup> zu lösen und es wieder zum Eu<sup>3+</sup> zu oxidieren. Durch die Bindung des Elektrons wurde das Europium jedoch auf ein höheres Energieniveau gehoben, welches es durch das Freisetzen des Elektrons wieder verlässt. In Folge dessen wird die überschüssige Energie in Form von Lumineszenz abgegeben.

Durch Exponieren auf einem *Screen* wird die Strahlung also an der Stelle „gespeichert“, an der die Radioaktivität auflag. Nach dieser Expositionszeit wird der *Screen* dann in das Auslesegerät eingelegt. Dort wird er dann mit einem Laser abgescannt, so dass Lumineszenz entsteht, die durch eine *charged coupled device*-Kamera (CCD) in ein digitales Signal umgewandelt wird. Dieses kann dann von einem Computer verarbeitet und auf einem Bildschirm wiedergegeben werden.

Bevor die *Screens* verwendet werden können, müssen sie einer Lichtquelle ausgesetzt werden, um sie von bereits gespeicherten Elektronen zu befreien. Dies muss vor dem Exponieren geschehen, da sonst die Umgebungsstrahlung noch in den Kristallen gespeichert ist (Johnston et al., 1990).

In der vorliegenden Arbeit wurden *Screens* der Firma Fuji Film, Freiburg verwendet. Zur Auswertung der *Screens* wurde der Phosphorimager FLA 7000, ebenfalls von Fuji Film, Freiburg, genutzt. Das Löschen erfolgte mit dem *Eraser* der Firma Raytest, Straubenhardt.

## 2. Microimager

Auch der Microimager gibt am Ende ein digitales Signal aus, welches durch einen Computer dargestellt werden kann. Jedoch verwendet der Microimager ein anderes Zwischenmedium für eine *real time* Wiedergabe der radioaktiven Zerfälle.

Dazu wird das radioaktive Material mit einer Szintillatorfolie bedeckt. Diese besteht aus einer 3 µm dicken Trägermembran und darauf jeweils drei Schichten 3 µm dicker Szintillatorkristalle. Diese werden durch die radioaktive Strahlung kurzzeitig angeregt und geben beim Zurückfallen in ihren Grundzustand die überschüssige Energie in Form von Lichtquanten ab. Die Lichtquanten werden über eine Linse gebündelt und auf eine Photokatode geleitet. Dort schlagen sie Elektronen heraus, die durch eine kontinuierliche Steigerung der angelegten Spannung in Hohlleitern in Richtung Anode beschleunigt werden. Dabei durchqueren die Elektronen eine sogenannte Mikrokanalplatte aus 30 000 engen Röhren. Innerhalb dieser Hohlleiter schlagen die Elektronen aufgrund ihrer Beschleunigung ständig neue sekundäre Elektronen aus der Kanalwand. Durch die hohe Anzahl der Mikrokanäle auf einer kleinen Fläche (~ 1 cm<sup>2</sup>) wird die Ortsauflösung möglichst gut beibehalten. An der Anode treffen die stark vervielfältigten Elektronen auf einen Lumineszenzschirm. Die dort erzeugten Photonen werden von einer CCD-Kamera registriert und dort in ein digitales Signal umgewandelt.

Der Vorteil des Microimagers gegenüber dem Phosphorimager liegt zum einen in der Echtzeit-Wiedergabe der Zerfallsereignisse, zum anderen in der sehr guten Ortsauflösung bis hinab zu 15 µm. Der große Nachteil ist jedoch die geringe Fläche, die zur Auswertung bereit steht (nach Schmidt R; Skript Radiochemie Praktikum). Daher wurde der Phosphorimager zur allgemeinen Auswertung der Radioaktivität verwendet, besonders interessante Präparate wurden zusätzlich noch mit einem Microimager der Firma Biospace, Paris/Frankreich analysiert.

### 4. 3. 6 Immunhistochemie

Albert Hewett Coons veröffentlichte 1941 seine Arbeit über die Markierung eines Antikörpers und die damit verbundenen Möglichkeiten zur Detektion der entsprechenden Antigene. In der nachfolgenden Versuchsbeschreibung wird ein immunhistochemisches Nachweisverfahren durch fluoreszierende Markierung eines sekundären Antikörpers dargestellt, welcher den primären Antikörper bindet. Der primäre Antikörper kann an das gewünschte Antigen, hier das MERP, binden und es so lokalisieren.

Da bis heute nur ein synthetisch hergestellter Antikörper gegen das humane MERP zur Verfügung steht, wurden hier neben diesem auch zwei verschiedene primäre Antikörper gegen das Ependymin des Fisches eingesetzt. In vorherigen Studien zeigte sich, dass diese Antikörper Kreuzreaktivität mit einem murinen Protein aufweisen, bei dem es sich wohl um ein MERP handelt (Schmidt et al., 1986). Des Weiteren wurde ein primärer Antikörper gegen das glial fibrillary acidic protein (GFAP) eingesetzt. Dieses Protein gehört zu den Intermediärfilamenten, welche vor allem in den Astrocyten und den ependymalen Zellen des Gehirns exprimiert werden (Jacque et al., 1978; Roessmann and Gambetti, 1986). Sie sollen Aufschluss darüber geben, ob es eine Übereinstimmung der Lage der MERPs mit diesen Zellen gibt.

Alle Versuchsschritte wurden nach den Herstellerangaben der jeweiligen Kits durchgeführt. Veränderungen der Herstellerprotokolle erfolgten auf Grundlage eigener und laborinterner Versuche (Schmidt, 2011; Schmidt und Hinchliffe, 2012).

#### 4. 3. 6. 1 Fixierung der Kryoschnitte

Die Gehirnschnitte müssen vor der Behandlung mit den Antikörpern fixiert werden. Würde dieser Schritt ausbleiben, so würde die Gewebestruktur des Präparates stark in Mitleidenschaft gezogen werden, was bis zu einem vollkommenen Verlust des Gewebes führen kann. Wie bei der Fixierung während der ISH (vergl. 3.5.3), ist es auch hier ein Kompromiss aus Gewebe stabilisierenden Maßnahmen und dem Abschwächen des letztendlich registrierten Signals. Die Fixierung mit der Alkoholischen Lösung nach Debosc-Brasil hat die besten strukturellen Ergebnisse gebracht, jedoch ist durch die gelbliche Färbung aufgrund der Pikrinsäure (trotz mehrerer ausführlicher Waschschritte) das Signal des Fluorochroms zu stark beeinträchtigt worden (Brasil, 1904; Romeis, 1968). Daher wurde im Folgenden auch hier eine Fixierung mit dem quervernetzenden Paraformaldehyd gewählt. Dies ergab den besten Kompromiss.

Quervernetzung:	Paraformaldehyd (4%; 0°C)	5 Minuten
Waschen:	1 x PBS → 1 x wiederholen	5 Minuten

#### 4. 3. 6. 2 Applikation der primären Antikörper

Um das zuvor fixierte Gewebe für die Antikörper zugänglich zu machen, wurden diese mit einer Permeabilisierungslösung behandelt. Diese besteht aus einer Lösung von 0,3% NP40 (Detergenz, ohne Protein denaturierende Eigenschaften) in PBS. Das NP40 fungiert hierbei als ein Detergenz, welches jedoch die Konformation der Proteine nicht verändert.

Des Weiteren werden die Gewebeschnitte in eine Absättigungslösung getaucht. Diese soll mittels 1% BSA, 10% Glycerin und 100 mM Glycin in PBS erreichen, dass möglichst viele unspezifische Bindungsstellen besetzt werden und somit das Hintergrundsignal bei der Detektion minimiert wird. Wenn nicht anders beschrieben, erfolgten die Schritte bei Raumtemperatur.

Als primäre Antikörper wurden folgende verwendet:

Primär Antikörper	Antigen aus	Organismus	Verdünnung
Anti-Ependymin-Antiserum Perseus	Fisch	Kaninchen	1:100
Anti-Ependymin-Antiserum Beteigeuze	Fisch	Kaninchen	1:100
Anti-Epdr-Antiserum	Mensch	Kaninchen	1:100
Anti-GFAP-Antiserum	Mensch, Maus, Ratte	Kaninchen	1:400
Präimmunes Kaninchenserum	entfällt	Kaninchen	1:100
Verdünnungspuffer	entfällt	keiner	unverdünnt

**Tab. 3.1: Verwendete primäre Antikörper.** Es werden die eingesetzten primären Antikörper aufgeführt, die Organismen der Antigene, die Herstellungsorganismen, sowie deren Verdünnung. Das präimmune Kaninchenserum, sowie der Verdünnungspuffer alleine, dienten als Kontrolle.

Permeabilisierung: Permeabilisierungslösung (4°C) 10 Minuten

Waschen: PBS 5 Minuten  
→ 2 x wiederholen

Absättigung: Absättigungslösung 30 Minuten

Waschen: PBS 5 Minuten  
→ 2 x wiederholen

Antikörper Applikation: primärer Antikörper (4°C) 15 Stunden  
100 µl / Objektträger in Verdünnungspuffer  
→ In feuchter Kammer

Lösungen:

10x PBS (1l): 2,70 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O  
14,31 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
87,66 g NaCl  
ad 1000 ml DEPC-H<sub>2</sub>O, pH 7,4  
→ autoklavieren

Permeabilisierungslösung: PBS  
0,3 % NP40

Absättigungslösung:

		PBS
1	%	Rinderalbumin (Bovine Serum Albumin; BSA)
10	%	Glycerin
100	mM	Glycin

Verdünnungspuffer:

		PBS
50	%	Absättigungslösung

#### 4. 3. 6. 3 Applikation der sekundären Antikörper

Um das Signal zu verstärken, wird eine indirekte Markierung durch sekundäre Antikörper verwendet, so dass mehrere sekundäre Antikörper an einen einzigen primären Antikörper binden können. Es ist darauf zu achten, dass der primäre und der sekundäre Antikörper nicht aus dem gleichen Organismus stammen. Als signalgebendes System wurden Fluoreszenzmarker mit gut unterscheidbaren Emissionswellenlängen verwendet. (Liddell and Weeks, 1996).

Bei den Waschschritten nach dem Entfernen des primären Antikörpers, wurde zu der PBS-Lösung 0,1% Tween 20 hinzugegeben. Dieses Detergenz ist ein nichtionisches Tensid und wird verwendet, um unspezifische Bindungen weiter zu reduzieren. Wenn nicht anders beschrieben, erfolgten die Schritte bei Raumtemperatur.

Sekundärer Antikörper	Organismus	Verdünnung	Eingesetzt gegen
Alexa 488	Ziege	1:300	Anti-Ependymin-Antiserum Perseus Anti-Ependymin-Antiserum Beteigeuze Anti-Epdr-Antiserum Präimmunes Kaninchenserum Verdünnungspuffer Lösung
Alexa 568	Ziege	1:800	Anti-GFAP-Antiserum Verdünnungspuffer Lösung

**Tab. 3.2: Verwendete sekundäre Antikörper.** Die eingesetzten sekundären Antikörper, deren Herstellungsorganismus, sowie deren Verdünnung und den von ihm detektierbaren primären Antikörper sind aufgeführt.

Waschen:	PBST → 2 x wiederholen	5	Minuten
	PBS	5	Minuten
Antikörper Applikation:	sekundärer Antikörper 100 µl / Gewebeschnitt in Verdünnungspuffer → In feuchter Kammer	45	Minuten
Waschen:	PBST → 2 x wiederholen	5	Minuten
	PBS	5	Minuten
Lösungen:			
PBST:	0,1 %	PBS	Tween 20

#### 4. 3. 6. 4 DAPI-Färbung

DAPI ist ein Phenylindol, welches durch Interkalation in die kleinen Gruben der AT-reichen Regionen der DNA binden kann. Aufgrund dieser Bindung erhöht sich das Fluoreszenzsignal des DAPI. Durch die Membrangängigkeit kann es auch in lebende Zellen eindringen, ebenso wie in fixiertes Zellgewebe. Daher eignet es sich hervorragend, um in den Gewebeschnitten des Mausgehirns DNA-reiche und somit zellkernreiche Regionen zu markieren. Sein Absorbptionsmaximum liegt bei 358 nm, sein Emissionsmaximum bei 461 nm. In Folge dessen wird es von ultraviolettem Licht angeregt und blaues Licht abgegeben (Kapusinski, 1995).

Jeder zweite Gewebeschnitt wurde mit in Wasser gelöstem DAPI gegengefärbt.

Färbung:	DAPI (1 µg / ml) 100 µl / Gewebeschnitt	1	Minute
Waschen:	PBS → 2 x wiederholen	5	Minute

#### 4. 3. 6. 5 Präparate versiegeln

Das Versiegeln der Präparate auf dem Objektträger dient der Sicherheit für das anschließende Mikroskopieren. Durch den Einschluss der Flüssigkeit auf dem Gewebeschnitt wird verhindert, dass diese mit den Linsen der Objektive des Fluoreszenzmikroskops in Kontakt kommen kann. Bei der Flüssigkeit zum Versiegeln handelt es sich um DABCO, ein tertiäres Amin, welches die Stabilität der Fluoreszenz erhöht und dem Ausbleichen entgegenwirkt (Valnes and Brandtzaeg, 1985). Verschluss wurde das Präparat mit einem Deckgläschen, welches mit Nagellack umschlossen und bei Dunkelheit getrocknet wurde.

#### 4. 3. 6. 6 Auswertung

Die Auswertung der Gewebeschnitte erfolgte über ein bildgebendes Verfahren, in der Regel mit einem Fluoreszenzmikroskop. Jedoch wurden auch einmal Aufnahmen mit einem konfokalen Gerät (Olympus, FV1000) vorgenommen.

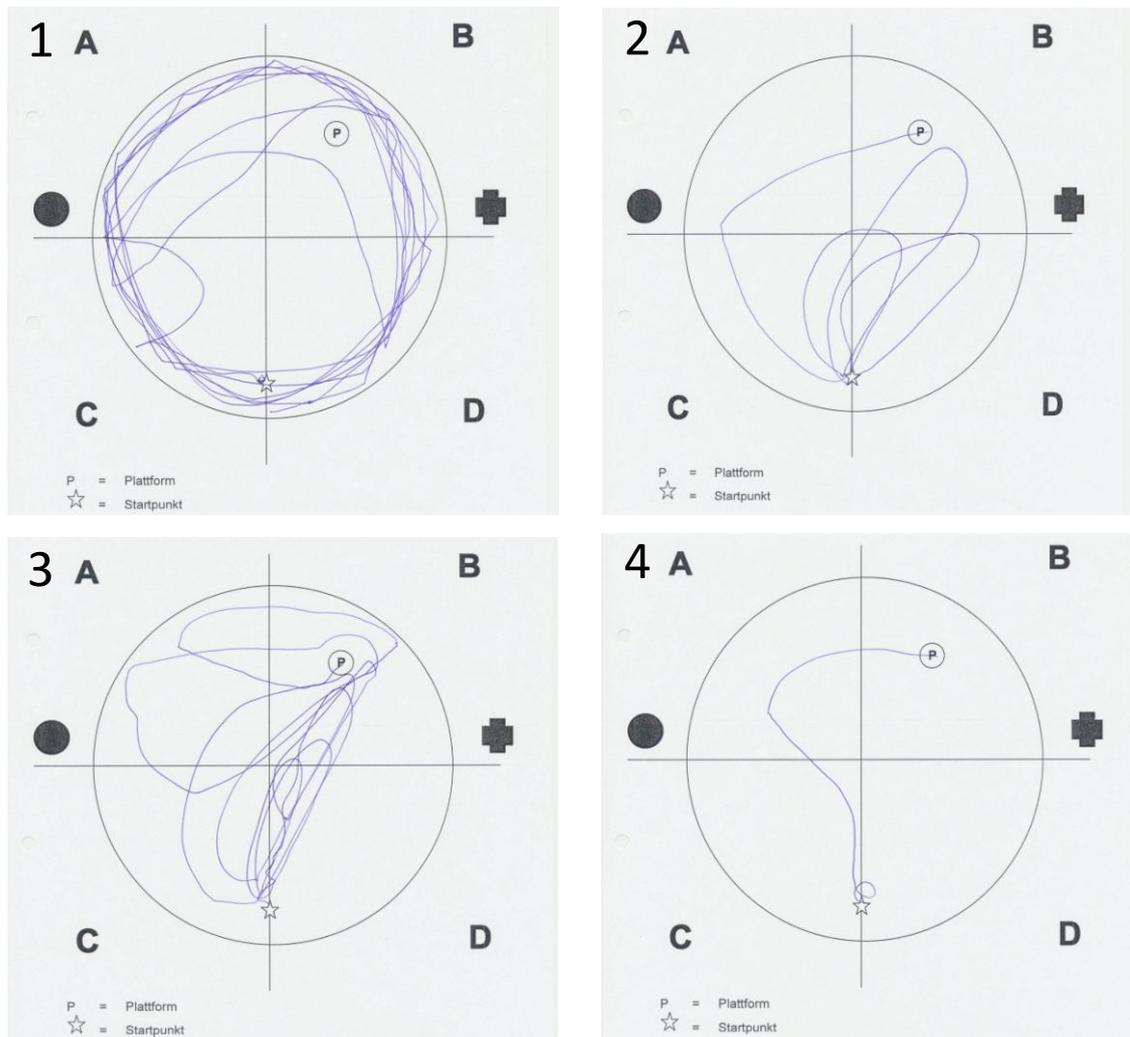
## 5. Ergebnisse

### 5.1 Lernverhalten der Mäuse im Morris Water Maze

Um die Ziele der anschließenden Versuche erreichen zu können, wurde ein Versuchsaufbau benötigt, an dessen Ende ein Lernerfolg der Mäuse steht. Hierzu wurde das Morris Water Maze verwendet. Aufgezeichnet wurde das Suchen der Plattform durch den Experimentator. Hierzu wurde der Schwimmweg mittels schematischer Abbildung nachgezeichnet und das Erreichen der Plattform samt benötigter Zeit dokumentiert. Als Kriterium zum Erreichen des Lernerfolgs wurden zwei alternative Kriterien angewandt.

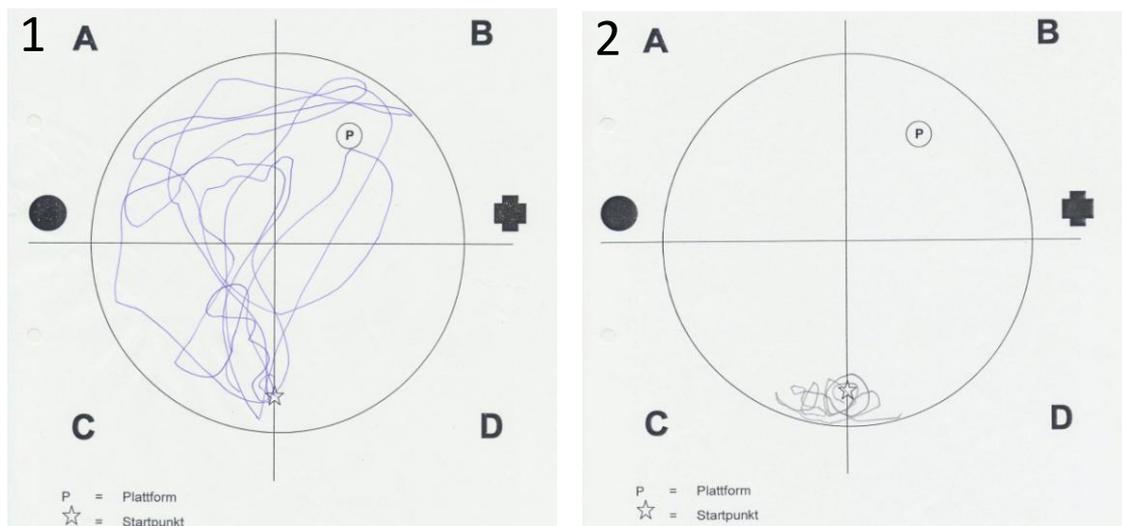
1. Zeit: Die Maus musste die Plattform innerhalb von weniger als zehn Sekunden (*direct swimming*; siehe Diskussion, 6.1.3) oder zweimal nacheinander unter 30 Sekunden erreichen.
2. Schwimmverhalten: Anhand der Entwicklung des Schwimmverhaltens können verschiedene Phasen des räumlichen Lernens ausgemacht werden (Garthe, 2009; siehe Diskussion, 6.1.3)

Anhand dieser Kriterien konnten dann „Lerner“ von „nicht-Lernern“ unterschieden und für die folgenden Versuche verwendet werden (Abb. 5.1 und 5.2).



**Abb. 5.1: Phasen des Schwimmverhaltens im Morris Water Maze.** Die Abbildungen zeigen Aufzeichnungen eines Lernversuchs. Es lassen sich anhand des Schwimmverhaltens unterschiedliche Phasen des Plattformsuchens erkennen. Die Quadranten des Bassins sind jeweils mit A bis D gekennzeichnet, der Kreis, bzw. das Kreuz geben die Lage der Orientierungspunkte im Raum wieder; P = Lage der Plattform im Bassin, Stern = Startpunkt des Versuchs.

1) Im ersten Durchgang ist zu sehen, dass die Maus sich verstärkt am Rand des Bassins aufhält. Sie sucht ständigen Kontakt zur Außenwand (Thigmotaxis). 2) Im weiteren Verlauf des Versuchs beginnt die Maus mit unterschiedlichen Strategien nach der Plattform zu suchen. Hier sucht sie mit der ungefähr korrekten Entfernung vom Startpunkt ausgehend, nach der Plattform (*scanning*) 3) Die Maus beschränkt sich bei ihrer Suche hauptsächlich auf den Zielquadranten (B) (*directed search*). 4) Die Maus schwimmt fast ohne Umweg auf die Plattform zu (*direct swimming*). Somit hat sie das Lernziel erreicht und kann als „Lerner“ verwendet werden.

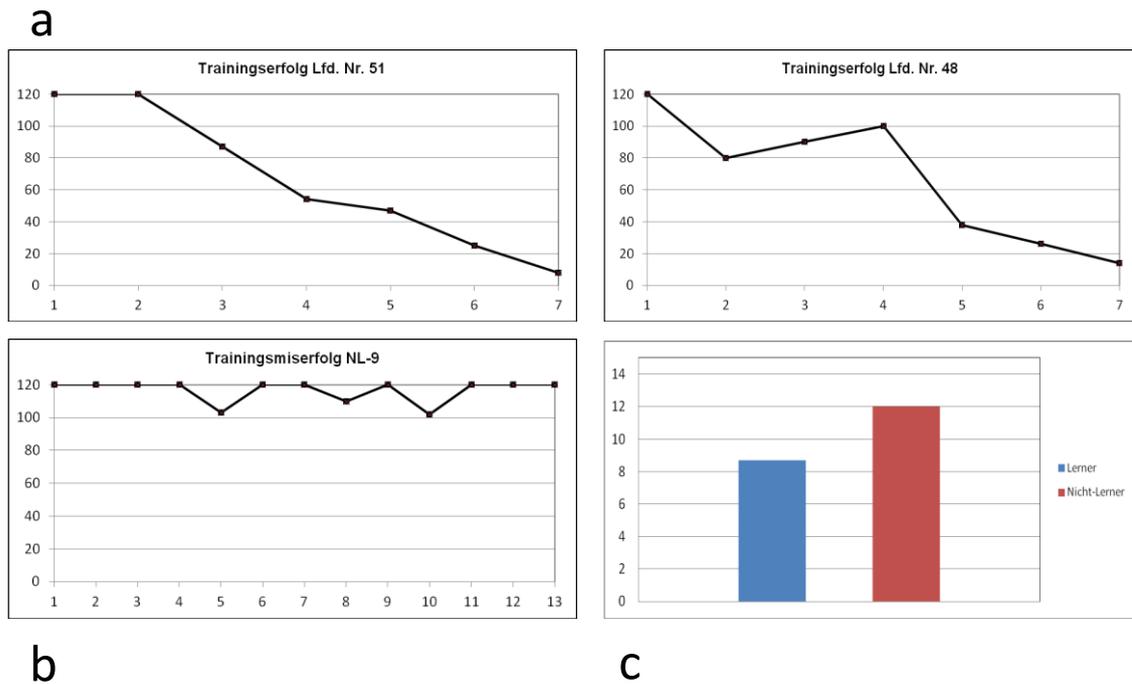


**Abb. 5.2: Schwimmverhaltens von „nicht-Lerner“ während des letzten Trainingsdurchgangs.** Es sind Aufzeichnungen von Mäusen während ihres letzten Trainingsdurchgangs dargestellt. Diese sind im Anschluss als „nicht-Lerner“ eingestuft worden. Die Quadranten des Bassins sind jeweils mit A bis D gekennzeichnet, der Kreis, bzw. das Kreuz geben die Lage der Orientierungspunkte im Raum wieder; P = Lage der Plattform im Bassin, Stern = Startpunkt des Versuchs.

1) Die Maus hat nach den zwei Minuten die Plattform nicht erreicht. Das ist auch in den vorherigen Durchgängen zumeist der Fall gewesen. Hier ist auch nach dem 20. Trainingsdurchgang noch kein gezieltes Suchen nach der Plattform zu erkennen. Die Suche scheint randomisiert abzulaufen. 2) Dieser Versuch wurde nach dem 12. Durchgang abgebrochen. Die Maus lässt sich durch ihr Fell und gelegentliche Beinschläge fast bewegungslos auf dem Wasser treiben und scheint keine gerichteten Suchbewegungen durchzuführen.

Allen „Lerner“-Mäusen wurden, in Abhängigkeit von ihrem Tötungszeitpunkt nach ihrem Lernerfolg, laufende Nummern (LfdNr.) zugeordnet und ihr Trainingsresultat graphisch dargestellt. Gleiches wurde auch mit den „nicht-Lernen“ gemacht. Sie wurden in der Folge in den verschiedenen Versuchen als Vergleichsgröße herangezogen.

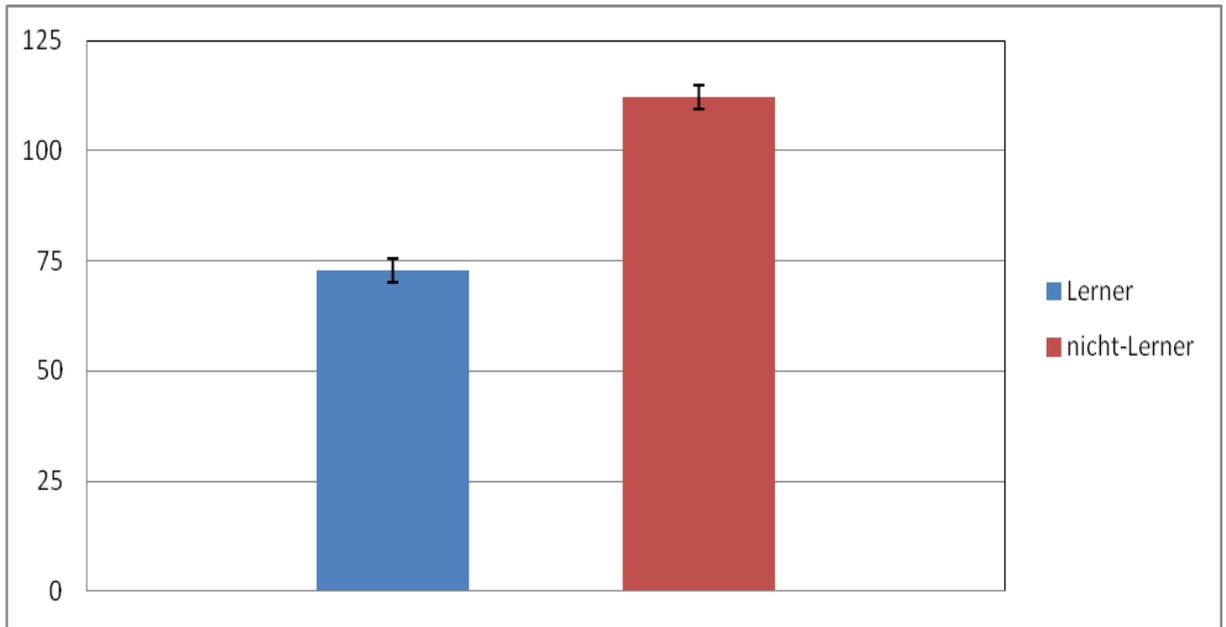
Aus den Werten aller trainierten Mäuse konnte am Ende ein Durchschnittswert berechnet werden, nach welchem Trainingsdurchgang sie gelernt haben (Abb. 5.3).



**Abb. 5.3: Darstellung des Lernens im Morris Water Maze.** In a) und b) sind auf der Ordinate die Zeit in Sekunden, auf der Abszisse die Anzahl der Trainingsdurchgänge aufgetragen. In c) stellt die Ordinate die Anzahl der Trainingsdurchgänge dar, die Abszisse die jeweiligen Gruppen „Lerner“ (blau;  $n = 38$ ) und „nicht-Lerner“ (rot;  $n = 11$ ).

a) Dargestellt sind typische Trainingsverläufe von zwei „Lernern“. Trotz einiger Schwankungen ist eine sich stetig verkürzende Zeit zum Auffinden der Plattform zu erkennen. b) Der Trainingsverlauf eines „nicht-Lerners“ ist dargestellt. Auch wenn die Maus zwischenzeitlich die Plattform finden konnte, so kann jedoch nicht von einem sich stetig verbessernden Orientierungsverhalten gesprochen werden. Nach dem 13. Durchgang wurde der Versuch abgebrochen. c) Die durchschnittliche Zeit der „Lerner“ (blau; 8,7 Durchgänge) zum Erreichen des Lernziels ist im Vergleich zur durchschnittliche Zahl der Durchgänge, bis der Versuch abgebrochen wurde, der „nicht-Lerner“ (rot; 12 Durchgänge) dargestellt.

Durch statistische Methoden wurde überprüft, ob die Einteilung der Gruppen „Lerner“ bzw. „nicht-Lerner“ korrekt war. Es wurde die durchschnittliche Dauer errechnet, welche die Mäuse der jeweiligen Gruppen brauchten, um die Plattform aufzufinden. Nach Berechnung der Standardabweichungen der Mittelwerte, wurden diese gegenübergestellt (Abb. 5.4). Anschließend wurde ein ungepaarter t-Test nach „Student“ durchgeführt (Kaiser und Gottschalk, 1972). Der ungepaarte t-Test wurde verwendet, da von einer normalverteilten, gleichen Grundgesamtheit (genetisch gleiche Mäuse) ausgegangen wurde, welche jedoch Elemente zwei verschiedener Stichproben enthält („Lerner“ und „nicht-Lerner“). Dass deren Mittelwerte nun voneinander differieren, sollte durch diesen Test bestätigt werden (Tab. 5.1).



**Abb. 5.4: Suchzeiten der „Lerner“ und „nicht-Lerner“.** Die Mittelwerte der Plattform-Suchzeiten im Morris Water Maze wurden für die Gruppe „Lerner“ und „Nicht-Lerner“ errechnet und einander gegenüber gestellt. Angegeben ist die Zeit in Sekunden auf der Ordinate, die jeweiligen Gruppen „Lerner“ (blau; n = 38) und „nicht-Lerner“ (rot; n = 11) zeigt die Abszisse. Angegeben ist der Standardfehler der Mittelwerte.

	"Lerner"	"nicht-Lerner"
Summe	2769,70	1234,11
Mittelwerte	72,89	112,19
Gesamt $\emptyset$ Zeit	72,89	112,19
Varianz	277,04	68,65
STABW	16,64	8,29
<b>S.E.M.</b>	<b>2,74</b>	<b>2,62</b>

Lerner - Nicht-Lerner	
<L>	72,89
<NL>	112,19
Sd	15,2547
t	-7,5255
<b>Betrag von t</b>	<b>7,5255</b>
f(45) 99,9%	3,5210
-->	<b>&gt;99,9%</b>
Wurzel $((n1*n2)/(n1+n2))$	
2,9207	
f	47

**Tab. 5.1: Berechnungen der Mittelwerte, Standardabweichungen vom Mittelwert und des ungepaarter t-Tests der Gruppen „Lerner“ und „nicht-Lerner“.** a) Die Berechnungsschritte zur Bestimmung des S.E.M. (*standard error of the mean*) für die Gruppe der „Lerner“ (n = 38) und „nicht-Lerner“ (n = 11) sind aufgeführt. b) Die Berechnungen des ungepaarten t-Tests nach „Student“ sind dargestellt, wobei

$$s_{\text{d}} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

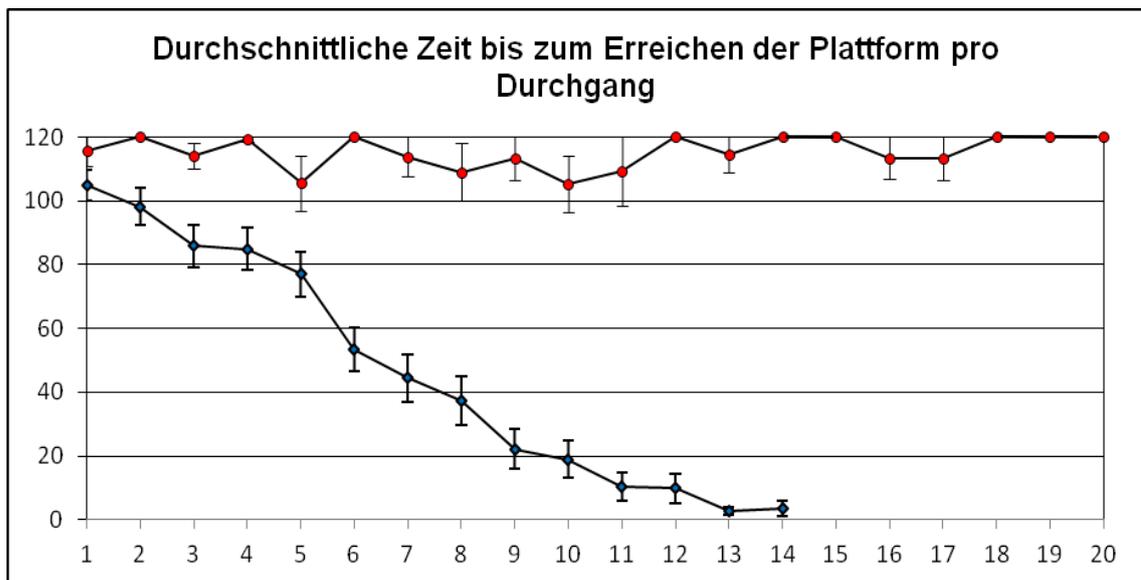
und

$$\text{TAU} = \frac{|x_{\text{Strich}_1} - x_{\text{Strich}_2}|}{s_{\text{d}}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

ist.

Aus dem durchgeführten Test ergibt sich für t ein Wert von 7,5255, welcher über dem Signifikanzniveau von 99,9% für die Freiheitsgrade  $f(45) = 3,5210$  liegt. Somit kann gesagt werden, dass die Hypothese „die Stichproben der Gruppe „Lerner“ und „nicht-Lerner“ sind unterschiedlich“ zu mehr als 99,9% zutreffend ist.

Schließlich wurde ein Vergleich zwischen dem Lernverhalten der „Lerner“ und der „nicht-Lerner“ gezogen. Hierbei wurden die Lernkurven der beiden Gruppen miteinander verglichen, durch das Gegenüberstellen der jeweiligen durchschnittlichen Dauer bis zum Erreichen der Plattform pro Durchgang (Abb. 5.5). Dabei wurde berücksichtigt, dass die Mäuse, unabhängig zu welcher Gruppe sie gehören, unterschiedlich viele Trainingsdurchgänge absolvierten. Ebenfalls wurde jeweils zu den einzelnen Werten der Standardfehler der Mittelwerte angegeben.



**Abb. 5.5: Vergleich der Lernkurven von „Lerner“ und „nicht-Lerner“.** In der Graphik ist jeweils die durchschnittliche Zeit der Mäuse der beiden Stichproben bis zum Erreichen der Plattform pro Durchgang aufgetragen. Dabei gibt die Abszisse die Nummer des Trainingsdurchgangs wieder, die Ordinate die Zeit in Sekunden. Mit den Fehlerbalken sind die Standardfehler der jeweiligen Mittelwerte dargestellt.

Die Verläufe der Lernkurven beider Gruppe variieren stark voneinander. Dieser Unterschied wird umso stärker, je mehr Durchgänge absolviert wurden.

Wie in Abb. 5.3 c) dargestellt wurde, beträgt die durchschnittliche Dauer der Mäuse in der Gruppe „Lerner“ zum Erreichen des Lernziels 8,7 Durchgänge. Nach Berechnungen anhand der Werte zur Abbildung 3.5 würde dieser hypothetische Durchgang „8,7“ einen theoretischen Mittelwert von 26,7 Sekunden haben. Das heißt, die durchschnittliche Maus der Gruppe „Lerner“ würde nach 8,7 Durchgängen mit einer Zeit von 26,7 Sekunden die Plattform finden und dieser Gruppe zugeordnet werden können.

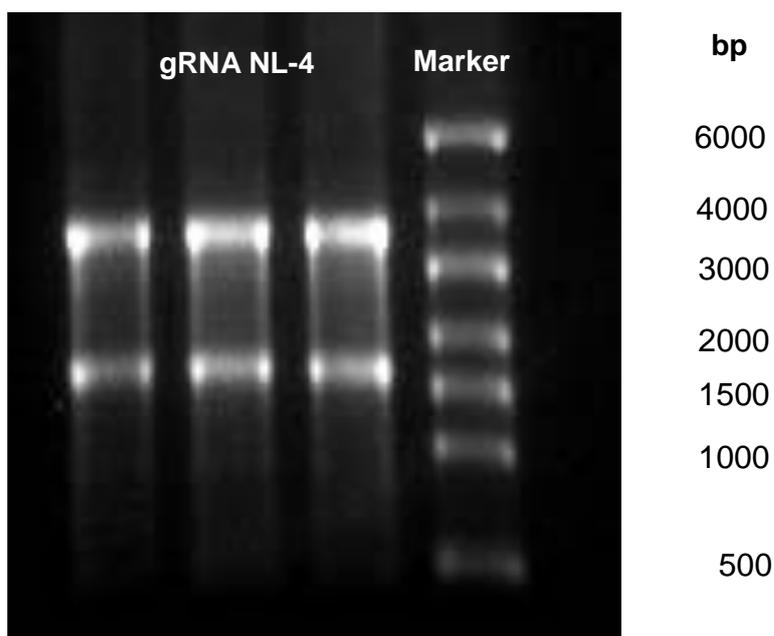
Abschließend lässt sich sagen, dass eine Zuordnung der getesteten Mäuse zur Gruppe „Lerner“ oder „nicht-Lerner“ möglich war. Somit ist die Grundlage der anschließenden Versuche, dass die verwendeten Maushirne von Mäusen stammten, die zeitlich möglichst akkurat ein räumliches Lernergebnis erzielten, gegeben.

## 5. 2 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Mäuse, welche zuvor trainiert und entsprechend ihres Lernerfolgs oder -misserfolgs in die Gruppen der „Lerner“ oder „nicht-Lerner“ eingeteilt wurden, sind in diesem Versuch nun mittels der semi-quantitativen Testmethode RT-PCR auf ihren mRNA-Gehalt für die beiden Proteine MERP1 und MERP2 untersucht worden. Um den zeitlichen Verlauf des Exprimierens nachvollziehen zu können, erfolgte eine Einteilung der Mäuse in vier Gruppen. Abhängig vom Tötungszeitpunkt nach dem letzten Trainingsdurchgang, waren dies die Gruppen „30 Minuten“, „60 Minuten“, „120 Minuten“ und „180 Minuten“. Ebenso wurden diese Daten dann mit denen von untrainierten Mäusen verglichen.

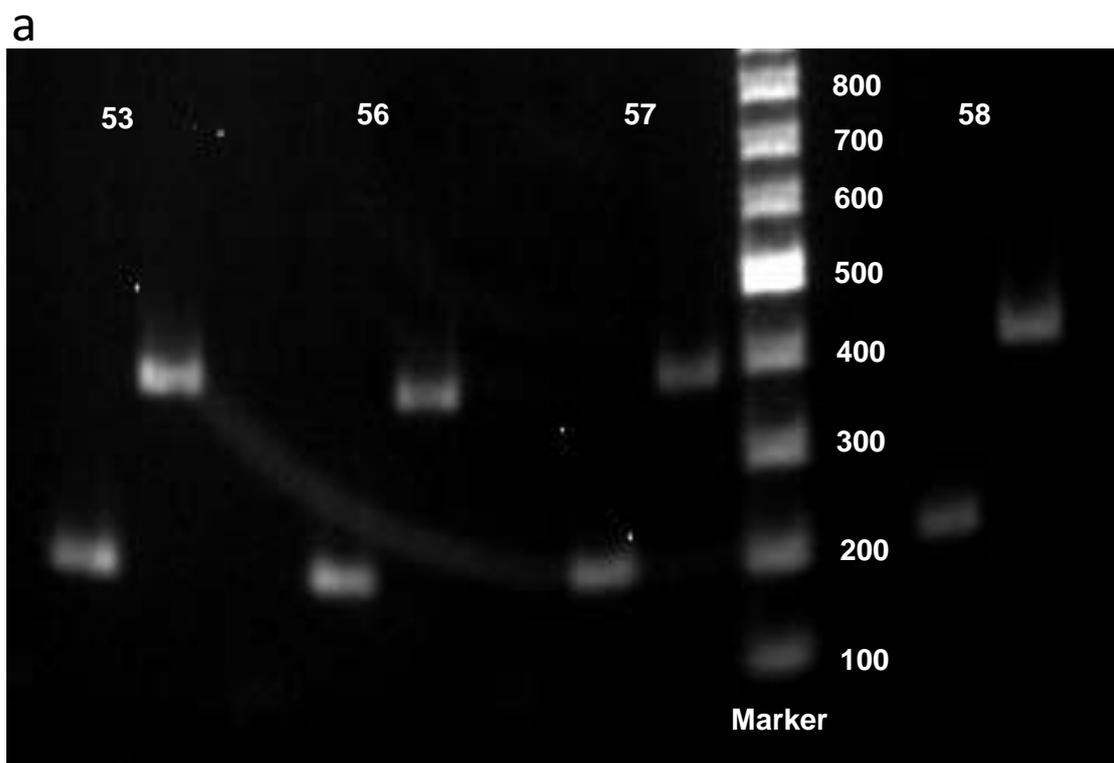
In einem ersten Schritt wurden die präparierten und in Stickstoff schockgefrorenen Gehirne gewogen, um die entsprechenden Mengen an Chemikalien zur gRNA-Aufreinigung einzusetzen. Hierbei lag das durchschnittliche Gewicht der Mausgehirne bei 425 mg ( $\pm 28$  mg). Am Ende wurde die gRNA bei 260 nm zu 230 nm und zu 280 nm auf ihr Absorption getestet und daraus die Konzentration bestimmt.

Durch das Auftragen der gRNA auf ein Agarosegel mit einem RNA-Marker wurde deren Integrität überprüft. Die 28s- und die 18s-rRNA Untereinheiten haben eine Größe von 4,7 kbp bzw. 1,9 kbp. Wurden keine deutlichen Bänder auf Höhe dieser Marker-Bänder gesehen oder gab es weitere distinkte Bänder, so konnte von einer mangelhaften gRNA-Aufreinigung ausgegangen werden, da diese Kriterien als Maß für die Qualität der RNA Aufreinigung genommen werden (vergl. Material und Methoden 4.4.6) (Abb. 5.6).

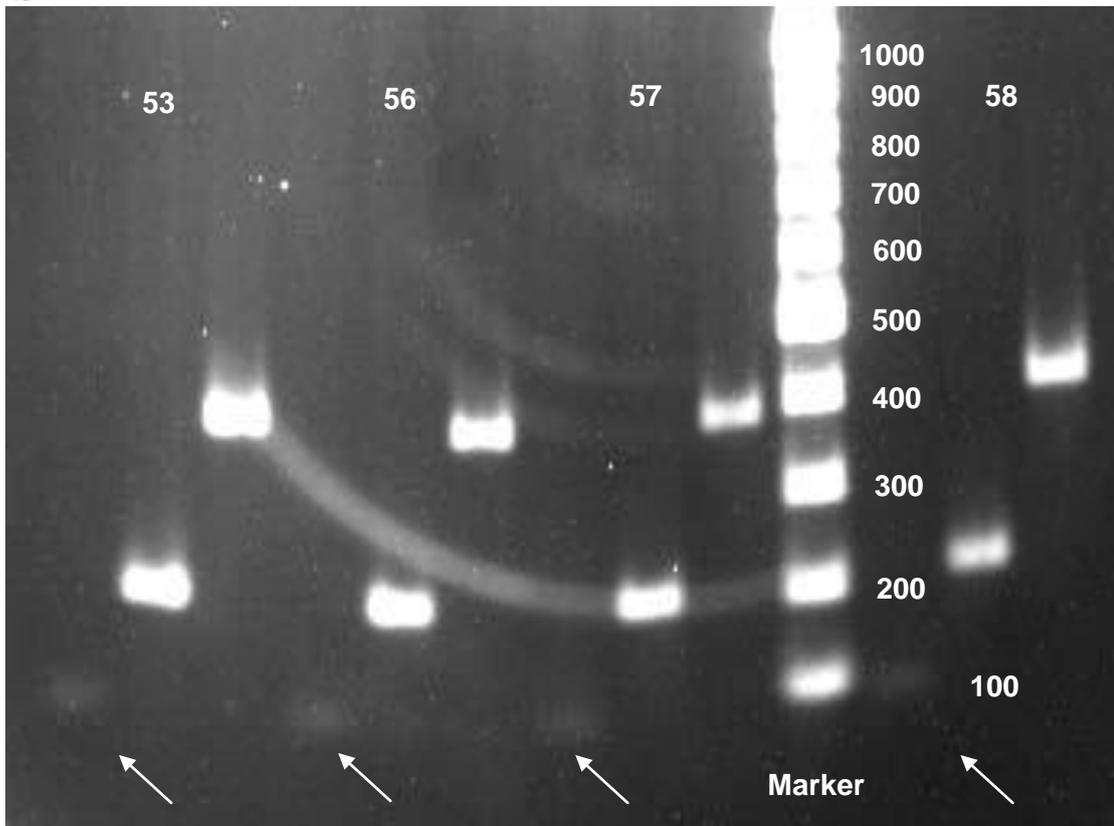


**Abb. 5.6: Agarose-Gelelektrophorese einer gRNA.** Aufgereinigte gRNA-Proben wurden auf ein Gel aufgetragen. Man erkennt je Bahn deutlich zwei Bänder. Das untere Band befindet sich auf Höhe zwischen den *Marker*-Bändern 1500 bp und 2000 bp. Dies lässt auf die 18 s-rRNA Untereinheit (1874 bp) schließen. Das zweite Band ist im Bereich des 4000 bp Bandes des *Markers*. In der Nähe liegt die theoretische Größe der 28 s-rRNA Untereinheit des 80 s Ribosoms (4718 bp). Weitere Bänder sind nicht zu erkennen. bp = Basenpaare; NL-4 = Nicht Lerner-4.

In den nächsten Schritten erfolgten zunächst die mRNA-Aufreinigung, mit erneuter Absorptions- und Konzentrationsbestimmung, sowie eine DNA-Aufreinigung. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase-Reaktion durchgeführt. Hier wurde auch eine vom Hersteller des Reverse Transkriptase-Kits mitgelieferte RNA-Probe als Positiv-Kontrolle verwendet. Mit den daraus resultierenden cDNA-Produkten wurde nun eine PCR durchgeführt, um diese zu amplifizieren. Es wurden jeweils 3 verschiedene Sätze an *forward* und *reverse* Primer verwendet. Zum Einen für das MERP1 und das MERP2, zum anderen, als Positiv-Kontrolle für das *house keeping gene* (hkg)  $\beta$ -Actin. Zur Analyse dieser Amplikons, wurden sie auf ein weiteres Agarosegel aufgetragen und nach ihrer Größe aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in einem Licht-Kabinett mit UV-Licht angeregt und die cDNA-Proben gaben aufgrund des interkalierenden Ethidiumbromids Lichtsignale ab. Diese konnten anhand ihrer Intensität zur Konzentrationsbestimmung der Amplikons verwendet werden (Abb. 5.7 a und b).



b

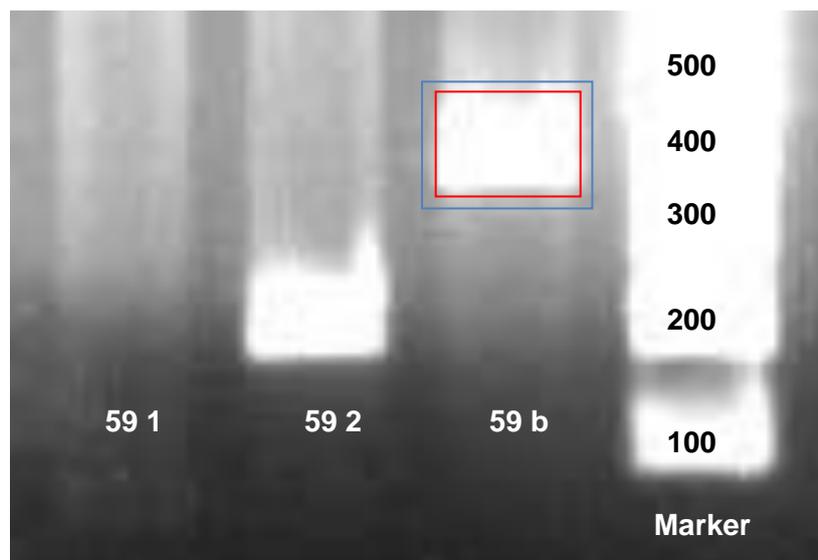


**Abb. 5.7: cDNA-Gel mit interkaliertem EtBr im UV-Licht.** Bei den Aufnahmen a und b handelt es sich um dasselbe Gel bei unterschiedlichen Belichtungszeiten. Aufgetragen wurden die Proben der Mäuse 53, 56, 57 und 58 (von links nach rechts). Bei jeder Maus wurden die PCR-Produkte der Primer für MERP1, MERP2 und  $\beta$ -Actin verwendet (*Marker*: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder der Firma Fermentas, angegeben in Basenpaaren). Auf den Abbildungen sind helle, konzentrische Kreise zu sehen. Das sind Linseneffekte der CCD-Kamera, die mit der Feuchtigkeit des Gels zusammenhängen.

a) Das Gel wurde für diese Aufnahme 3 Sekunden mit UV-Licht belichtet. Zu erkennen sind pro aufgetragener Mausprobe jeweils zwei Bänder. Eines auf Höhe des 200 bp *Marker*-Bandes und eines auf Höhe des 400 bp *Marker*-Bandes. Die erwartete Größe für das PCR-Produkt von MERP2 liegt bei 202 bp, die von  $\beta$ -Actin bei 392 bp. Somit entsprechen diese Bänder den erwarteten Größen. b) In dieser Abbildung wurde das Gel 10 Sekunden lang belichtet. Anhand dieser Belichtungszeit ist nun auch eine dritte Reihe mit Bändern (weiße Pfeile) etwas unterhalb des *Marker*-Bandes von 100 bp zu erkennen. Die erwartete Basenpaar-Größe des MERP1 liegt bei 69 bp. Somit entsprechen diese Bänder dem MERP1.

Anhand der aufgenommenen Bilder konnte nun mittels des Programms „AIDA Image Analyzer v4.22“ die Leuchtintensität der einzelnen Bänder ausgewertet und in Werte umgewandelt werden, welche proportional zu der Konzentration der auf dem Gel vorhandenen cDNA Konzentration ist. Je mehr cDNA vorhanden war, desto mehr Möglichkeiten zum Interkalieren hatte das Ethidiumbromid und somit erhöhte sich im gleichen Maße auch die Leuchtintensität der Bänder.

Vor dem Vergleich der Bänder untereinander mussten einige veränderliche Parameter ausgeglichen werden, als erstes die Leuchtkraft des Hintergrundes. In Abhängigkeit der Gel-Beschaffenheit und der Ausleuchtungsqualität innerhalb des Licht-Kabinetts, konnte es zu unterschiedlich starken Helligkeiten zwischen den einzelnen Gelen, aber auch innerhalb eines Gels kommen. Um dem entgegenzuwirken, wurde zu jedem Band ein individueller Hintergrund gemessen und vom diesem abgezogen (Abb. 5.8). Die mathematische Vorgehensweise hierzu ist an einem Beispiel erklärt (Tab. 5.2).



**Abb. 5.8: Bearbeitung einer Gel-Aufnahme, zum Abzug des individuellen Hintergrundes.** In diesem Bild ist beispielhaft ein Gel gezeigt, welches zur individuellen Hintergrundberechnung bearbeitet wurde. Die Belichtungsdauer wurde so gewählt, dass die Grenzen der Bänder möglichst deutlich zu erkennen sind. Diese wurden mit Hilfe des Programms „AIDA Image Analyzer v4.22“ markiert (roter Kasten). Über die Grenzen dieses Bandes hinaus wurde ein zweiter Bereich gemessen (blauer Kasten). In der Abbildung sind auf das Gel die MERP1, MERP2 und  $\beta$ -Actin Proben der Maus 59, sowie der Marker GeneRuler™ 100 Bp Plus DNA Ladder der Firma Fermentas (von links nach rechts) aufgetragen. Die farblich markierten Kästen in der Abbildung entsprechen nicht den originalen Markierungen, sondern wurden vom Programm schwarz dargestellt und sind hier zur besseren Veranschaulichung ersetzt worden.

LfdNr.	Fläche	Leuchtstärke	Leuchtstärke	Fläche	Leuchtstärke Hintergrund	Leuchtstärke
59 b	330	31944	Hintergrund - Band	Hintergrund - Band	auf Bandfläche	Band - Hintergrund
Bkg	494	39732	7788	164	15671	16273

**Tab. 5.2: Berechnung und Abzug des individuellen Hintergrundes anhand eines Beispiels.** In der Tabelle ist die Berechnung des individuellen Hintergrundes der rot markierten Bande aus Abb. 5.8 dargestellt. Gemessen wurden neben der Fläche (in Pixel) die Leuchtstärke des  $\beta$ -Actin PCR-Produkts Bandes der Probe Nummer 59 und des Hintergrundes (Bkg; blauer Kasten, Abb. 5.8). Die Leuchtstärke ist in der vom Hersteller implementierten Messgröße *quantum level* (QL) angegeben.

Zuerst werden die Leuchtstärke und die Fläche des Bandes von den jeweiligen Größen des Hintergrundes abgezogen. Somit ergibt sich die Leuchtstärke des Gebiets, welches innerhalb des blauen Kastens den roten umgibt. Durch das Dividieren der Fläche des Bandes (innerhalb des roten Kastens) durch die Fläche des Hintergrundes außerhalb der roten Fläche, ergibt sich der Faktor, mit welchem die Leuchtstärke der Fläche außerhalb des roten Kastens multipliziert werden muss, um die eigentliche Leuchtstärke des Hintergrundes zu diesem Band anzugeben. Dieser Wert kann nun abschließend vom Wert für die Leuchtkraft des Bandes subtrahiert werden.

Neben dem Hintergrund spielt auch die Belichtungszeit eine Rolle. Je länger ein Gel belichtet wird, desto stärker erscheint die Leuchtkraft der gemessenen Probe. Unterschiedliche Belichtungszeiten waren jedoch unumgänglich, da die aufgetragenen Proben unterschiedlich hohe Konzentrationen an cDNA und somit auch unterschiedliche Leuchtstärken aufwiesen. Um schwache Signale überhaupt aufnehmen zu können, musste somit oft lange belichtet werden. Dadurch wären aber höher konzentrierte Proben bereits in einem Sättigungsbereich der Darstellung gewesen. Deshalb mussten unterschiedliche Belichtungszeiten verwendet werden. Zum Ausgleich wurde eine Normierung vorgenommen. Als Referenzgröße diente die kürzeste Belichtungszeit, zwei Sekunden. Ein Beispiel der mathematischen Umformung ist in der Tabelle 5.3 aufgeführt.

Es ergeben sich oft unterschiedliche Ergebnisse beim Vergleich von Stoffwechseluntersuchungen, wenn zwei oder mehr Versuchstiere verglichen werden. Dem kann vorgebeugt werden, indem man ein *house keeping gene* in die Untersuchungen mit einbezieht. Diese Gene zeigen eine konstante Aktivität im Bezug auf andere Gene und können somit als Maß für eine grundsätzliche Aktivierbarkeit herangezogen werden. Das heißt, wenn als Reaktion auf ein Ereignis die Genaktivierung eines bestimmten Gens in einem Organismus niedriger ist als in einem anderen, dann ist die Aktivität des hkg in diesem Organismus ebenfalls im gleichen Maße verringert. Wichtiger noch ist aber die experimentelle Variabilität, welche sich in dem hkg-Produkt ausdrückt. Diese Unterschiede entstehen beim Vergleichen von Versuchsergebnissen, die sich über

mehrere Versuchsdurchführungen erstrecken und durch die Ausführung der Versuche selbst entstehen. Auch hierfür wird der hkg als ausgleichender Faktor verwendet.

In den Reverse Transkriptase-PCR Versuchen wurde als ein solches hkg das  $\beta$ -Actin jeweils mit untersucht. Somit konnten die gemessenen Werte für das MERP1 und das MERP2 anhand des  $\beta$ -Actins normiert werden. Es diente also als ein *Inter-Assay* Korrekturfaktor (Tab. 5.4).

LfdNr.	Leuchtstärke	Belichtung	Normierung
41 1	248	4	124
48 b	4343	10	869

**Tab. 5.3: Standardisierung auf eine einheitliche Belichtungszeit.** In der Tabelle ist an zwei Beispielen das Prinzip der Normierung auf eine einheitliche Belichtungsdauer von zwei Sekunden aufgezeigt. Nach dem jeweils der individuelle Hintergrund von den Bändern abgezogen wurde, musste die Leuchtstärke für jedes Gel entsprechend seiner Belichtungsdauer umgerechnet werden. Für die LfdNr. 41 1 betrug die Belichtungsdauer vier, für das hkg  $\beta$ -Actin zehn Sekunden.

LfdNr.	belichtungsnormiert	hkg-Faktor	hkg-normiert
<b>43 b</b>	<b>468</b>	<b>1,000</b>	<b>468</b>
48 b	869	0,539	
53 b	1044	0,449	
48 2	1715	0,539	924
53 2	825	0,449	370

**Tab. 5.4: Normierung der Leuchtstärke anhand des hkg  $\beta$ -Actin.** Zur Berechnung des Korrekturfaktors wurde ein Referenzwert festgelegt. Dieser ist die Bande des hkg  $\beta$ -Actin mit der LfdNr. 43 b, da es die geringste Leuchtstärke aller gemessener  $\beta$ -Actin Bänder aufweist. Diesem Wert wurde der hkg-Faktor 1,000 zur Normierung zugewiesen. Alle  $\beta$ -Actin Leuchtstärke Werte wurden, nachdem der Hintergrund abgezogen sowie die Beleuchtungsnormierung durchgeführt wurde (Tabelle: Beleuchtungsnormiert; in QL), durch den Referenzwert 468 QL dividiert. Somit ergab sich zu jedem  $\beta$ -Actin Wert ein entsprechender hkg-Faktor. In der obigen Tabelle ist dies am Beispiel für die LfdNr. 48 b und 53 b dargestellt.

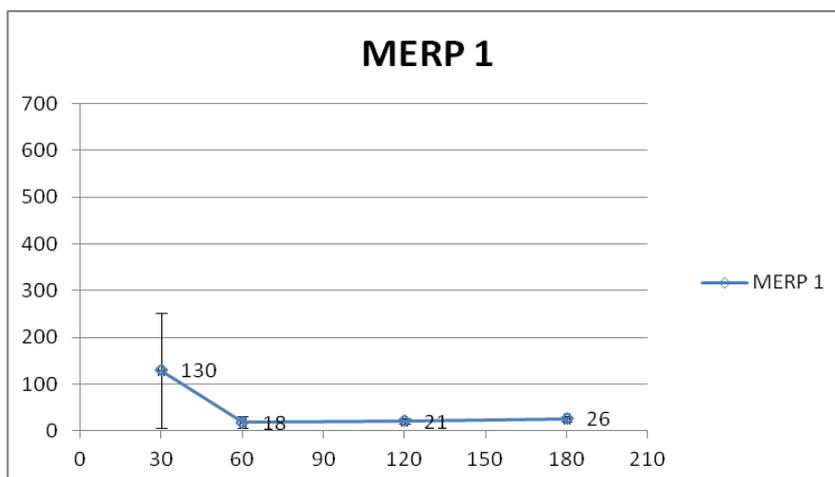
Somit kann jedem MERP1 und MERP2 cDNA-Produkt entsprechend der Maus, aus welchem es stammt und des Versuchs, während dessen es aufbereitet wurde, ein individueller Normierungsfaktor zugewiesen und mit diesem multipliziert werden. In der Tabelle sind zwei Beispiele aufgeführt (LfdNr. 48 und 53; jeweils für das MERP2).

Nachdem alle gemessenen Werte für die RT-PCR Produkte des MERP1 und des MERP2 normalisiert wurden, sind diese anhand der Maus, aus der sie stammen und deren Tötungszeitpunktes, in Gruppen eingeteilt und miteinander verglichen worden. Dabei ergab sich eine Einteilung in folgende acht Gruppen:

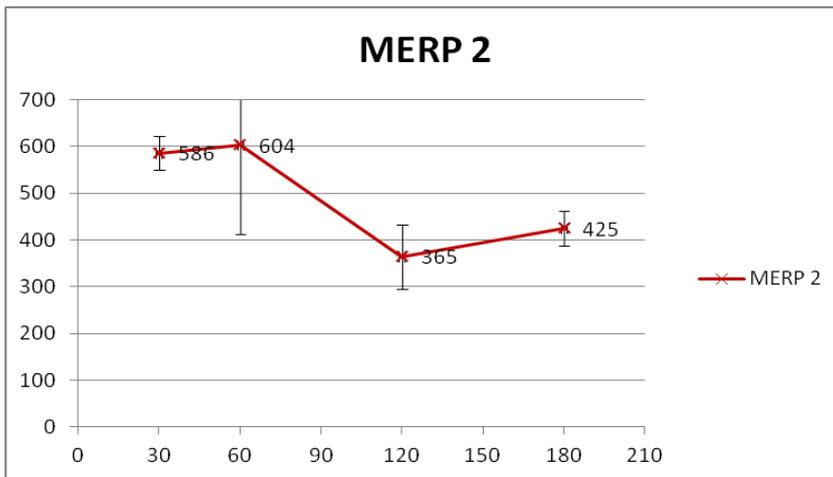
- 30 1: Tötungszeitpunkt 30 Minuten nach dem Lernerfolg; MERP1-Primer wurden für die PCR verwendet
- 30 2: Tötungszeitpunkt 30 Minuten nach dem Lernerfolg; MERP2-Primer wurden für die PCR verwendet
- 60 1: Tötungszeitpunkt 60 Minuten nach dem Lernerfolg; MERP1-Primer wurden für die PCR verwendet
- 60 2: Tötungszeitpunkt 60 Minuten nach dem Lernerfolg; MERP2-Primer wurden für die PCR verwendet
- 120 1: Tötungszeitpunkt 120 Minuten nach dem Lernerfolg; MERP1-Primer wurden für die PCR verwendet
- 120 2: Tötungszeitpunkt 120 Minuten nach dem Lernerfolg; MERP2-Primer wurden für die PCR verwendet
- 180 1: Tötungszeitpunkt 180 Minuten nach dem Lernerfolg; MERP1-Primer wurden für die PCR verwendet
- 180 2: Tötungszeitpunkt 180 Minuten nach dem Lernerfolg; MERP2-Primer wurden für die PCR verwendet

Diese Werte wurden mit denen für das MERP1 und MERP2 von untrainierten Mäusen verglichen und zeitliche Verlaufskurven für die Expression der mRNA erstellt (Abb. 5.9).

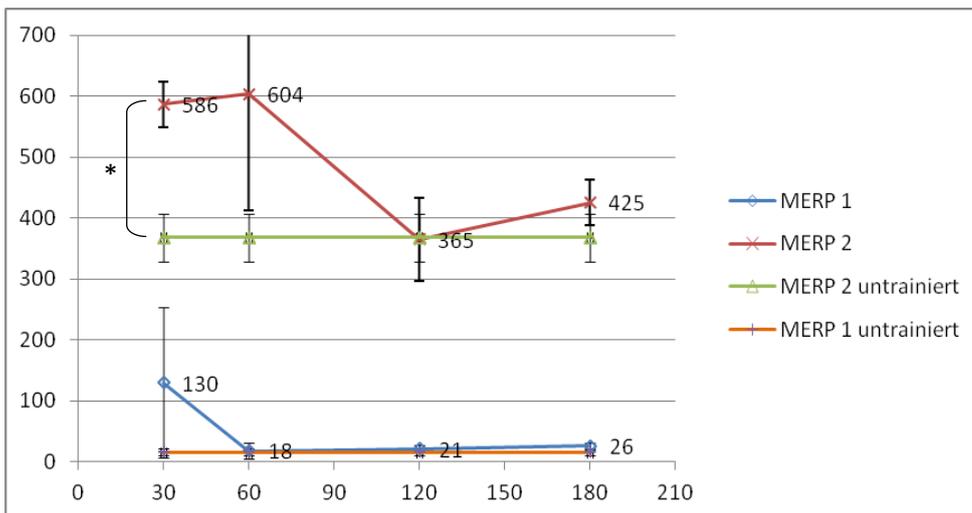
a



b



c



**Abb. 5.9: Verlauf der mRNA-Expression für MERP1 und MERP2 im Vergleich.** In den Abbildungen sind die zeitlichen Verläufe der mRNA-Expression von MERP1 und MERP2 wiedergegeben. Auf der Ordinate ist jeweils die Leuchtstärke in QL angegeben, auf der Abszisse die Zeit in Minuten. Die Fehlerbalken sind als Standardfehler der Mittelwerte dargestellt.

a) Es ist der zeitliche Verlauf der MERP1 mRNA-Expression zu erkennen. Nach dem 30 Minuten Wert bis hin zum 60 Minuten Wert kommt es zu einem Absinken der Expression (von 130 QL auf 18 QL), woraufhin sie sich bis zum 180 Minuten Wert dem 30 Minuten wieder annähert (von 18 QL über 21 QL auf 26 QL).

b) Das Expressionsmuster des MERP2 im Zeitraum von 30 bis 180 Minuten ist dargestellt. Hier kommt es von einem 30 Minuten Wert von 586 QL erst zu einer Steigerung auf 604 QL nach 60 Minuten. Daraufhin bricht der Wert nach 120 Minuten auf 365 QL ein, um 60 Minuten später wieder einen leicht höheren Wert von 425 QL zu erreichen. Keiner der Werte hat sich jedoch signifikant zueinander verändert.

c) In der letzten Abbildung sind beide Expressionskurven im Vergleich gegenübergestellt (blau = MERP1; rot = MERP2). Zusätzlich ist hier ein durchgängiger Wert für das Expressionsmuster für beide mRNAs von untrainierten Mäusen aufgetragen (orange = MERP1 untrainiert; grün = MERP2 untrainiert). Diese beiden Werte sind von der Zeitachse unabhängig und sind nur der Anschaulichkeit halber durchgehend aufgetragen. Das Expressionsmuster von MERP1 ist grundsätzlich niedriger als das des MERP2. Auch kommt es im Verlauf der Kurve von MERP2 erst zu einem Anstieg dann zu einem Abfall der Expressionsrate. Nach dem Abfallen der Expression steigert sich der Wert wieder etwas. Im gesamten Verlauf bleiben jedoch die Werte des MERP2 deutlich über denen des MERP1. Auch wenn das MERP1 nach 30 Minuten eine erhöhte mRNA Synthese aufzuweisen scheint, so ist hier jedoch die Standardabweichung zu beachten. Im weiteren Verlauf weichen die Werte kaum von denen der untrainierten Mäuse ab. Die Expression der MERP2 mRNA bei untrainierten Mäusen hat einen wesentlich höheren Wert als die des MERP1 (368 QL zu 16 QL). Auch scheint die Expressionsrate der MERP2 mRNA der trainierten Mäuse sich von dem Grundwert der untrainierten Mäuse zu unterscheiden, doch erzielt nur die Expression nach 30 Minuten einen signifikant höheren Wert im t-Test nach Student (\* = >95%).

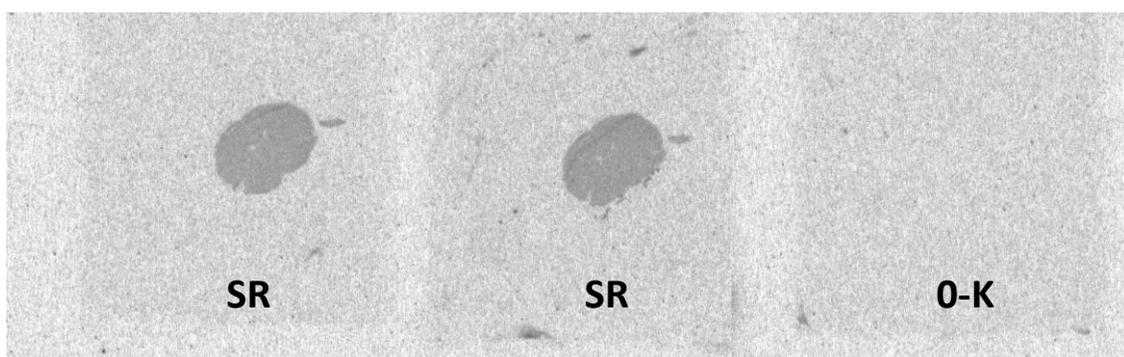
Wie in der Abbildung 5.9 deutlich zu erkennen ist, ergeben sich einige Unterschiede im mRNA-Expressionsmuster zwischen den beiden verwandten Genen MERP1 und MERP2. Deren Bedeutung wird im Diskussionsteil näher beleuchtet.

### 5. 3 *In-situ* Hybridisierung (ISH)

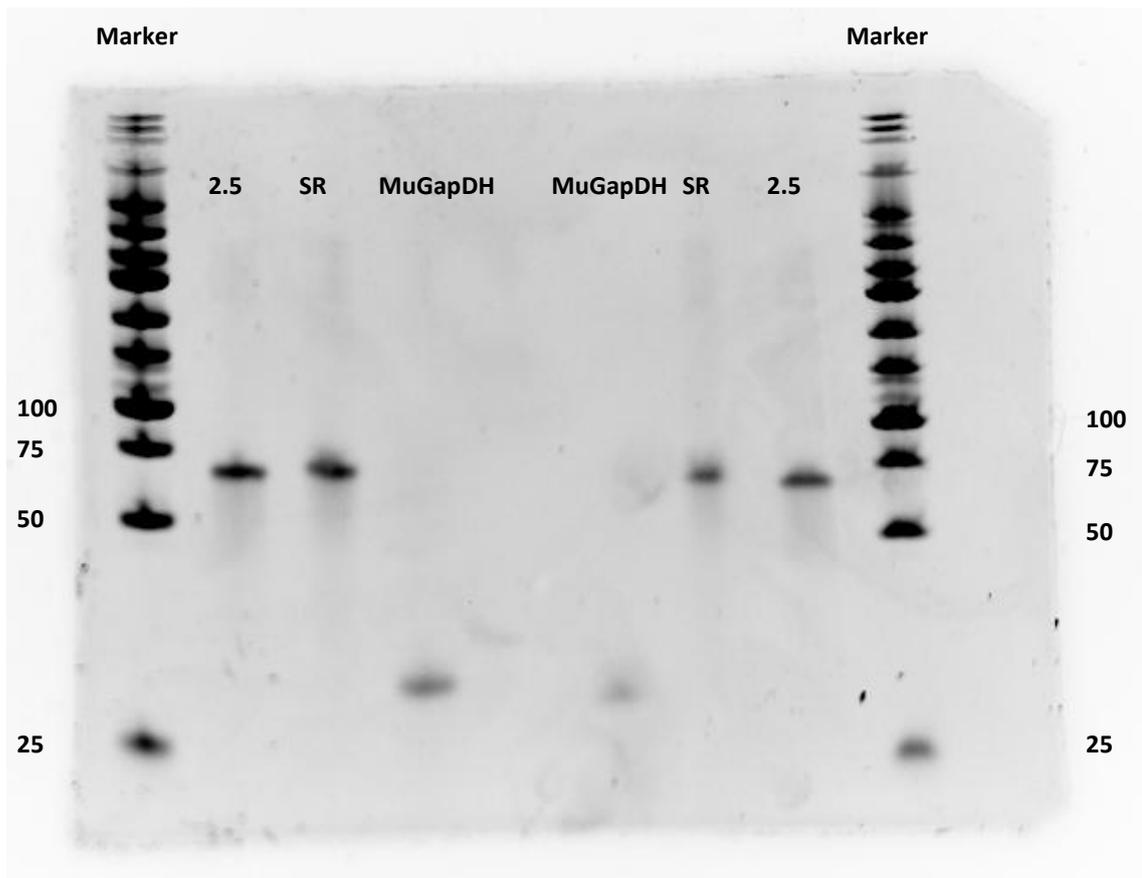
Im folgenden Versuchsteil werden die Ergebnisse der mRNA Untersuchung des MERPs mittels der *in-situ* Hybridisierung dargestellt. Hierzu wurden verschiedene Sonden erstellt und getestet, um die mRNA des MERP1 und MERP2 zu binden und anhand einer radioaktiven Koppelung deren Lage innerhalb von Gehirnschnitten der Maus zu lokalisieren. Ebenso wurden die Ergebnisse erneut auf Grund ihrer Einteilung in unterschiedliche Zeitgruppen (die Zeit des Tötens der Maus nach dem Lernereignis) miteinander verglichen und eine Zeitverlaufskurve erstellt. Nach den Vorversuchen hat sich gezeigt, dass eine ISH-Untersuchung des MERP1 nicht erfolgreich sein wird. Es konnten keine deutlichen Signale aufgezeichnet werden.

Zur Kontrolle wurden bei jedem Versuch Gehirnschnitte mit Sonden hybridisiert, welche eine randomisierte Sequenz aufwiesen (SR). Diese bestehen aus den gleichen Anteilen von Nukleinsäuren, wie die Sonden zum eigentlichen Nachweis (2.5). Ebenso wurde jeweils ein Gehirnschnitt nur mit Hybridisierungspuffer, jedoch ohne Sonde mit untersucht. Dieser diente als Null-Kontrolle (0-K) (Abb. 5.10).

Die verwendeten Sonden sind von der Firma Eurofins MWG bezogen worden. Nichtsdestotrotz wurden diese Sonden auf ihre Integrität hin überprüft. Dazu wurden sie auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Diese Kontrolle bestätigte die Reinheit und das Intaktsein der Sonden (Abb. 5.11).

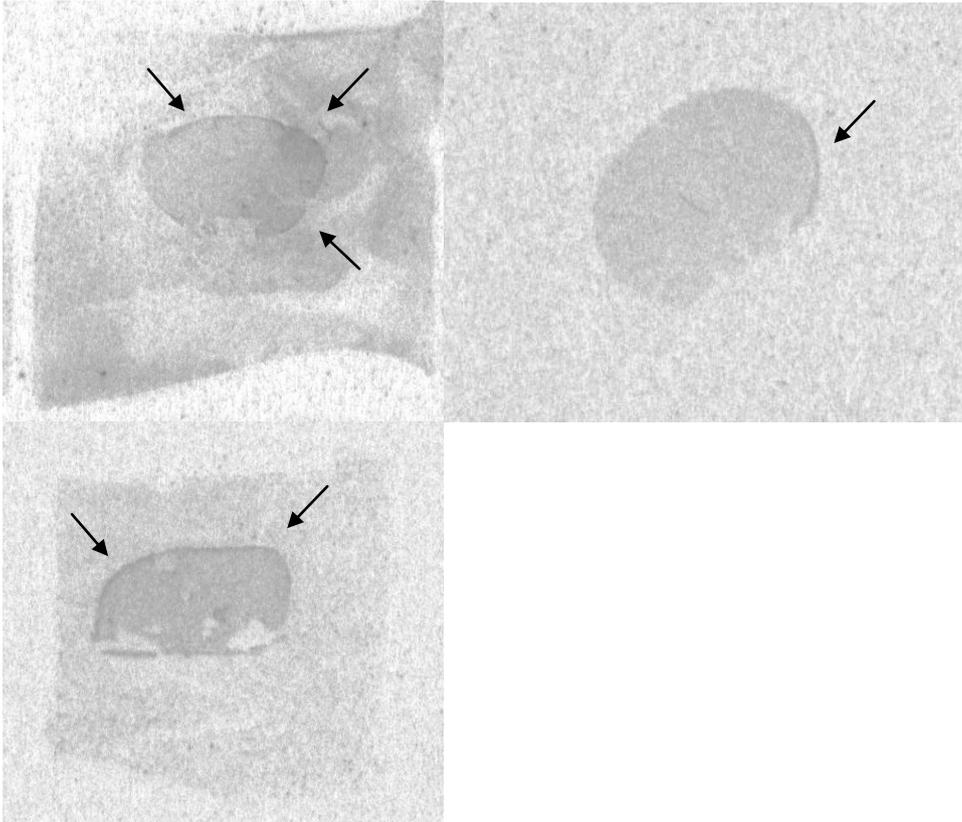


**Abb. 5.10: Gehirnschnitten der Maus mit randomisierter, bzw. keiner Sonde hybridisiert.** In der Abbildung erkennt man drei Objektträger mit jeweils einem Frontalschnitt des Mausgehirns. Die linken beiden Objektträger lassen die Kontur des Gewebes erkennen. Jedoch ist die Verteilung der Markierung innerhalb des Schnittes einheitlich (randomisierte Sonden; SR). Auf dem rechten Objektträger ist kein Gewebe zu sehen. Dieser Schnitt wurde ohne Sonde hybridisiert (Null-Kontrolle; 0-K).



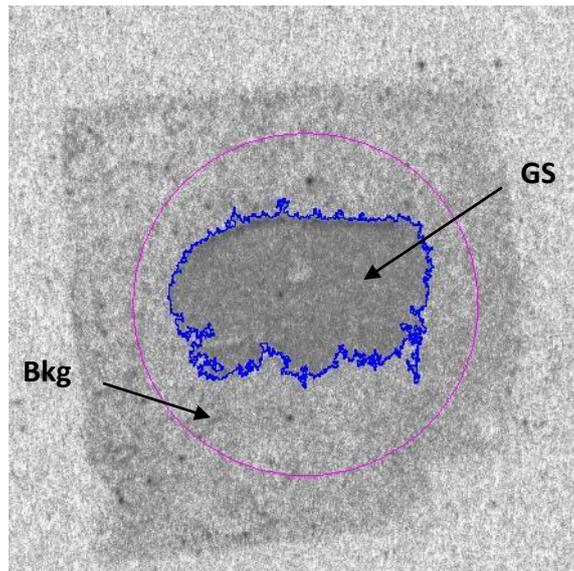
**Abb. 5.11: Integritätskontrolle der verwendeten Sonden.** In der Abbildung ist das Ergebnis einer Gelelektrophorese mit den Sonden 2.5, SR und MuGapDH zu sehen. Als Gel wurde ein Polyacrylamid-Harnstoff-Gel verwendet. Als *Marker* diente der GeneRuler™ DNA-Ladder, Low Range der Firma Fermentas. Die Bändergrößen sind in Basenpaaren angegeben. Die Taschen auf der rechten Seite des Gels wurden im Vergleich mit der linken Seite mit der halben Konzentration der Sonden, bzw. des *Markers* beladen. Man erkennt deutlich jeweils eine Band pro aufgetragener Sonde. Die Bänder der Sonden 2.5 und SR liegen auf gleicher Höhe, etwas unterhalb des 75 bp Bandes des *Markers*. Dies entspricht der Erwartung, da diese Sonden jeweils eine Größe von 64 bp haben.

Als Grundlage für die Auswertung der Ergebnisse wurden Frontal-Schnitte der Mausgehirne angefertigt. Als Ebenen wurden die Bereiche Neocortex, Hippocampus (Telencephalon), Thalamus und Hypothalamus (Diencephalon) verwendet. Die Auswertung erfolgte nach Exposition auf einem *Screen* durch den Phosphorimager FLA-7000 der Firma Fuji Film (Abb. 5.12). Ausgewertet wurden die erhaltenen Daten anschließend mit Hilfe der Software AIDA Image Analyzer v4.22.



**Abb. 5.12: Beispiele für das Auslesen der Screens nach der Exposition mit [S<sup>35</sup>]-markierten Sonden.** Es sind Ergebnisse einer ISH mit der *anti-sense* Sonde 2.5 abgebildet. Wie bei den Kontrollen sind auch hier kaum Konturen zu erkennen, jedoch sieht man dunkle Markierungen am Rand des Gehirnschnitts (schwarze Pfeile). Im Bereich der Meninx haben sich vermehrt Sonden angelagert.

Um die Unterschiede in den Markierungen der einzelnen Gehirnschnitte zu analysieren, wurden diese quantitativ ausgewertet. Dazu wurde das gleiche Program wie bei der Auswertung der RT-PCR verwendet (vergl. Ergebnisse 5.2). Entsprechend ist auch der Ablauf der Datenbearbeitung ähnlich dem der RT-PCR. Hierzu wurden zunächst die Leuchtstärken der Gehirnschnitte aufgenommen. Das Programm AIDA Image Analyzer beinhaltet eine Funktion, mit dem der Umriss von Flächen anhand von deren Kontur genau erkannt und die auszuwertenden Flächen diesen Konturen angepasst werden (Abb. 5.13). Das wurde mit allen *anti-sense* und randomisierten Sonden hybridisierten Schnitten durchgeführt. Somit konnte im nächsten Schritt erneut der individuelle Background für jeden Gewebeschnitt von diesem abgezogen werden. Die Berechnung erfolgte wie zuvor erläutert (vergl. Tab. 5.2).



**Abb. 5.13: Erfassen der Leuchtstärke des Gewebeschnitts und des individuellen Backgrounds.** Ein Beispiel für das Aufzeichnen der Leuchtstärke-Werte für den Gewebeschnitt und dessen Background. GS = Gewebeschnitt; Bkg = Background.

Die Markierung der verwendeten Sonden erfolgte durch eine Transferase, welche radioaktives [ $^{35}\text{S}$ ]- $\alpha$ -dATP als [ $^{35}\text{S}$ ]- $\alpha$ -dAMP an das Sonden-Ende gebunden hat. Das Problem bei der radioaktiven Markierung ist, dass die Signalstärke, also die Zerfallsrate, mit der Zeit abnimmt. Somit ist das zu detektierende Signal auch von dem Zeitpunkt der Markierung abhängig. Das Nuklid [ $^{35}\text{S}$ ] hat eine Halbwertszeit von 87,32 Tagen. Um der unterschiedlichen Signalstärke Rechnung zu tragen, muss der Zeitraum berücksichtigt werden, welcher zwischen dem Bestimmen der Aktivität der markierten Sonden und dem tatsächlichen Exponieren der Gewebeschnitte auf einem Screen liegt. Dies erfolgte durch das Einführen des Zerfalls-Quotienten (Tab. 4.5).

<b>Zerfallsgesetz</b>	$N(t) = N_0 \times e^{-\lambda \times t}$
<b>Zerfallskonstante <math>\lambda</math> berechnet durch HWZ</b>	
	$T_{1/2} = \ln 2 / \lambda$
	$87,32d = 0,69 / \lambda$
	$\lambda = 0,69 / 87,32d$
	$\lambda = 0,0079 \text{ 1/d}$

<b>Markierung der Sonden am</b>	10.06.2011
<b>Eingesetzte Aktivität</b>	7,5 kBq
<b>Auslesen des Screens am</b>	21.06.2011
<b>Differenz in Tagen</b>	11

<b>Berechnung</b>
$N(11) = N_0 \times e^{-0,0079 \text{ 1/d} \times 11d}$
$N(11) = 7,5 \text{ kBq} \times 2,7182^{-0,0079 \text{ 1/d} \times 11d}$
$N(11) = 7,5 \text{ kBq} \times 2,7182^{-0,0869}$
$N(11) = 7,5 \text{ kBq} \times 0,9167$
$N(11) = 6,8753 \text{ kBq}$

<b>Zerfalls-Quotient</b>
$7,5 \text{ kBq} / 6,8753 \text{ kBq} = 1,0909$

LfdNr.:	Leuchtstärke Gewebe - Hintergrund	multipliziert mit Zerfalls-Quotient
2 Schnitt 1	28,8	31,41

**Tab. 5.5: Beispiel zur Berechnung des Zerfalls-Quotienten.** In der Tabelle ist an einem Beispiel gezeigt, wie sich der Zerfalls-Quotient berechnet. Ausgehend vom Zerfallsgesetz kann bei bekannter Ausgangsaktivität ( $N_0$ ) und der vergangenen Zeit ( $t$ ) seit deren Messung, die noch vorhandene Aktivität bestimmt werden. Dazu wird die Zerfallskonstante ( $\lambda$ ) benötigt. Diese ist spezifisch für das Nuklid und lässt sich aus der Halbwertszeit (HWZ) ermitteln. Im oben gezeigten Beispiel beträgt  $N_0 = 7,5 \text{ kBq}$  und  $t = 11$  Tage. Setzt man diese Werte ein, so erhält man für die Aktivität zum Zeitpunkt der Exposition einen Wert von ungefähr 6,9 kBq, was noch etwa 91,6% der Ursprungs-Aktivität entspricht. Somit ergibt sich eine Diskrepanz zwischen eingesetzter und tatsächlicher Aktivität um den Faktor 1,09. Dies entspricht dem Zerfalls-Quotienten für dieses Beispiel. Daher wurden alle gemessenen Werte dieser *in-situ* Hybridisierung mit diesem Zerfalls-Quotienten multipliziert. Im obigen Beispiel ergibt sich als Wert, nach der Korrektur des Hintergrundes und unter Berücksichtigung des radioaktiven Zerfalls, 31,41 QL. d = Tag; kBq = kilo Becquerel (1 Bq = 1 Zerfall / 1 Sekunde).

Nachdem der Hintergrund abgezogen und die Zerfallsrate der Radioaktivität berücksichtigt wurde, erfolgte die Einteilung der Messwerte in Gruppen, geordnet anhand der Überlebensdauer nach dem Lernereignis. Dazu wurde ein Mittelwert aller Gehirnschnitte, die zu einer Maus und einem Sonde-Typ gehören, pro *in-situ* Hybridisierung berechnet. Diese Werte wurden mit einem *Inter-Assay* Faktor multipliziert (siehe nächster Abschnitt und Tab. 5.7). Im nächsten Schritt wurde ein Mittelwert für jede Maus aus den vorherigen Mittelwerten gebildet, immer noch getrennt nach Sonden-Typ. Um die unspezifischen Bindungen der *anti-sense*

Sonde aus den Berechnungen zu eliminieren, wurde der jeweilige Wert der randomisierten Sonde von dem der *anti-sense* Sonde subtrahiert. Im Anschluss daran wurde der letzte Mittelwert gebildet. Dieser setzt sich aus den Mittelwerten der Mäuse für den jeweiligen Todeszeitpunkt zusammen: 30 Minuten, 60 Minuten, 120 Minuten und 180 Minuten nach dem Lernereignis.

Mit allen auffälligen Werten wurde ein Ausreißertest nach Nalimov (Kaiser und Gottschalk, 1972) durchgeführt (Tab. 5.6). Dieser statistische Test dient dem Auffinden von Ausreiser-Werten innerhalb einer normalverteilten Stichprobe und deren Eliminierung.

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

<b>q</b>	Testgröße
<b>x<sub>1</sub></b>	Untersuchter Wert
<b>x Strich</b>	Mittelwert aller Werte inkl. X1
<b>s</b>	STABW
<b>n</b>	Probenanzahl
Freiheitsgrade f = n-2	

LfdNr.	5 a
Werte	667 466 433 477 341 381 434 438 407 586 <b>296</b>
x1	296
x Strich	448
s	459
n	11
f	9

LfdNr. 5 a		
<b>Gesamt Ø</b>	448	
<b>Einzelwerte - Gesamt Ø</b>		<b>&lt;-- Quadriert</b>
1	667	444649
2	466	216988
3	433	187212
4	477	227415
5	341	115947
6	381	145336
7	434	188634
8	438	191800
9	407	165250
10	586	342845
11	296	87498
<b>Summe</b>		2313575
<b>Summe / n</b>		210325
<b>STABW</b>		<b>459</b>

x1 - x Strich	-152
/ s	-0,33
Betrag	<b>0,33</b>
n-1	10
n / n-1	1,10
Wurzel	<b>1,05</b>
<b>q</b>	<b>0,35</b>

q <sub>crit</sub> für sigma = 0,05	1,903
------------------------------------	-------

-->	<b>x1 ist KEIN Ausreißer</b>
-----	------------------------------

**Tab. 5.6: Beispiel zur Anwendung des Ausreißertests nach Nalimov.** In der Tabelle ist die Berechnung des Nalimov-Ausreißertests anhand eines Beispiels dargestellt. Als Kriterium für die Durchführung dieser statistischen Untersuchung muss es sich um annähernd normalverteilte Werte handeln. Zur Analyse wird die Stichprobe durch den Mittelwert und deren Varianz definiert. Mittels des Signifikanzniveaus in Abhängigkeit von den Freiheitsgraden der Stichprobe kann nun überprüft werden, ob der betrachtete Wert noch innerhalb des zugelassenen Rahmens der Verteilung liegt oder herausfällt.

Im obigen Beispiel wurde der Wert 296 der Stichprobe untersucht. Da der kritische Wert der Stichprobe ( $q_{crit}$ ) bei neun Freiheitsgraden für ein Signifikanzniveau von 0,05 (1,903) durch den errechneten Wert für  $q = 0,35$  nicht überschritten wurde, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Messwert innerhalb der Normalverteilung der Stichprobe liegt. STABW = Standardabweichung;  $n$  = Anzahl der Stichprobenelemente; Stichprobenwerte sind angegeben in QL.

Während der Mittelwertberechnungen wird ein *Inter-Assay* Faktor eingeführt. Dieser hat die Aufgabe, die unterschiedlichen Expositionszeiten und die dadurch verursachten Leuchtstärken Unterschiede der radioaktiven Markierungen auszugleichen. Dafür wurde während jeder Exposition ein [ $^{14}\text{C}$ ]-*Marker* mit bekannter Aktivität auf die *Screens* mit aufgebracht. Da das [ $^{14}\text{C}$ ] eine Halbwertszeit von 5730 Jahren hat, ist diese für die hier vorgenommenen Berechnungen zu vernachlässigen. Somit kann gesagt werden, dieser *Marker* ergibt einen Leuchtstärke-Wert, welcher immer konstant ist und nur durch die Dauer der Exposition beeinflusst wird. Mittels des Umriss-Werkzeugs der Software AIDA Image Analyzer (vergl. Abb. 5.13) konnte dem Marker ein Leuchtstärke-Wert zugeordnet werden. Diese Werte wurden zur Berechnung des *Inter-Assay* Faktors benutzt (Tab. 5.7).

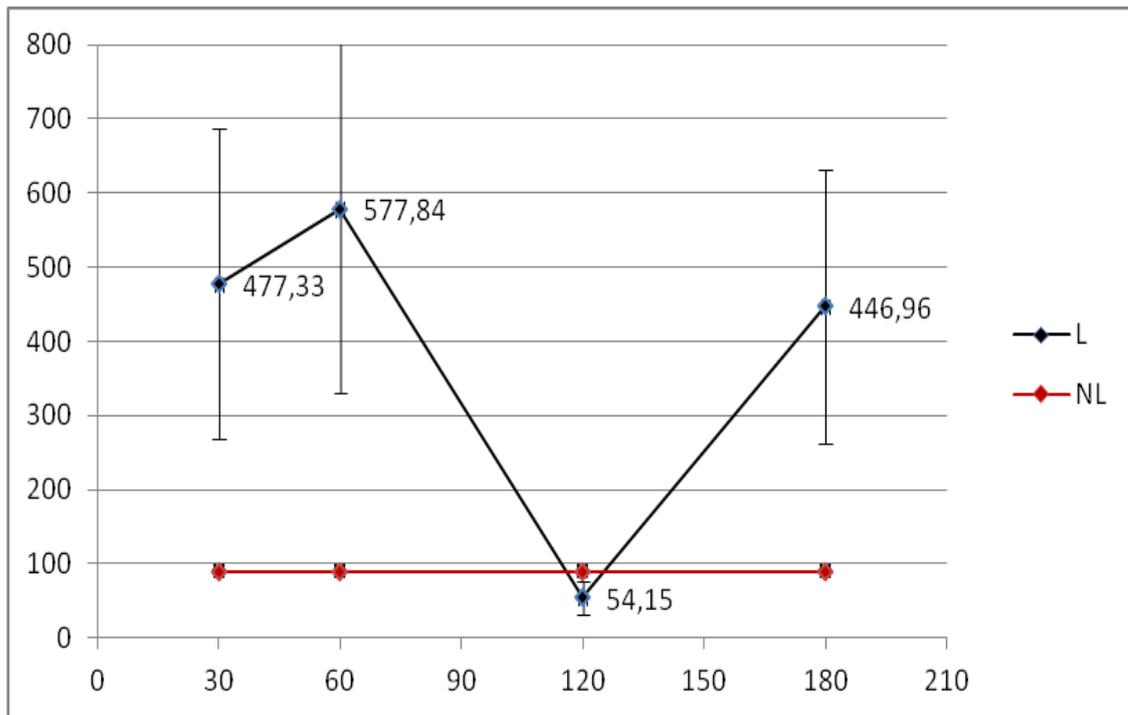
<b>Mittelwert der Marker-Leuchtstärke</b>
114369

LfdNr.	Leuchtstärke Marker - Hintergrund	Marker-Faktor
11 a	90430	1,27

LfdNr.	Leuchtstärke Mittelwert 2.5	Leuchtstärke Mittelwert SR	2.5 multipliziert mit Marker-Faktor	SR multipliziert mit Marker-Faktor
11 a	924	173	1174	220

**Tab. 5.7: Berechnung des Inter-Assay Faktors und seine Anwendung.** In der Tabelle ist die Berechnung und Verwendung des *Inter-Assay* Faktors (*Marker-Faktor*) dargestellt. Jeder *in-situ* Hybridisierung wurde ein Leuchtstärke-Wert anhand des *Markers* zugeordnet. Nach Abzug des Hintergrundes wurde aus diesen Werten ein Mittelwert gebildet. Dieser diente als Referenzgröße zur Bestimmung des *Marker-Faktors*. Der *Marker-Mittelwert* wurde durch jede einzelne *Marker-Leuchtstärke* dividiert und ergab somit den Wert, der mit den dazu gehörenden Leuchtstärken der Gewebeschnitte der entsprechenden *in-situ* Hybridisierung multipliziert wurde. In der Tabelle ist dies am Beispiel für die LfdNr. 11 a dargestellt. Für alle Gewebeschnitte, die auf diesem *Screen* mit exponiert wurden, ergab sich ein Multiplikator von 1,27. In Folge dessen steigerten sich die Leuchtstärken für 2.5 von 924 QL auf 1174 QL und die für SR von 173 QL auf 220 QL. Alle Leuchtstärke Angaben in QL.

Mit diesen so gewonnenen Werten wurde nun eine Zeitverlaufskurve erstellt. Hierzu wurde die Leuchtstärke gegen die vier Zeitgruppen aufgetragen. Ebenfalls wurde als Vergleichswert die Leuchtstärke von *in-situ* hybridisierten Gewebeschnitten von „nicht-Lerner“ Mäusen mit aufgetragen (Abb. 5.14).



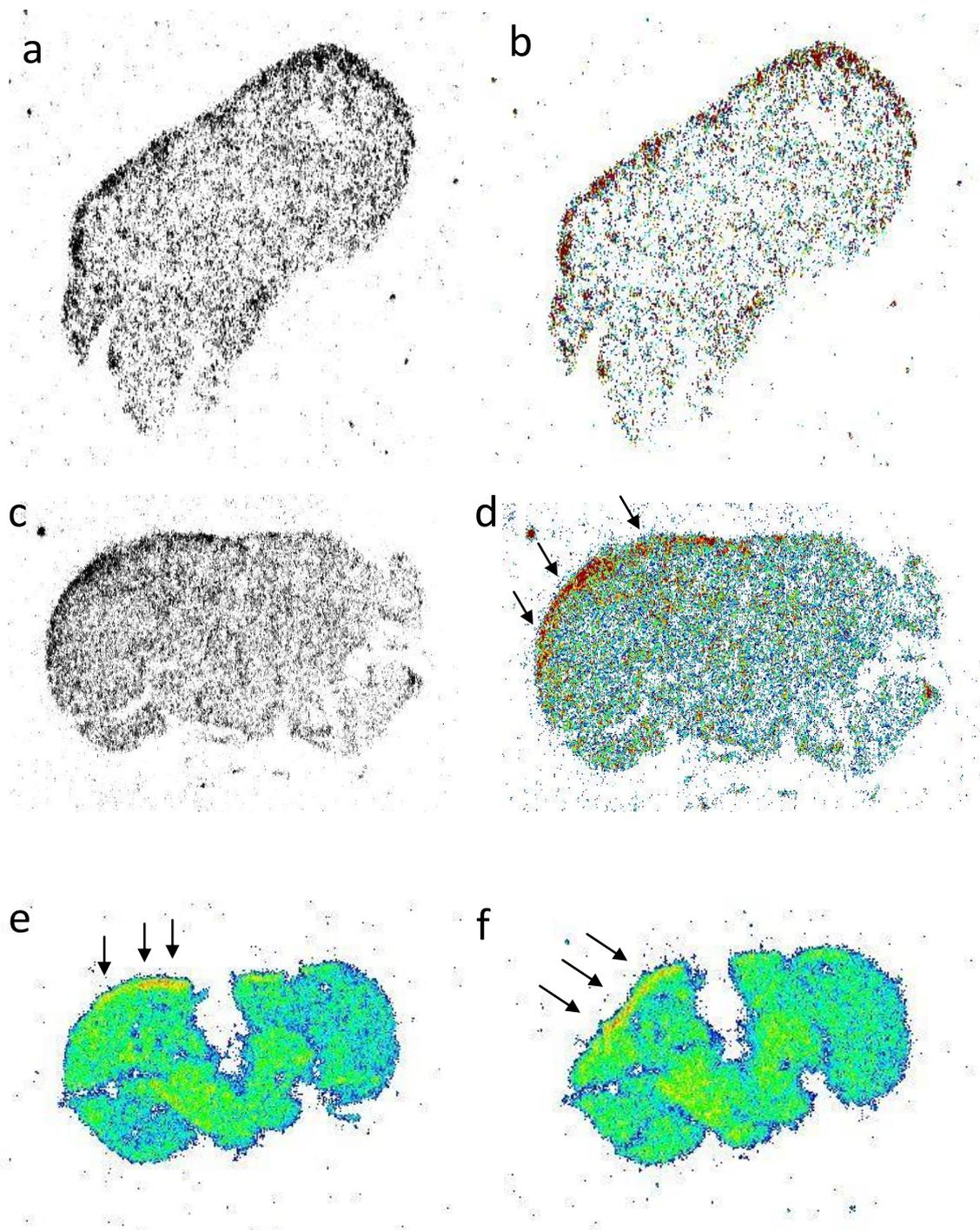
**Abb. 5.14: Zeitverlauf der mRNA von MERP2 bei *in-situ* Hybridisierungen.** In der Abbildung ist der zeitliche Verlauf der mRNA-Expression von MERP2 im Mausgehirn gezeigt. Auf der Ordinate ist die Leuchtstärke in QL aufgetragen, auf der Abszisse die Zeit in Minuten. Die Fehlerbalken sind als die Standardfehler der Mittelwerte angegeben. „Lerner“ (L) sind in schwarz, „nicht-Lerner“ (NL) in rot dargestellt. 30 min n = 5; 60 min n = 4; 120 min n = 4; 180 min n = 7.

Es ist zu erkennen, dass es zu einem deutlichen Anstieg der mRNA Expression des MERP2 von 30 Minuten bis hin zu 60 Minuten nach dem Lernereignis kommt (477 QL und 578 QL). Innerhalb der nächsten Stunde fällt die Expressionsrate jedoch wieder stark ab, sogar bis unterhalb des Ausgangswertes (54 QL). 60 Minuten später jedoch hat sich dieser Wert ungefähr verneunfacht (447 QL), was den höchsten Wert der Verlaufskurve widerspiegelt.

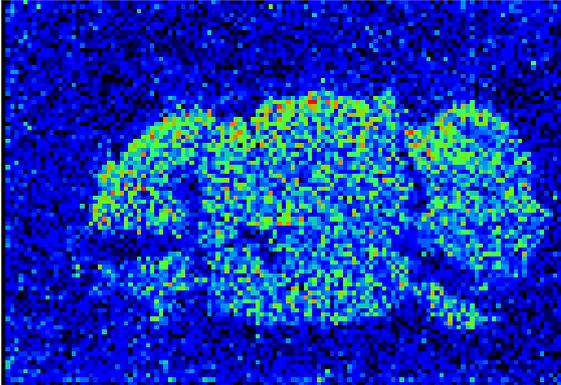
Wie in der Abbildung 5.14 zu sehen ist, ergibt sich kein linearer Verlauf der Expressionskurve des MERP2 nach einem Lernereignis. In der Diskussion wird unter anderem auf dieses Ergebnis eingegangen, vor allem im Hinblick auf den Vergleich mit der MERP2 Expressionskurve aus den RT-PCR Versuchen (vergl. Abb. 5.9 b).

Für die einzelnen Zeitpunkte, welche zur Erstellung dieser Kurve untersucht wurden, sind jeweils ungepaarte t-Tests durchgeführt worden (vergl. Tab. 5.1). Diese ergaben jedoch keine Signifikanzen für irgendeine Paarung. Erwähnenswert ist jedoch, dass die Tau-Werte für den Vergleich von 60 Minuten mit 120 Minuten und den Vergleich von 120 Minuten mit 180 Minuten den Signifikanzwert für 0,95 nur knapp verfehlten.

Der weitere Aspekt dieses Versuchs lag auf der Lokalisierung des Expressionsortes des MERP2. Durch die Gewebeschnitte und deren visuellen Auswertung anhand des Phosphorimagers konnte eine Zuordnung zu den entsprechenden Geweben innerhalb des Mausgehirns erzielt werden. Um eine deutlichere Zuordnung der erhaltenen Signale zu dem jeweiligen Gewebe machen zu können, wurden Gehirnschnitte zusätzlich zum Phosphorimager auch mit dem Microimager untersucht. Die Ergebnisse sind in den Folgenden Abbildungen dargestellt (Abb. 5.15).



g



**Abb. 5.15: Beispiele zur Lokalisierung des MERP2 Expressionsortes.** In den Abbildungen sind jeweils Aufnahmen von Frontalschnitten des Mausgehirns nach einer *in-situ* Hybridisierung mit der [<sup>35</sup>S] markierten *anti-sense* Sonde 2.5 gegen die MERP2 mRNA gezeigt. Die Bilder (a) bis (f) sind durch den Phosphorimager, die Abbildung (g) durch den Microimager aufgezeichnet worden. Alle Bilder sind mit Hilfe der Software zum Auswerten der Bilder bearbeitet worden. Daher sind die Farbstufen bzw. die Grauwerte, welche die Leuchtstärke darstellen, auch nicht ohne Weiteres in den Abbildungen untereinander vergleichbar. Diese Darstellungsweise wurde lediglich angewendet, um die Lokalisierungen zu verdeutlichen.

a) und b) In beiden Bildern sind die gleichen Schnitte abgebildet, in der ersten als Graustufen-, in der zweiten als Falschfarben-Darstellung. Es ist eine grundsätzliche Hintergrundmarkierung über das gesamte Gewebe zu erkennen. Jedoch konzentriert sich eine große Menge der Sonde am dorsalen Rand des Gehirns. Diese stärkere Markierung erstreckt sich temporal weiter.

c) und d) Die nächsten Abbildungen sind auf die gleiche Weise wie a) und b) dargestellt. Auch die Markierungen entsprechen grundsätzlich denen der vorher gezeigten. Jedoch ist hier eine stärkere Markierung fast ausschließlich in der linken Hemisphäre auszumachen. Ebenso erkennt man in Abbildung d), dass scheinbar nicht der äußere Rand, sondern eine dort anliegende Schicht markiert ist (Pfeile).

e) und f) Hier sind zwei unterschiedliche Schnitte in Falschfarben gezeigt. Der Schnitt ist median gerissen. Ebenso wie in den Abbildungen (c) und (d) sieht man hier eine ungleichmäßige Verteilung der Markierungen am dorsalen Rand der linken Hemisphäre. Noch deutlicher als zuvor lässt sich ausmachen, dass die stärksten Markierungen nicht direkt am Rand des Gewebes liegen.

g) In der letzten Darstellung ist das Ergebnis einer Microimager Aufnahme gezeigt. Hier erkennt man die gleiche Verteilung wie bereits zuvor. Auch ein leichter Gradient der stärkeren Markierung von der linken Hemisphäre zur rechten ist auszumachen.

Wie in den Abbildungen zu erkennen, scheint es eine Präferenz der Sonden für den meningealen oder submeningealen Bereich zu geben. Ebenso ist ein Gradient für die Markierungen hin zur linken Hemisphäre auszumachen. Um auszuschließen, dass es sich hierbei um eine manuelle Artefaktbildung handelt, wurden die Gewebeschnitte in der Hybridisierungskammer während der Hybridisierung immer in abwechselnder Orientierung gelagert. Ebenfalls wurde eine Wasserwaage zum Ausrichten der Kammer verwendet. Auszuschließen ist ein künstliches Zustandekommen dieses Gradienten dadurch nicht, jedoch wurde die Wahrscheinlichkeit stark eingegrenzt.

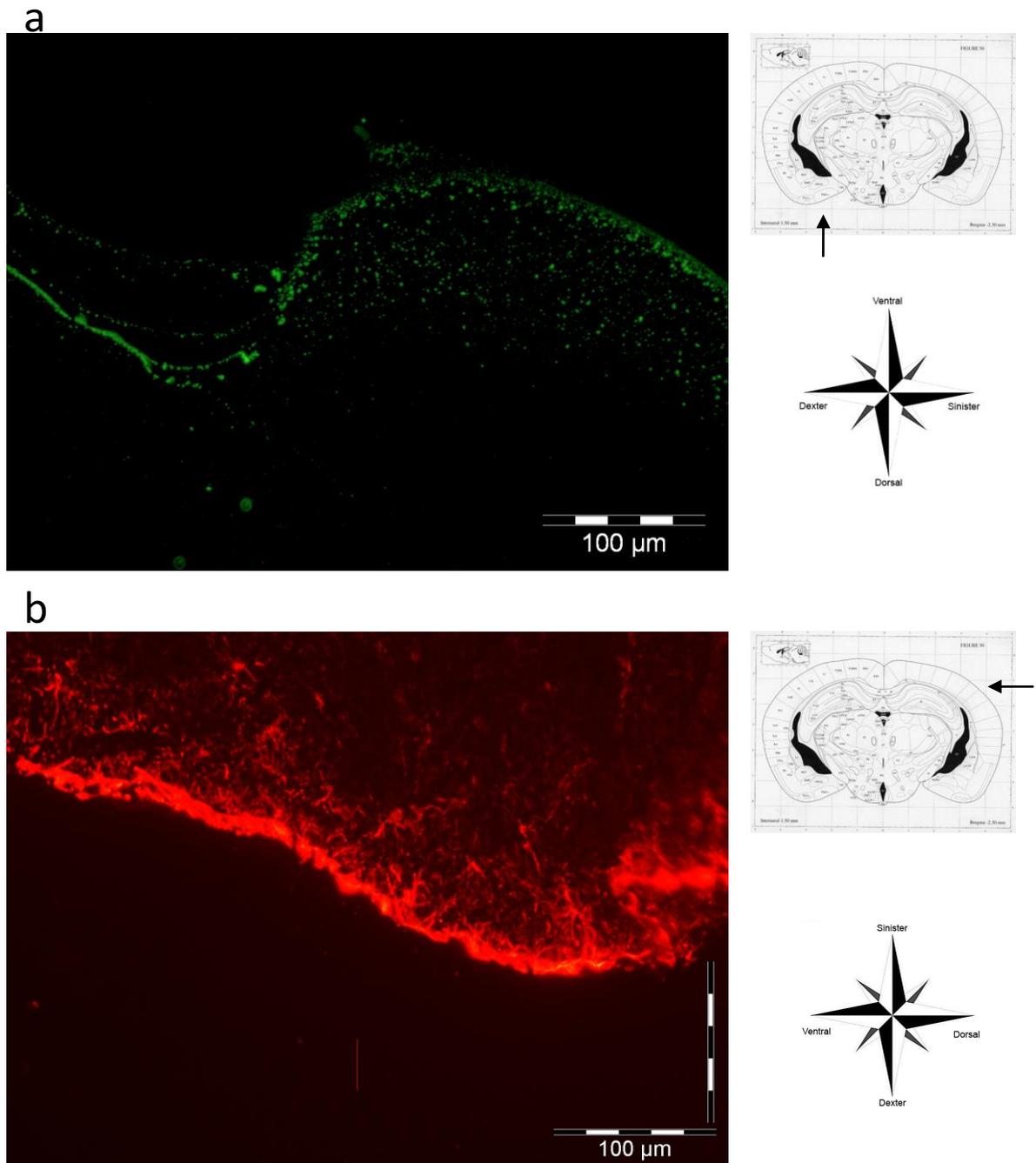
## 5. 4 Immunhistochemie

Im Abschließenden Ergebnisteil wird die Lage der MERP-Proteine immunhistochemisch untersucht. Antikörper wurden auf Gehirnschnitte von Mäusen gegeben und diese durch ein sekundäres Antikörper- / Fluorophor-System sichtbar gemacht. Als primäre Antikörper wurden vier verschiedene eingesetzt:

- Anti-Ependymin Antikörper *Perseus*
- Anti-Ependymin Antikörper *Beteigeuze*
- Anti-Epdr I Antikörper
- Anti-GFAP Antikörper

Die beiden ersten Antikörper wurden in den Kaninchen *Perseus* und *Beteigeuze* hergestellt. Sie sind gegen das piscine Pendant Ependymin gerichtet. In früheren Arbeiten wurde Kreuzreaktivität mit Ratten gezeigt (Schmidt et al., 1986) und auch Vorversuche lieferten positive Resultate. Somit boten sich diese Antikörper an, da eine hohe Wahrscheinlichkeit bestand, dass sie auch das MERP binden. Des Weiteren wurde das Anti-Epdr I (Epdr = *Ependymin related*) kommerziell erworben. Hierbei handelt es sich um einen Antikörper, der das menschliche Ependymin-verwandte Protein, das Epdr I oder auch humanes MERP1, bindet. Dessen Struktur ist eng verwandt mit dem murinen MERP (Apostolopoulos, 2001). Da dieses Antiserum jedoch synthetisch, sprich gegen eine ungefaltete Proteinsequenz hergestellt wurde, war auch hier ein Erfolg nicht zu 100% gesichert. Somit wurde diese Kombination verwendet, um deren Ergebnisse dann zu vergleichen. Der vierte Antikörper ist gegen das *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) gerichtet. Es wurde eingesetzt, um zu beobachten, ob das MERP auch bei Astrocyten oder Ependymalen Zellen zu finden ist. Im Fisch sind letztere die Art von Zellen, welche dem Ependymin seinen Namen gegeben haben, da es dort zuerst entdeckt wurde. Wie schon beschrieben, scheint die Region der Meninx der Maus als ein Syntheseort des MERP2 in Betracht zu kommen (vergl. Abb. 5.15). Daher dient diese Markierung der Überprüfung, ob die GFAP-Zellen in der Nähe der Meninx vorkommen und das MERP dort in größeren Mengen in deren unmittelbaren Umgebung auftritt. Dies wäre ein weiterer Hinweis auf diese Zellen als Translationsort des MERP. Doppelmarkierungen zwischen Anti-GFAP und den anderen Antikörpern waren nicht möglich, da alle im gleichen Organismus hergestellt wurden. Bilder von Kontrollen werden nicht gezeigt, da diese negativ waren. In den folgenden Abbildungen sind zur Orientierung rechts Windrosen und Orientierungshinweise anhand eines Maus Gehirnatlanten (Paxinos, 2004) angegeben. Die Pfeile stellen den Ausschnitt dar. Die gesamte Helligkeit der Bilder wurde zur besseren Darstellung für die gedruckte Version erhöht.

Zuerst sollen hier die immunhistochemischen Markierungen des MERP an deren vermuteten Syntheseort, der Meninx, gezeigt werden.

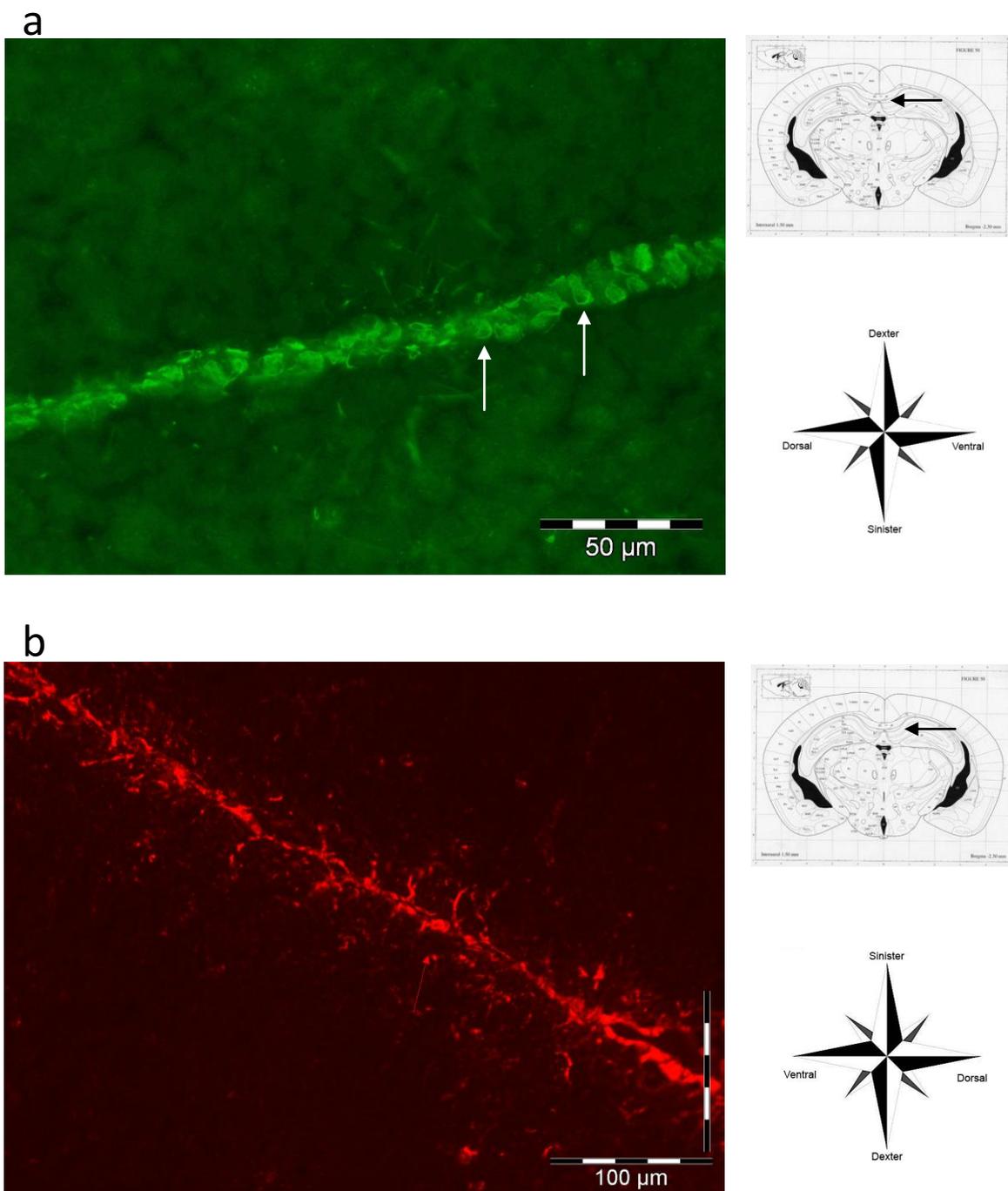


**Abb. 5.16: Antikörpermarkierungen im Bereich der Meninx.**

a) Eine Antikörpermarkierung mit dem Anti-Epdr1 Antiserum ist abgebildet. Man erkennt deutlich eine linienförmige Markierung. Dies stellt die Meninx dar. Vereinzelt Markierungen unterhalb dieses Bandes sind ebenfalls zu erkennen. In ventraler Richtung hat sich die Meninx vom Gehirn gelöst. Die Belichtungszeit betrug 1 Sekunde, die Objektivvergrößerung 20fach.

b) In der zweiten Abbildung ist ebenfalls die Meninx dargestellt. Dieses Mal wurde der Anti-GFAP Antikörper verwendet. Eine deutliche Markierung dieser ist zu erkennen. Somit scheint dieses Gewebe GFAP-haltige Zellen zu beherbergen. Die Belichtungszeit betrug 2 Sekunden, die Objektivvergrößerung 20fach.

Weitere Markierungen wurden ebenfalls weiter medial gefunden. Es zogen sich Fluoreszenzsignale dorsal von der Meninx ausgehend sagittal zur Gewebemitte hin (Abb. 5.17). Bei genauerer Betrachtung handelt es sich hierbei jedoch ebenfalls um Gewebe der Meninx. Diese „Mittellinie“ ist eine Invagination der Meninx und führt in das Gehirn hinein, wo sie eine weitere Rolle übernimmt.

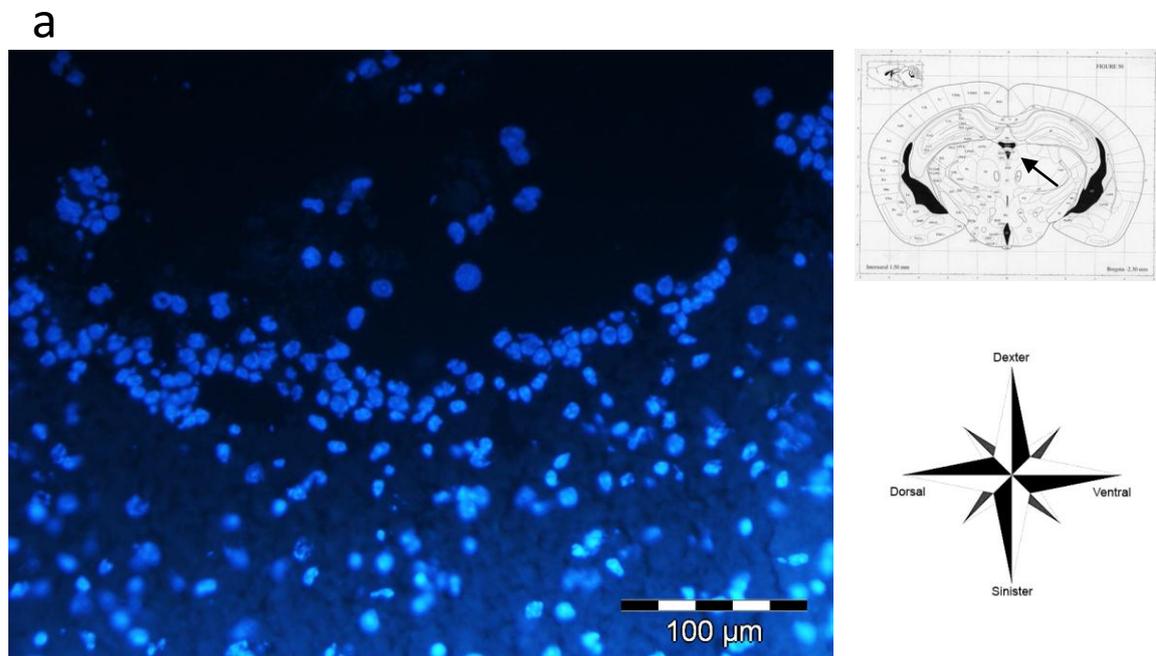


**Abb. 5.17: Fluoreszenzmarkierungen entlang einer „Mittellinie“.** In den Abbildungen sind jeweils Markierungen an der „Mittellinie“ zu erkennen. Bei dieser Struktur handelt es sich um eine Invagination der Meninx. Sie führt weiter medial ins Gehirn.

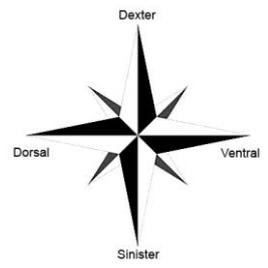
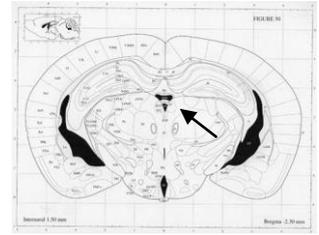
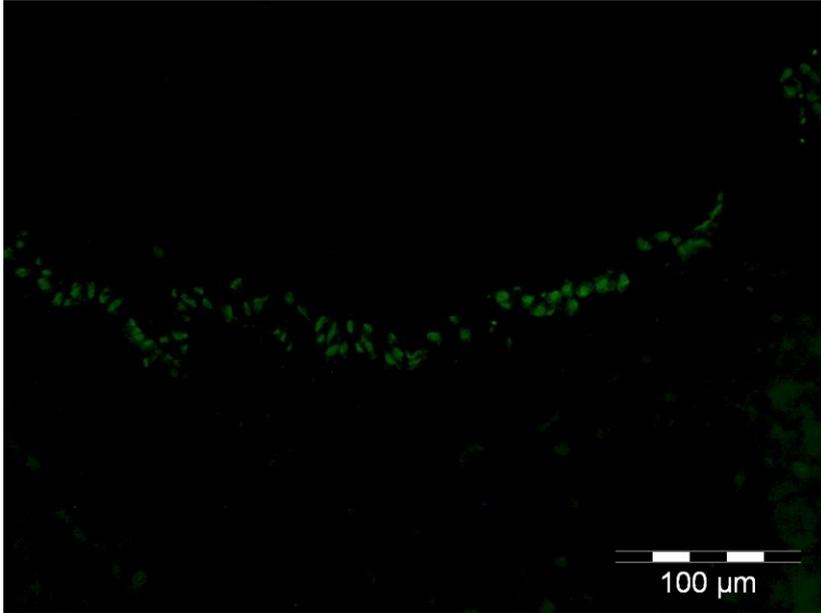
a) In der ersten Graphik ist eine Markierung mit dem Anti-Ependymin Antikörper *Perseus* dargestellt. Entlang der „Mittellinie“ erkennt man Bindungen des Antikörpers. Ebenfalls ist zu sehen, dass der Antikörper scheinbar nicht die gesamte Zelle bedeckt, sondern den Zellkern ausspart (weiße Pfeile). Die Belichtungszeit betrug 500 Millisekunden, die Objektivvergrößerung 40fach.

b) In dieser Abbildung ist erneut der GFAP-Antikörper verwendet worden. Das Ergebnis entspricht dem aus Abb. 5.16. Auch hier ist die gleiche Struktur, welche auch vom Ependymin-Antikörper erkannt wurde, markiert. Die Belichtungszeit betrug 2 Sekunden, die Objektivvergrößerung 20fach.

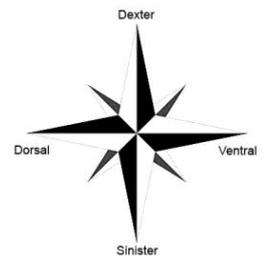
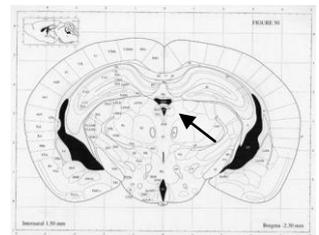
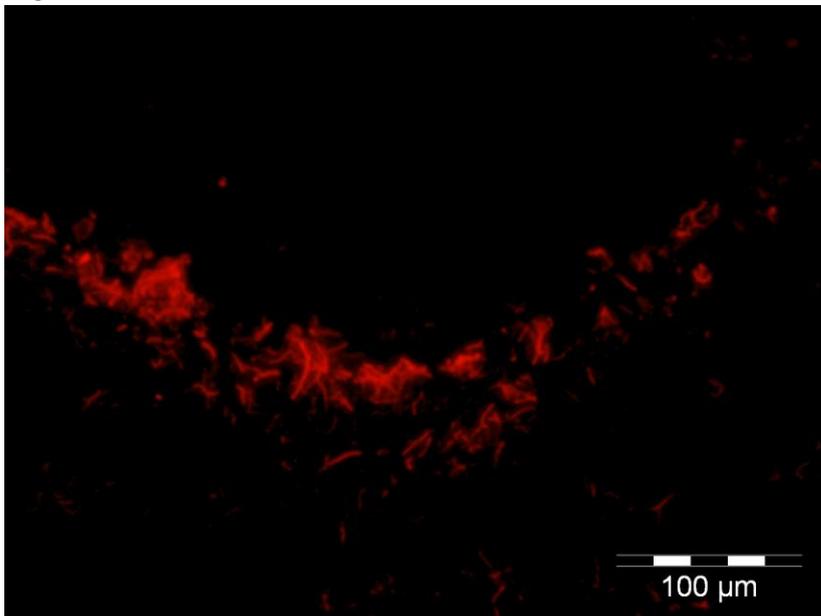
Die „Mittellinie“ erstreckt sich medial weiter. Sie mündet schließlich in den dorsalen dritten Ventrikel, welchen sie auskleidet. Somit ist auch die Funktion der „Mittellinie“ als evolutionärer Migrationsweg der Zellen zu deuten. Es ist daher auch nicht weiter verwunderlich, dass diese Zellen ebenfalls durch die Antikörper markiert wurden (Abb. 5.18). Tatsächlich sind hier regelmäßig starke Signale zu detektieren gewesen.



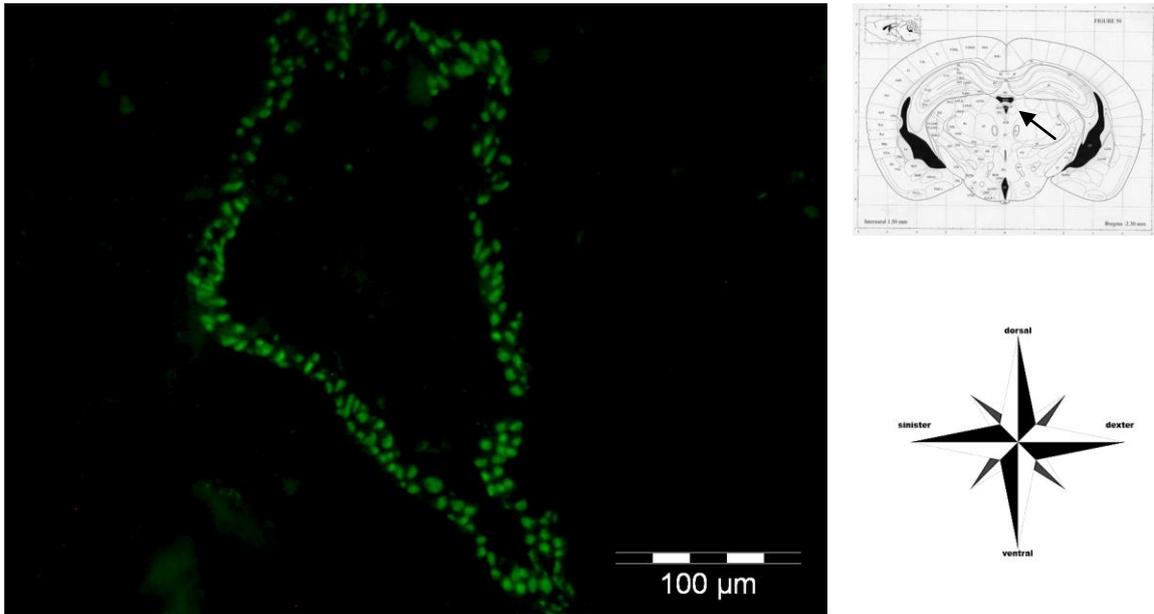
b



c



d



**Abb. 5.18: Anti-Ependymin und anti-GFAP Markierungen am Rand des dorsalen dritten Ventrikels.** Die Abbildungen zeigen verschiedene Markierungen, bzw. Gegenfärbungen von der Region um den dorsalen dritten Ventrikel. Die in Abb. 5.17 gezeigte „Mittellinie“ mündet in der hier von den Antikörpern gebundenen Auskleidung des Ventrikels.

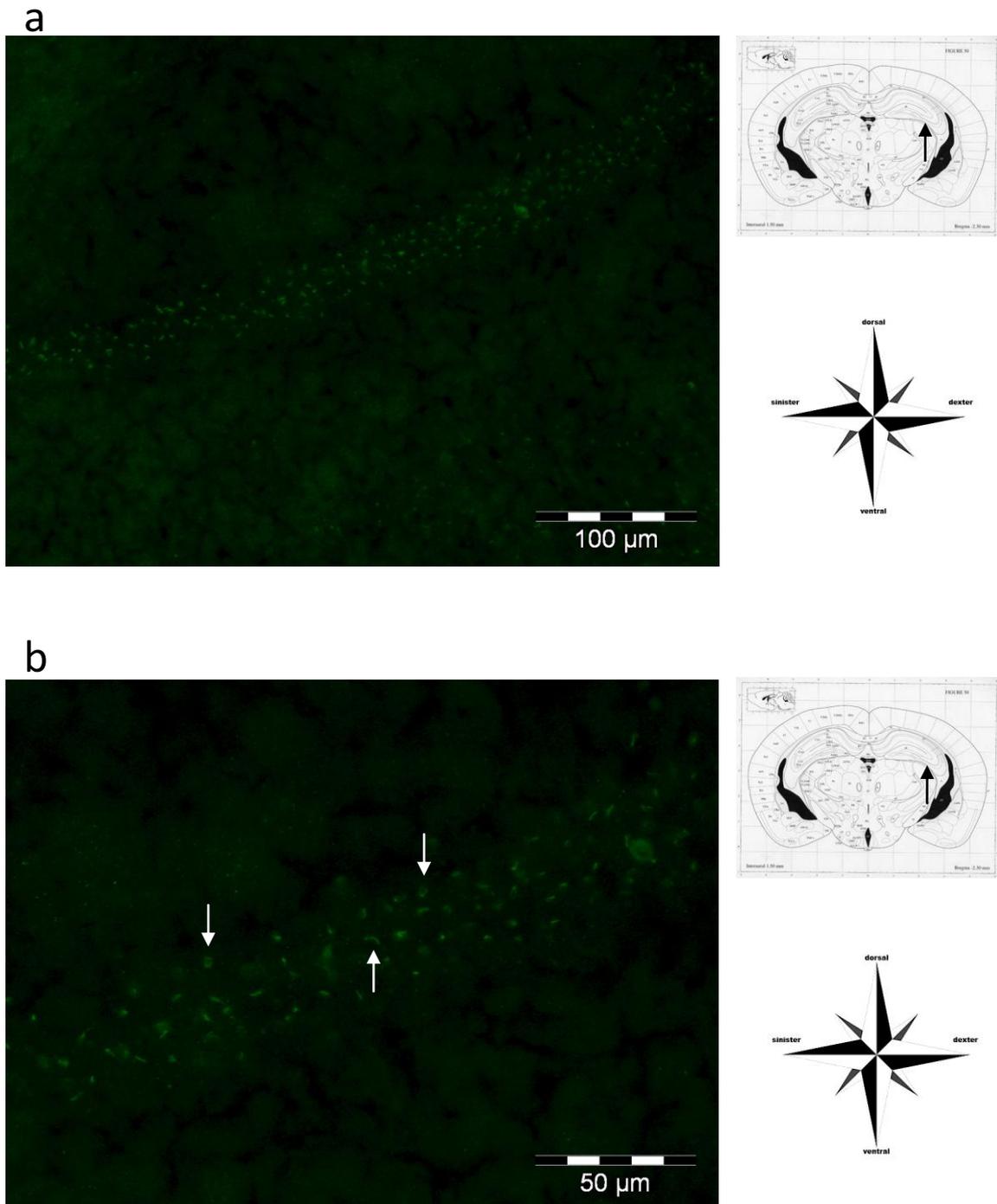
a) Das erste Bild zeigt die Auskleidung des dritten Ventrikels nach einer Gegenfärbung mit DAPI. Durch diese Färbemethode wird die DNA der Zellen markiert. Somit dient diese Abbildung als Übersicht über die Somastruktur in der hier betrachteten Region. Die Belichtungszeit betrug 1 Sekunde, die Objektivvergrößerung 20fach.

b) In der nächsten Abbildung ist die immunhistochemische Markierung mit dem anti-Ependymin Antikörper *Perseus* dargestellt. Wie zu erwarten, sind die Zellen der Ventrikelauskleidung stark vom Antikörper gebunden. Es scheint sich hier um Zellen der gleichen Abstammung wie die der Meninx zu handeln. Die Abbildungen a) und b) sind vom selben Schnitt mit verschiedenen Filtern aufgenommen worden. Die Belichtungszeit betrug 1 Sekunde, die Objektivvergrößerung 20fach.

c) Dieses Bild zeigt die Immunfluoreszenz des Anti-GFAP Antikörpers der gleichen Region wie in den vorherigen Abbildungen. Die gleichen Zellen geben erneut detektierbare Signale ab. Es ist zu beachten, dass es sich nicht um denselben Schnitt wie in Abbildung a) und b) handelt. Die Belichtungszeit betrug 300 Millisekunden, die Objektivvergrößerung 20fach.

d) In dieser Graphik ist ein Beispiel für die Markierung dieser Zellen mit dem Antiserum *Perseus* bei einer anderen Maus gezeigt. Hier ist besonders deutlich die Markierung der gesamten Auskleidung des Ventrikels zu erkennen. Die Belichtungszeit betrug 1 Sekunde, die Objektivvergrößerung 20fach.

Wie in den Abbildungen zuvor zu sehen ist, scheint das MERP wirklich in der unmittelbaren Nähe seines Syntheseortes zu finden zu sein. Das ist nicht weiter verwunderlich, jedoch stützt es zusätzlich die Vermutung, dass diese Regionen der Ort der Herstellung des Proteins ist. Ebenso interessant ist aber die Frage, ob das MERP auch in anderen Regionen des Mausgehirns zu finden ist. Von besonderem Interesse ist es, zu überprüfen, ob das MERP sich an Geweben mit hoher Plastizität wiederfindet. Daher wird in folgenden Abbildungen die Region des Hippocampus dargestellt. Dazu wird zuerst das *cornu ammonis* näher betrachtet (Abb. 5.19).

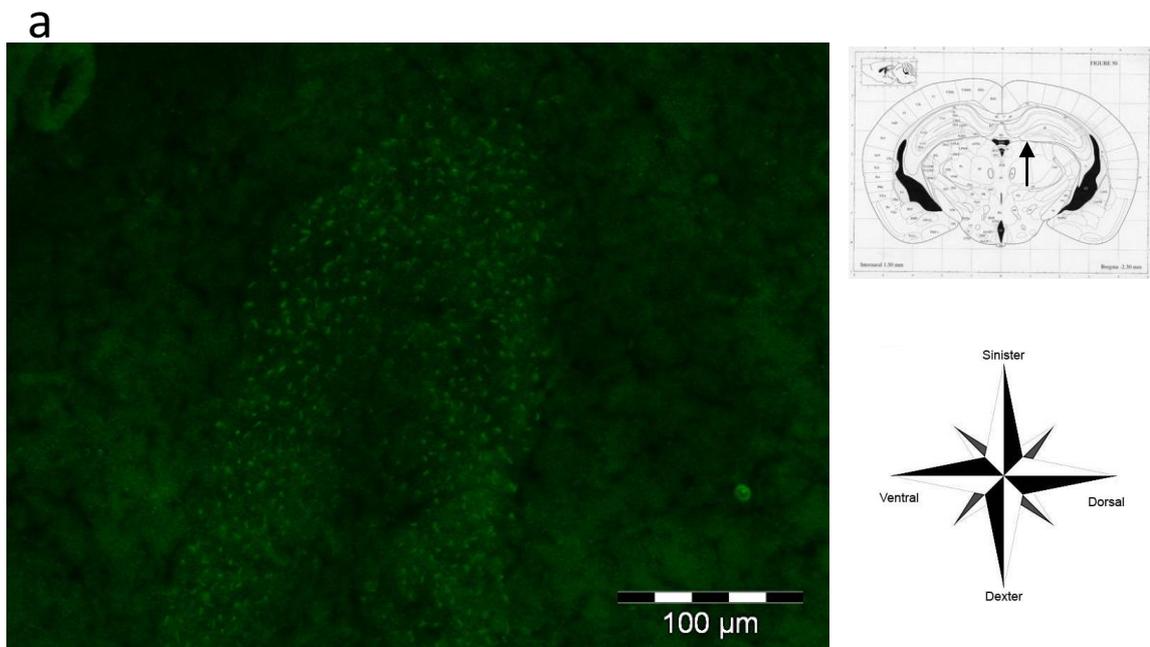


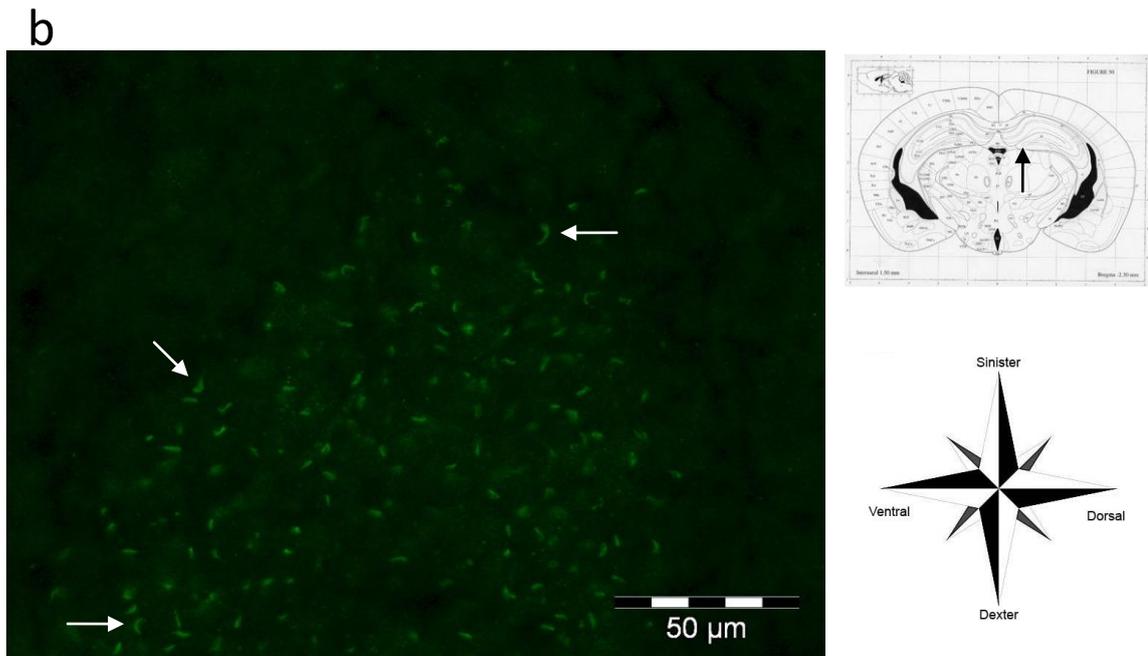
**Abb. 5.19: Markierungen innerhalb des *cornu ammonis*.** In diesen Abbildungen sind Anti-Ependymin Antikörper markierte Zellen im Ammonshorn der Maus abgebildet. Es wurde der Antikörper *Perseus* verwendet.

a) Es ist ein größerer Teil der *cornu ammonis* 3 (CA3) Region der rechten Hemisphäre zu erkennen. Die Markierung der Zellen durch den Anti-Ependymin Antikörper ist, wie zuvor an den meningealen Zellen, auch hier zu sehen. Die Markierung erscheint, bei den meisten betrachteten Gewebeschnitten, hier schwächer zu sein, als in den Hirnhautregionen. Nichtsdestotrotz ist eine Bindung der Antikörper deutlich auszumachen. Die Belichtungszeit betrug 50 Millisekunden, die Objektivvergrößerung 20fach.

b) In der zweiten Abbildung ist derselbe Gehirnschnitt in einer höheren Vergrößerung dargestellt. Hier ist nun wieder die typische Verteilung an den Zellen selbst zu erkennen. Scheinbar umgeben die Markierungen die Zellen eher, als dass sie innerhalb dieser binden würden. Da nur eine bestimmte Ebene angeschnitten wurde, erscheint diese Markierung oft eher linear. Doch bei einigen ist die zirkuläre Struktur auch in dieser Ebene getroffen (weiße Pfeile). Die Belichtungszeit betrug 75 Millisekunden, die Objektivvergrößerung 40fach.

Neben der CA3 Region ist auch ein weiter Bestandteil des Hippocampus sehr deutlich markiert worden. Als „Eingang“ zum Hippocampus projizieren die Körnerzellen des *Gyrus dentatus* auf die Pyramidenzellen der *cornu ammonis* Strukturen. Eben diese Zellen des *Gyrus dentatus* scheinen ebenfalls positiv auf die Anti-Ependymin Antikörper zu reagieren (Abb. 5.20).



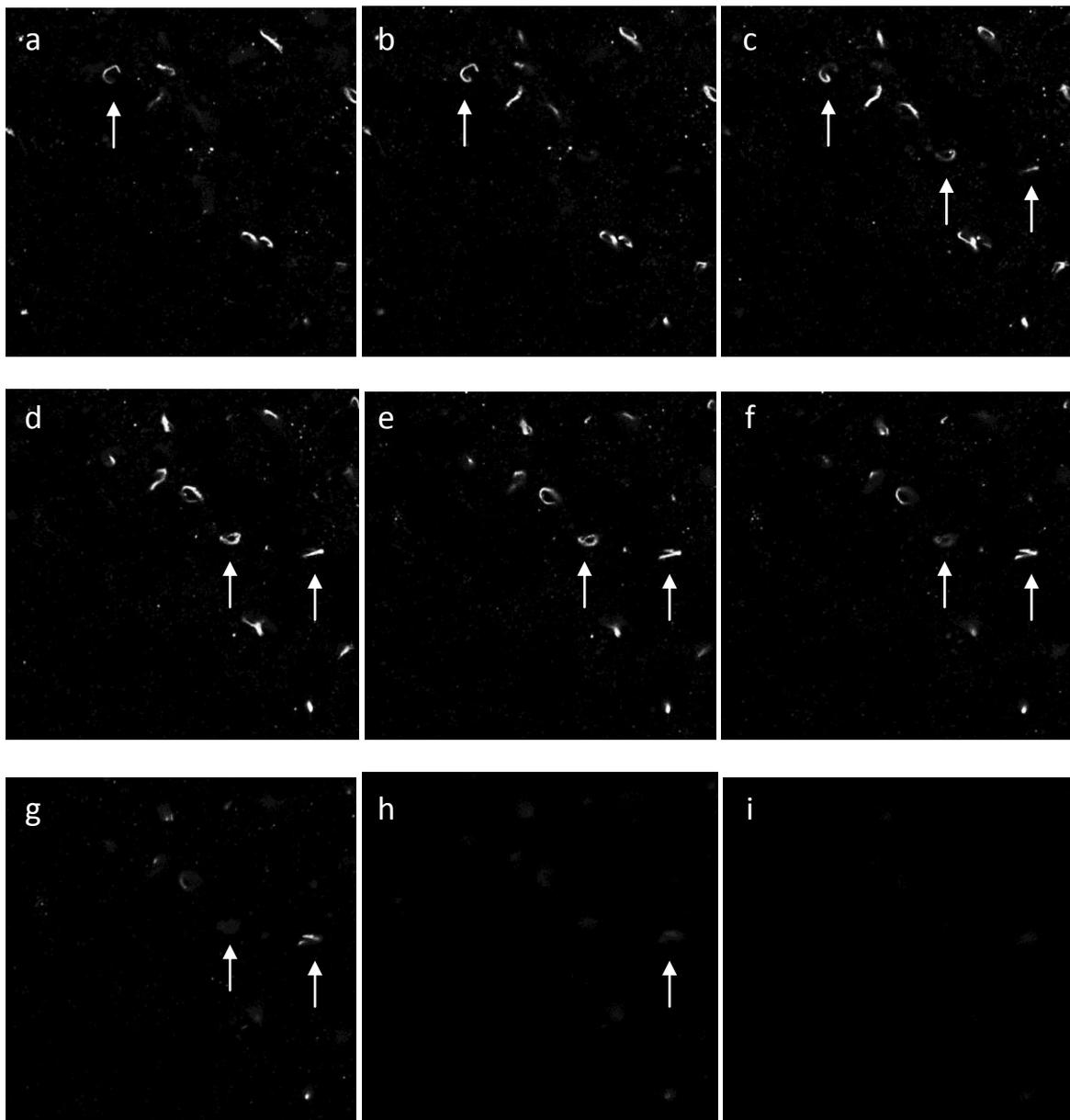


**Abb. 5.20: Immunhistochemische Markierung der Zellen des *Gyrus dentatus* durch Anti-Ependymin Antikörper.** Die oben abgebildeten Aufnahmen zeigen den rechten *Gyrus dentatus* einer Maus, nachdem der Gehirnschnitt mit dem Anti-Ependymin Antikörper *Perseus* inkubiert wurde. Beide Abbildungen entsprechen demselben Gewebeschnitt, wurden jedoch bei unterschiedlicher Vergrößerung aufgenommen. Erneut sind gebundene Antikörper an Zellen dieser Region zu erkennen.

a) Das erste Bild zeigt eine Übersicht über den *Gyrus dentatus*. Auch in dieser Vergrößerung ist schon eine distinkte Markierung innerhalb des *Gyrus dentatus* zu sehen. Sie erscheint, wie schon in der CA3 Region, schwächer als in der Meninx. Jedoch ist sie auch hier deutlicher in ihrer zellulären Verteilung zu erkennen. Die Belichtungszeit betrug 100 Millisekunden, die Objektivvergrößerung 20fach.

b) In dieser Abbildung ist derselbe Schnitt wie unter a) dargestellt, jedoch bei einer höheren Vergrößerung. Wie schon für die CA3 Region in der Abb. 5.19 gezeigt, so ist auch hier die zelluläre Verteilung des Antikörpers deutlich zu erkennen. Auch hier scheint das gebundene MERP die Zellen eher zu umgeben, als in deren Zytoplasma aufzufinden zu sein (weiße Pfeile). Die Belichtungszeit betrug 100 Millisekunden, die Objektivvergrößerung 40fach.

Es wurden also auch Markierungen durch den Anti-Ependymin Antikörper innerhalb des Hippocampus gefunden. Diese erscheinen zwar im Allgemeinen schwächer zu sein, dafür aber deutlicher in ihrer zellulären Verteilung zu detektieren. Auf Grund des Erscheinungsbild der Fluoreszenzsignale scheinen sich die Moleküle eher um die Zellen zu wickeln, als dass sie innerhalb dieser liegen. Deutlicheren Aufschluss darüber ergaben Aufnahmen mit einem Konfokalmikroskop (Abb. 5.21).



**Abb. 5.21: Aufnahme-Sequenzen des *Gyrus dentatus* nach einer Anti-Ependymin Antikörper Markierung.** In den Abbildungen ist eine fortlaufende Sequenz von Aufnahmen durch den *Gyrus dentatus* der Maus gezeigt. Der Gewebeschnitt wurde mit dem Anti-Ependymin Antikörper *Perseus* inkubiert. Die Objektivvergrößerung ist jeweils 40fach. Die Aufnahmen wurden während einer Gerätedemonstration erstellt. a) bis f) Durch das Scannen der aufeinanderfolgenden Schnittebenen ist die Markierung des Anti-Ependymin Antikörpers auf zellulärer Ebene zu erkennen. Wie sich schon in den vorherigen Bildern angedeutet hat, so scheinen die Antikörper wirklich nicht innerhalb der Zellen, sondern sich vielmehr außerhalb um die Zellen herum zu winden. Dies ist in den Bildern anhand einiger Beispiele aufgezeigt (weiße Pfeile).

Wie in diesem Versuchsteil gezeigt wurde, konnten mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper das MERP innerhalb des Mausgehirns lokalisiert werden. Neben dem Auftreten in der Nähe der Zellen, welche das MERP exprimieren (Meninx), konnte es ebenso in Gebieten gefunden werden, welche für ihre hohe Plastizität bekannt sind, der *Gyrus dentatus* und die CA3 Region. Dort ist die Markierungsintensität scheinbar nicht so hoch wie an den meningealen Zellen, jedoch ließ sich hier die strukturelle Verteilung auf zellulärer Ebene zeigen. Allem Anschein nach windet sich das MERP um die Zellen dieser Region und bildeten zirkuläre Strukturen.

## **6. Diskussion**

### **6. 1 Lernverhalten der Mäuse im Morris Water Maze**

Der erste Teil der Diskussion beschäftigt sich mit der angewandten Trainingsmethode, welche ein Lernparadigma im untersuchten Organismus hervorruft. Des Weiteren werden die Resultate des Trainings näher beleuchtet und die Einteilung der Mäuse in verschiedene Gruppen diskutiert.

#### **6. 1. 1 Testmodell**

Um die MERPs im zentralen Nervensystem der Maus zu untersuchen, wurde als Modellorganismus der Inzucht Mausstamm C57BL/6J der Firma Charles River verwendet. Die Entscheidung für diesen Mausstamm hatte drei einfache, aber dennoch wichtige Gründe. Zum Einen ist der C57BL/6J-Mausstamm eine in der Forschung sehr weit verbreitete Züchtung, welche sich in vielen und unterschiedlichsten Verhaltens- und neurobiochemischen Untersuchungen bewährt hat (Man et al., 1996; Ribeiro et al., 2013). Des Weiteren ist dieser Mausstamm sehr robust und einfach in der Haltung. Zuletzt ist es entscheidend, dass genaue genetische Informationen vorliegen und für die hier verwendeten Methoden keine relevanten Mutationen vorhanden sind.

Die Entscheidung für „weiblich“ als Geschlecht beruht auf Erkenntnissen, dass diese in Lernsituationen unter Laborbedingungen bessere Ergebnisse erzielen als männliche Mäuse. Diese Erkenntnisse sind nicht unumstritten. Jedoch zeigten Bettis und Jacobs (2009), dass weibliche Mäuse gerade für „place learning tasks“ besser geeignet sind als männliche. Des Weiteren ist auch die Haltung von Weibchen besser, da sich stabile Käfiggruppen ausbilden können, im Gegensatz zu Männchen, welche im Labormaßstab gehalten werden. Hier bilden sich despotischen Hierarchien aus, welche den Stressfaktor für die einzelnen Individuen erhöhen und somit das eigentliche Lernverhalten beeinflussen können (Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2007). Ebenso ist es nicht bekannt, ob der Einfluss von erhöhtem Stress auch auf zellulärer Ebene auf die Synthese der hier untersuchten Proteine Einfluss nehmen kann. Jedoch ist eine Wirkung durch einen erhöhten Cortisol-Wert nicht unwahrscheinlich. Daher sollten zusätzliche Stressfaktoren, neben dem eigentlichen Lerntest, möglichst vermieden werden. Gerade in der Akklimatisierungsphase vor der Testreihe und den Ruhephasen während des Trainings sollte der Haltungskäfig als Rückzugsort und zur Erholung für die Maus dienen. Somit wäre hier ein erhöhter Stresslevel ein zusätzlicher Parameter in der Interpretation der erzielten Ergebnisse, dessen Einfluss nicht realistisch abgeschätzt werden könnte.

Als Alter für die Mäuse wurden drei bis vier Wochen bevorzugt. Wie Hubel und Wiesel bereits 1970 durch ihre berühmten Forschungen am Cortex von jungen Katzen zeigen konnten, ist die Plastizität des zentralen Nervensystems in seiner Entwicklung hin zum adulten Gehirn am höchsten (Hubel and Wiesel, 1970). Bis zur dritten postnatalen Woche werden Mäuse gestillt, ab der vierten bis zur sechsten Woche beginnt die Geschlechtsreife. Das von Hubel und Wiesel als „kritische Phase“ bezeichnete Entwicklungsstadium entspricht somit dem hier verwendeten Alter von drei bis vier Wochen.

Die Mäuse wurden nach den gängigen Bestimmungen des Tierschutzes gehalten. Zusätzlich wurde jedoch auf ein erweitertes Nahrungsangebot und auf eine abwechslungsreiche Ausstattung der Haltungskäfige geachtet. Besonders das als „enriched environment“ bezeichnete Angebot für die Mäuse sich zu betätigen und ihrem natürlichen Bewegungsdrang mehr gerecht zu werden, steigert deren kognitive Fähigkeiten. Bereits 1947 hat Donald Hebb Vermutungen in diese Richtung anstellen können (Hebb, 1947), ab 1960 wurden Forschungen auf diesem Gebiet dann besonders durch Mark Rosenzweig voran getrieben (Krech et al., 1960).

### **6. 1. 2 Trainingsmethode Morris Water Maze und Anmerkungen zur Präparation**

Als Voraussetzung zum Überprüfen der Beteiligung und des Einflusses der MERPs auf die Gedächtnisbildung, musste den Untersuchungen ein Lernereignis vorangestellt werden. Hierzu wurde eine Methode benötigt, welche möglichst praktikabel in der Durchführung, innerhalb der Wissenschaft etabliert und anerkannt ist und regelmäßig zuverlässige Ergebnisse erbringt. Da die Vermutung bestand, dass die MERPs eine Bedeutung für die Langzeit Potenzierung (*long term potentiation*; LTP) haben, sollte der verwendete Test eben diese stimulieren. Daher bot sich das Morris Water Maze (MWM) besonders an. Durch den geringen Geräte- und Materialaufwand und den einfachen Versuchsablauf ist eine Durchführung des MWM relativ leicht zu bewerkstelligen. Seit Richard Morris (1984) diese Methode zur Anregung des räumlichen Lernens beschrieb, wurde sie unzählige Male in der Wissenschaft angewandt, erweitert und variiert. Ebenso ist anerkannt, dass die räumliche Orientierung an Umgebungsmerkmalen über die Aktivierung des Hippocampus erfolgt. Somit erscheint das MWM als hervorragend geeignet, die Grundvoraussetzungen zu schaffen, um die hier angestrebten Untersuchungen an den MERPs durchführen zu können.

Die Vermutung, dass die MERPs eine Rolle bei der Langzeitgedächtnisbildung spielen, ergibt sich vor allem aus ihrer engen Verwandtschaft zum Ependymin. Dieses spielt eine entscheidende Rolle bei der Gedächtniskonsolidierung im Goldfisch (Shashoua, 1976; Piront and Schmidt, 1988), jedoch ist der genaue Ablauf noch nicht entschlüsselt (vergl. Einleitung 3.3.3). Die Faltung des MERPs ist zwar noch nicht bekannt, jedoch deutet die Konservierung strukturell wichtige Aminosäuren auf eine ähnliche räumliche Anordnung im Vergleich mit dem Ependymin hin. Somit wäre auch eine Funktion, die dem des Ependymins nahe kommt, durchaus möglich. Aus diesem Grund wurde der Fokus hier auf den Zusammenhang mit der Gedächtnisbildung gelegt und das MWM als Trainingsmethode ausgewählt.

Im Anschluss an das Training wurden die Mäuse durch Luxation der Halswirbelsäule getötet und die Gehirne aus der Schädelkapsel herauspräpariert. Dies erfolgte zum Einen aus Gründen zum Schutz der Tiere (vergl. Mat./ Methoden 4.3.2). Zum Anderen wurde durch diese Tötungsmethode einem unbekanntem Effekt durch die Anwendung von Anästhetika vorgebeugt. Des Weiteren wurden die präparierten Gehirne, sofern sie nicht sofort weiter verwendet wurden, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Dies diente dem Erhalt der Struktur und vor allem dem Schutz vor RNAsen.

### 6. 1. 3 Schwimm- und Lernverhalten

Für die folgenden Versuche sollten die Mäuse in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Zum Einen wurden die Mäuse, welche das MWM erfolgreich absolviert hatten („Lerner“) von denen, die das Trainingsziel nicht erreicht hatten („nicht-Lerner“), getrennt. Die Gruppe der „Lerner“ wurde dann weiter unterteilt je nach dem Zeitpunkt des Tötens nach dem Lernereignis. Hierbei ergab sich nun das Problem, den genauen Zeitpunkt des Lernens festzustellen. Zwischen zwei Trainingseinheiten können bis zu 30 Minuten Pause liegen. Die Gruppe „30 Minuten“ und „60 Minuten“ liegen eben um diese Zeitspanne voneinander entfernt. Somit kann durch eine Fehleinschätzung des Lernzeitpunktes von nur einem Trainingsdurchgang eine Maus in eine andere Gruppe gelangen. Dieses Problem setzt ein hohes Maß an Zuverlässigkeit beim Bestimmen des Durchgangs voraus, nach welchem die Maus tatsächlich als „Lerner“ kategorisiert werden kann. Daher wurden Kriterien zur Bestimmung des Lernzeitpunktes festgelegt, die aus zwei verschiedenen Blickwinkeln den Vorgang des Lernens beurteilen und die beide erfüllt sein mussten.

Das erste Kriterium bezieht sich auf die Zeit, welche die Maus benötigt, die Plattform zu erreichen. Hier wurde noch einmal unterteilt: Das Zeitkriterium galt als erfüllt, wenn die Maus die Plattform in weniger als 10 Sekunden oder zweimal in Folge in weniger als 30 Sekunden gefunden hat. Trat der erste Fall ein, so muss auf Grund von der geringen Latenzzeit zwischen dem Einsetzen in die Wanne und dem Auffinden der Plattform definitiv von einem vorhandenen Lernprozess ausgegangen werden. Ein randomisiertes Suchen konnte in dieser kurzen Zeit nicht stattfinden. Der zweite Fall ist da jedoch komplizierter. Nicht jede Maus fand den Weg durch ein direktes Auftreffen auf die Plattform. Sie schwammen in die richtige Richtung und verfehlten die Plattform nur um wenige Zentimeter. Wenn diese Maus die Plattform, trotz eindeutigen Wissen um die ziemlich genaue Lage, also erst im dritten Versuch auch getroffen hat, um sie zu erklimmen, so sind meist schon etwa 20 Sekunden vergangen. Hierbei ist es nun schwierig zu beurteilen, ob schon ein räumliches Lernen stattgefunden hat oder noch nicht. Daher wurde bestimmt, dass das Kriterium „unter 30 Sekunden“ bis zum Auffinden zweimal erfüllt werden musste. Hat eine Maus beispielsweise in einem Durchgang die Plattform nach 13 Sekunden gefunden, im nächsten die Plattform nach 7 Sekunden jedoch knapp verfehlt und erst im zweiten Anlauf nach 15 Sekunden erreicht, so kann wohl doch auch hier von einem erfolgreichen Lernen ausgegangen werden.

Das zweite Kriterium beleuchtet das Verhalten während des Lernvorgangs als solches. In der Arbeit von Garthe et al. (2009) wurde das Schwimmverhalten der Maus den verschiedenen Stadien des Lernens zugeordnet. Anhand dessen lässt sich sehr gut beobachten, wie die Mäuse ihre Suchstrategien wechseln, um letztendlich eine räumliche Orientierung zu nutzen (Abb. 6.1).

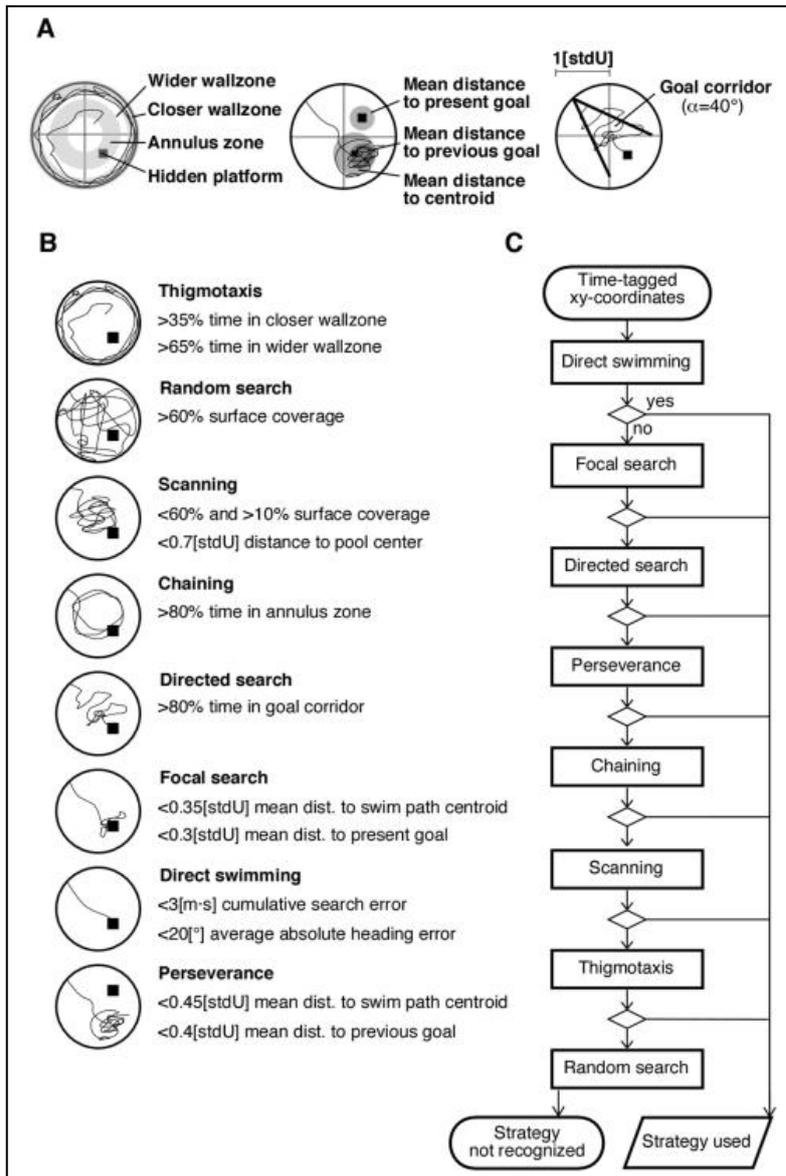


Abb. 5.1: Garthe A, 2009

**Abb. 6.1: Schwimmverhalten von Mäusen im Morris Water Maze.** In der Abbildung sind die verschiedenen Strategien während des Trainings im Wasserlabyrinth aufgeführt. Zu Beginn herrscht, vor allem durch den Test bedingten Stress, die Thigmotaxis vor. Hierbei bewegt sich die Maus am Rand des Beckens entlang und versucht Kontakt zu diesem zu halten. Im weiteren Verlauf des Tests wird die Maus versuchen, durch randomisiertes Suchen einen Ausweg aus dem Wasser zu finden. Daraufhin beginnt eine gezielte Suche, erst durch den Aufenthalt im Radius der Plattform (*chaining*), dann in dessen Korridor (vom Startpunkt ausgehend ein  $40^\circ$  Winkel in Richtung der Plattform; *directed search*). Nach dem dann im unmittelbaren Umfeld der Plattform gesucht wird (*focal search*), kommt es abschließend zum direkten ansteuern dieser (*direct swimming*).

Ab dem *focal search* handelt es sich um ein räumliches Orientieren. Ab diesem Stadium wäre also das Lernziel dieses Versuchs erfüllt. Daher wurde das Beobachten des Schwimmverhaltens und der angewandten Suchstrategie der Maus als weiteres Kriterium in die Beurteilung des Lernzeitpunktes mit aufgenommen.

Jedoch handelt es sich bei den Mäusen um eigenständige Individuen. Auch wenn dieser Ablauf meist zutrifft, so kann es jedoch auch zu leichten Unterschieden kommen. Zum Beispiel kann das *chaining* nicht erkannt werden oder nach dem *directed search* erfolgt sofort das *direct swimming*. Daher wurden beide Kriterien, sowohl die Zeit bis zum Erreichen der Plattform, als auch das Schwimmverhalten nur zusammen betrachtet und sollten so einen möglichst genauen Aufschluss darüber geben, ob und wann das räumliche Lernen als solches eingesetzt hat.

An dieser Stelle sei auch ein weiterer Punkt zum Schwimmverhalten angeführt. Zu Beginn der ersten Trainingseinheit kamen die Mäuse das erste Mal mit Wasser in der Menge in Kontakt, dass sie zum Schwimmen gezwungen wurden. Wie auch bei anderen Lebewesen ist die Qualität des Schwimmens bei den Mäusen individuell sehr verschieden. Nach einigen Versuchen konnte ich feststellen, dass diejenigen ein besseres Lernergebnis erzielten, welche auch von Beginn an gute Schwimmer waren. So war die größte Zahl derer, die das Training nicht erfolgreich abgeschlossen haben, von mir zu Beginn der Tests als unterdurchschnittliche oder schlechter Kategorisiert worden, was die Schwimmqualität angeht. Leider ist mir diese Beobachtung erst während der laufenden Versuchsreihe aufgefallen, wodurch eine korrekte wissenschaftliche Untersuchung dessen nicht mehr möglich war. Interessant ist dies dennoch, da das schlechte Abschneiden im MWM oft mit dem sogenannten *floating* einher ging.

#### **6. 1. 4 Einteilung der Gruppen „Lerner“ und „nicht-Lerner“**

Mäuse, welche die zuvor beschriebenen Kriterien nicht erfüllen konnten, wurden als „nicht-Lerner“ eingeordnet. Dabei wurde das Training individuell abgebrochen, wenn sich keinerlei Verbesserung des Trainingserfolges mehr zeigte oder maximal 20 Durchgänge erreicht wurden. In den Abbildungen 5.3 c und 5.4 sind die so gebildeten Gruppen miteinander verglichen worden. Zum Einen wurden die durchschnittlichen Suchzeiten und zum Anderen die durchschnittliche Anzahl an Durchgängen bis zum Erreichen des Lernziels, bzw. dem Abbruch des Trainings einander gegenübergestellt. In beiden Fällen ist ein eindeutiger Unterschied zwischen beiden Gruppen auszumachen. Beim Vergleich der durchgeführten Trainingseinheiten zeigt sich, dass die „Lerner“ bereits nach durchschnittlich 8,7 Durchgängen das Training beendet hatten. Bei den „nicht-Lernern“ wurde der Versuch durchschnittlich nach 12 Durchgängen beendet. Nun lässt sich sagen, dass der letzte Wert stark subjektiv beeinflusst ist. Man könnte den Wert auch künstlich erhöhen, indem man eine Maus, auch wenn sie kein Lernverhalten zeigt, auch noch über den 20. Durchgang hinaus trainieren und somit den Mittelwert der gesamten Gruppe erhöhen. Jedoch war es nicht der Gedanke des Versuchs eine möglichst beeindruckende Differenz zwischen den „Lernern“ und den „nicht-Lernern“ zu erzielen, sondern eine möglichst genaue Einteilung vornehmen zu können, wobei eine hohe Anzahl an „Lernern“ den Fortschritt des Versuchs durchaus begünstigt. Um jedoch einen objektiveren Blick auf die Unterschiede zu ermöglichen, wurden die durchschnittlichen Schwimmzeiten bis zum Erreichen der Plattform der beiden Gruppen miteinander verglichen. Die höchstmögliche Zeit wäre 120 Sekunden, da nach diesem Zeitraum die Maus auf die Plattform geleitet wurde. Der Mittelwert der „nicht-Lerner“ lag bei 112 +/- 3 Sekunden. An diesem Wert erkennt man bereits, dass die Mitglieder dieser Gruppe nur selten die Plattform überhaupt gefunden haben können. Im Gegensatz dazu ist der Wert der „Lerner“ von 73 +/- 3 Sekunden

wesentlich geringer und spricht für ein häufiges und auch schnelles Auffinden der Plattform. Dass es sich hierbei um signifikant unterschiedliche Stichproben handelt, wurde durch den ungepaarten t-Test untermauert (>99,9% Signifikanz). Somit lässt sich durchaus sagen, dass die vorgenommene Einteilung der Stichproben in „Lerner“ und „nicht-Lerner“ in ihrer Gesamtheit als korrekt angesehen werden kann.

Um zu zeigen, dass nicht nur in die Mittelwerte der beiden Gruppen voneinander abweichen, wurden auch die einzelnen Durchgänge des Trainings miteinander verglichen und in Form einer Zeitverlaufskurve dargestellt (Abb. 5.5). Hier ist wohl am deutlichsten zu erkennen, dass sich die Gruppe der „Lerner“ in ihrer Fähigkeit der räumlichen Orientierung im MWM stark von der Gruppe der „nicht-Lerner“ unterscheiden. Während erstere eine stetige Entwicklung zu kürzeren Suchzeiten beschreiben, ist dies bei Letzteren nicht zu erkennen. Mehr noch, die „nicht-Lerner“ zeigen anscheinend keinerlei Orientierung zu zeigen.

### **6. 1. 5 Wahl der Tötungszeitpunkte**

Nachdem eine Maus der Gruppe „Lerner“ zugeordnet wurde, musste sie einer weiteren Untergruppierung zugeteilt werden. Um mit den Versuchen der RT-PCR und der ISH einen Zeitverlauf der mRNA Expression aufstellen zu können, mussten Zeitpunkte festgelegt werden, die diesen Verlauf beschreiben. Dafür viel die Wahl auf die Zeitpunkte „30 Minuten“, „60 Minuten“, „120 Minuten“ und „180 Minuten“. Ausschlag gebend waren vor allem die Untersuchungen von Rother zur mRNA Expression des Ependymin im Goldfisch (Rother, 1992). In seinen Versuchen wurde gezeigt, dass die Synthese der mRNA des Ependymins nach 20 Minuten einen Höhepunkt und nach einem Abfall der Syntheserate nach zwei Stunden das Maximum erreichte. Im weiteren Verlauf senkte sich die Expression nach sechs Stunden erneut auf das Ausgangsniveau ab. Da das Ependymin eng mit den MERPs verwandt ist, scheint ein ähnliches Expressionsmuster nicht ausgeschlossen zu sein. Zumindest der Zeitraum, welcher hier überprüft wurde, konnte somit als Anhaltspunkt dienen. Nachdem das Maximum der Expression beim Goldfisch bei zwei Stunden liegt, wurde bei den Untersuchungen an der Maus drei Stunden als letzter Messzeitpunkt ausgewählt. Dass auch andere Gene in der Maus in diesem Zeitraum Expressionsmusteränderungen durchführen, spricht zusätzlich für den hier gewählten Ansatz (Fang et al., 2005).

## 6. 2 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion

Im nächsten Teil wird die Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion diskutiert. Sie wurde durchgeführt, um anhand des Expressionsverlaufs der MERP1 und MERP2 mRNA, in Abhängigkeit eines vorangegangenen Lernereignisses, Aussagen über die eventuelle Bedeutung für die Langzeitgedächtnisbildung zu treffen.

### 6. 2. 1 Kontrollen

Der gesamte Versuchsablauf der RT-PCR setzt sich aus vielen einzelnen Abschnitten zusammen (vergl. Mat. / Methoden 4.3.4) und erstreckt sich somit über mehrere Versuchstage. Daher ist die Anfälligkeit für eine fehlerbehaftete Durchführung des Versuchs recht hoch. Um dem möglichst effizient entgegen zu wirken, wurden unter Anderem verschiedenste Kontrollen durchgeführt. Hier soll nun auf zwei eingegangen werden.

Im ersten Schritt der RT-PCR kommt es zur Extraktion der gesamt RNA (gRNA) des Mausgehirns und zu deren Aufreinigung. Nachdem die Konzentration dieser bestimmt wurde, konnten Aliquots auf ein Gel aufgetragen werden. Dieser Schritt dient der Überprüfung, ob die RNA-Aufreinigung erfolgreich war. Wenn sie gelungen ist, so sollte man hauptsächlich nur zwei deutliche Bänder auf dem Gel erkennen können: die der 18 S-rRNA und die der 28 S-rRNA Untereinheit des 80S Ribosoms (vergl. Ergebnisse Abb. 5.6). Durch die Aufreinigung der gRNA wurden neben den rRNA Anteilen natürlich auch alle anderen RNA-Arten gewonnen, unter anderem die mRNA. Jedoch überwiegt der Anteil der rRNA, vor allem die der oben genannten Untereinheiten, so sehr, dass die anderen Arten kaum bis gar nicht auf dem Gel zu erkennen sind (Darling und Brickel, 1996; Haji-Younes, 2001; Tab. 6.1).

RNA-Klasse	Anteil in %
Nukleare Vorläufer-mRNA	6
Nukleare Vorläufer-rRNA	4
Nukleare Vorläufer-tRNA	1
Cytoplasmatische mRNA	3
Cytoplasmatische rRNA	71
Cytoplasmatische tRNA	15

**Tab. 6.1: Verteilung der verschiedenen RNA-Klassen in einer Säugetierzelle.** Die verschiedenen Spezies der RNA einer Säugetierzelle sind wiedergegeben. Den bei weitem größten Anteil machen die cytoplasmatischen rRNA Bestandteile aus (71%). Die die gesamten mRNA Bestandteile ergeben lediglich 9%, wobei nur 3% „fertige“ mRNA darstellen. Andere Arten von RNA (z.B. snRNAs und snoRNAs) wurden nicht berücksichtigt. Die Tabelle wurde nach Haji-Younes (2001) erstellt.

Wie sich aus der Tabelle 6.1 ergibt, machen die rRNA Bestandteile 75% der gesamten RNA der Zelle aus (gewisse Abweichungen zwischen verschiedenen Zelltypen wurden nicht berücksichtigt). Somit zeigt diese Kontrolle lediglich an, dass die Aufreinigung der gRNA erfolgreich war, wenn sich möglichst kein „Schmier“

entlang der aufgetragenen Bahnen ergibt. Auf die Anwesenheit von mRNA lässt diese Kontrolle jedoch nicht schließen. Auch sehr kleine und dazu schwache 18 S-, bzw. 28 S-Bänder wären ein Zeichen für unsauberes Arbeiten. Sie ließen auf die Kontamination mit RNAsen schließen, welche die RNA abbauen würden. Ebenfalls wären größere Mengen von DNA zu erkennen. Kleinste Mengen dieser wären aber wohl, ebenso wie die mRNA oder die tRNA, nicht deutlich zu sehen. Daher folgte in den nächsten Schritten auch eine Behandlung mit DNase I, um selbst noch kleinste vorhandene Mengen an DNA zu beseitigen. Diese würden das Ergebnis der PCR nämlich tatsächlich beeinflussen, da die Primer auch an diese binden könnten.

Als weitere Kontroll-Instanz wurde für die PCR, neben den beiden zu Untersuchenden mRNA-Abschnitten des MERP1 und MERP2, auch das  $\beta$ -Actin mit amplifiziert. Zum Einen sollte somit überprüft werden, ob die PCR korrekt durchgeführt wurde und überhaupt Amplikons liefert, zum Anderen ist das  $\beta$ -Actin eines der am häufigsten verwendeten *housekeeping genes* (hkg) für die verschiedenen Arten der PCRs. Das  $\beta$ -Actin kommt im Cytosol der Zellen vor und ist Bestandteil des Cytoskeletts. Zusammen mit den anderen Molekülen der Actin-Familie ist es Verantwortlich für die Zellstruktur und deren Stabilität, sowie für die Motilität, in Abhängigkeit vom Zelltyp. Somit ist es an grundlegenden Funktionen der Zelle beteiligt, welche recht störungsunempfindlich für äußere Veränderungen sein sollen. Genau diese Eigenschaft wird bei vielen molekularen Untersuchungen ausgenutzt. Möchte man Veränderungen von Genexpressionen untersuchen, so benötigt man ein Referenzgen, welches in seiner Expressionsrate konstant bleibt. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Veränderung am untersuchten Gen von artifizieller Natur ist, sollte das hkg ein unverändertes Signal in allen Untersuchungen einer Versuchsreihe zeigen. Sollten jedoch Veränderungen Auftreten, so könnten diese auf unterschiedliche Bedingungen während des Versuchs zurückschließen lassen (z.B. Temperatur-Unterschiede) oder unterschiedliche manuelle Handhabungen (z.B. Ungenauigkeiten beim pipettieren).

In den letzten Jahren ist jedoch vermehrt Kritik an den Überlegungen zu den hkg's aufgekommen. Es wurde in Untersuchungen gezeigt, dass sich die Expressionsrate der hkg's in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen zum Teil sehr wohl verändern. Zum Beispiel haben Caradec und Mitarbeiter gezeigt, dass der Einfluss von Hypoxie auf zehn häufig verwendete hkg's in Zellen, unter anderem auch das hier verwendete  $\beta$ -Actin, teilweise dramatische Auswirkungen hatte (Caradec et al., 2010). Besonders bemerkenswert hierbei ist, dass durch die Hypoxie natürlich ein zellulärer Stress ausgelöst wird. Im hier verwendeten Trainingsansatz, dem Morris Water Maze, werden die Mäuse auch einer Situation ausgesetzt, welche Stress verursacht. Ob die beiden Arten des Stresses vergleichbar sind und ob somit auch ein ähnlicher Einfluss wie bei Caradec et al. beschrieben zu vermuten wäre, ist schwer einzuschätzen. In Folge der Hypoxie entsteht vor allem ein oxidativer Stress. Der Mangel an Sauerstoff wirkt sich direkt auf die Atmungskette aus, jedoch treten in Folge der Mangelscheinung ebenfalls weitere Reaktionen in Kraft (z.B. Lipid- und Proteinoxidationen). Durch den Stress, welcher während des MWM auftritt, steigt in erster Linie die Konzentration des Cortisols an. Dieses „Stresshormon“ führt zu einer erhöhten Energiebereitstellung innerhalb des betroffenen Organismus und somit zu einer gesteigerten Leistungsfähigkeit. Ebenfalls hat es Einfluss auf einige zelluläre Signalwege. Jedoch scheint der Einfluss der beiden Arten des Stresses auf die Zelle an sich und deren Genexpression, grundsätzlich unterschiedlicher Natur zu sein, auch wenn Überschneidungen durchaus vorkommen können. Den Einfluss auf die

Expression des  $\beta$ -Actin durch den MWM-Test, schätzt der Verfasser aber in Folge dessen nicht als so gravierend ein, wie er bei Caradec et al. auf Grund von Hypoxie beschrieben wurde. Ein weiteres Argument für die Wahl des  $\beta$ -Actin als hkg liefern die Untersuchungen von Greer und Mitarbeiter (2010). Es konnte an Mausfibroblasten gezeigt werden, dass der Einfluss von unterschiedlicher Wachstumsdichte auf das  $\beta$ -Actin über weite Strecken kaum Einfluss hatte. Andere hkg wiederum zeigten auch hier eine veränderte Expression.

Eine vollkommene Sicherheit, dass das hier gewählte  $\beta$ -Actin eine konstante Genexpression zeigt, ist wohl nicht gegeben. Jedoch scheint es im gegebenen Kontext eine vernünftige Wahl als hkg zu sein und eine möglichst hohe Zuverlässigkeit zu gewährleisten.

## 6. 2. 2 Überlegungen zu den Korrekturberechnungen

Mit Hilfe der RT-PCR sollte eine zeitliche Verlaufskurve der Expressionsrate der MERP1 und MERP2 mRNA erstellt werden. Hierzu mussten folglich verschiedene Individuen untersucht und in miteinander verglichen werden. Somit ergaben sich viele Versuchsdurchführungen mit etlichen Parametern. Um jedoch einen Vergleich durchführen zu können, war es notwendig einige systematische Abweichungen objektiv auszugleichen. Im Folgenden werden hierzu die drei angewandten Methoden diskutiert.

### 2.1 Abzug des individuellen Hintergrunds

Mit Hilfe des Chemilmagers wurde nach Abschluss des Versuchs die Leuchtstärke der Banden, hervorgerufen durch Interkalieren des EtBr mit der cDNA, aufgenommen und mit dem Programm AIDA Image Analyzer (Raytest, Straubenhardt) ausgewertet. Durch Ungleichmäßigkeiten innerhalb des Gels kann es zu einem unterschiedlich stark ausgeprägten Hintergrundsignal kommen. Um dem entgegenzuwirken, wurde nicht ein universeller Hintergrund für alle Bänder des entsprechenden Gels gemessen, sondern jedem Band sein eigener, individueller Hintergrund zugewiesen und von diesem subtrahiert (vergl. Ergebnisse Abb. 5.8). Die Notwendigkeit des Abzugs des artifiziellen Hintergrunds scheint unbestritten. Jedoch genügt es nicht, einen allgemeinen Hintergrund zu generieren und diesen für das gesamte Gel und den darauf abgebildeten Bändern zu übernehmen. Da bei dieser Versuchsreihe schon kleine Unterschiede in der Leuchtstärke die zeitliche Verlaufskurve beeinflussen können, sollte möglichst kein Hintergrundsignal die einzelnen Bänder in ihrer Leuchtstärke verändern. Somit wurde das Erstellen eines bänderspezifischen Hintergrunds unerlässlich.

### 2.2 Normierung der Expositionsdauer

In diesem Versuchsteil wurde das Augenmerk auf zwei verschiedene mRNAs gelegt, MERP1 und MERP2. Wie sich schnell herausstellte, wurde die MERP1 mRNA deutlich schwächer exprimiert als die des MERP2 oder die der Kontrolle,  $\beta$ -Actin. Somit ergab sich das Dilemma, dass bei einer UV-Licht Exposition von kurzer Dauer das MERP2 und das  $\beta$ -Actin auf einem Gel deutlich, das MERP1 jedoch überhaupt nicht abgebildet wurde. Umgekehrt führte eine lange Belichtungszeit zu einem Signal der MERP1-Bänder, die der anderen wurden jedoch überexponiert oder zumindest im Bereich der Sättigung dargestellt (vergl. Ergebnisse Abb. 5.7). Daher wurden in diesem Fall die Signale bei unterschiedlicher Belichtungszeit aufgenommen. Um die

Veränderung an diesem Parameter auszugleichen, wurde eine Normierung auf eine einheitliche Expositionszeit vorgenommen. Eine wichtige Voraussetzung hierfür war es jedoch, dass die aufgenommenen Werte nicht bereits eine Sättigung des Darstellungsbereichs erreicht hatten.

### 2.3 $\beta$ -Actin als *Inter-Assay* Faktor

Wie bereits unter Punkt „Kontrollen“ beschrieben, wurde neben der mRNA des MERP1 und des MERP2 auch die des hkg  $\beta$ -Actin mit untersucht. Da hier davon ausgegangen wurde, dass die Expression des  $\beta$ -Actin konstant war, konnte der Wert dieser Bänder als Referenz verwendet werden. Sollte also ein Unterschied im Signal der  $\beta$ -Actin Bänder der gleichen Probe gemessen werden, so war dies ein Zeichen dafür, dass es zu Abweichungen während der Versuchsdurchführung gekommen war. Da es jedoch schwierig ist, nachzuvollziehen, welches Ergebnis am ehesten der Realität entspricht, wurden grundsätzlich diese Werte gemittelt.

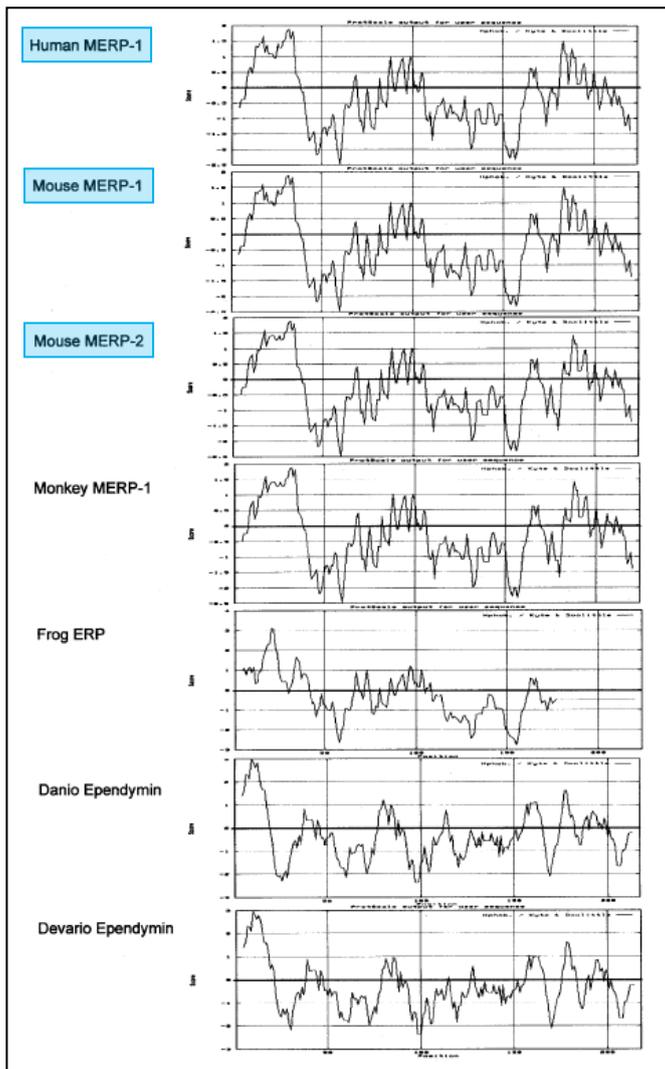
Theoretisch sollte es auch keinen Unterschied zwischen dem Band des  $\beta$ -Actins einer Probe und dem Band einer weiteren geben. Jedoch handelt es sich bei den Proben um die mRNA aus verschiedenen Individuen. Natürlich kann die Genexpression von einem Organismus zum anderen variieren. Somit ist grundsätzlich der Vergleich der Genexpression zwischen verschiedenen Organismen recht schwierig. Da es sich bei dem  $\beta$ -Actin jedoch um ein hkg handelt, kann angenommen werden, dass ein variieren der Expression eines hkg zwischen gesunden Organismen, auch die Expression der MERP mRNAs in einem vergleichbaren Maße beeinflusst. Demnach könnte das  $\beta$ -Actin als ein *Inter-Assay* Faktor verwendet werden, um den individuellen Unterschied zwischen den verschiedenen Organismen zumindest näherungsweise auszugleichen. Des Weiteren stellt jedoch die Durchführung der Versuche durch die Experimentatoren die hauptsächliche Ursache für Abweichungen zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen dar. Auch hier bietet die Anwendung des *Inter-Assay* Faktors eine Möglichkeit diese Fehlerquelle möglichst auszugleichen.

## 6. 2. 3 Die Genexpression der MERP1 und MERP2 mRNA im Zeitverlauf

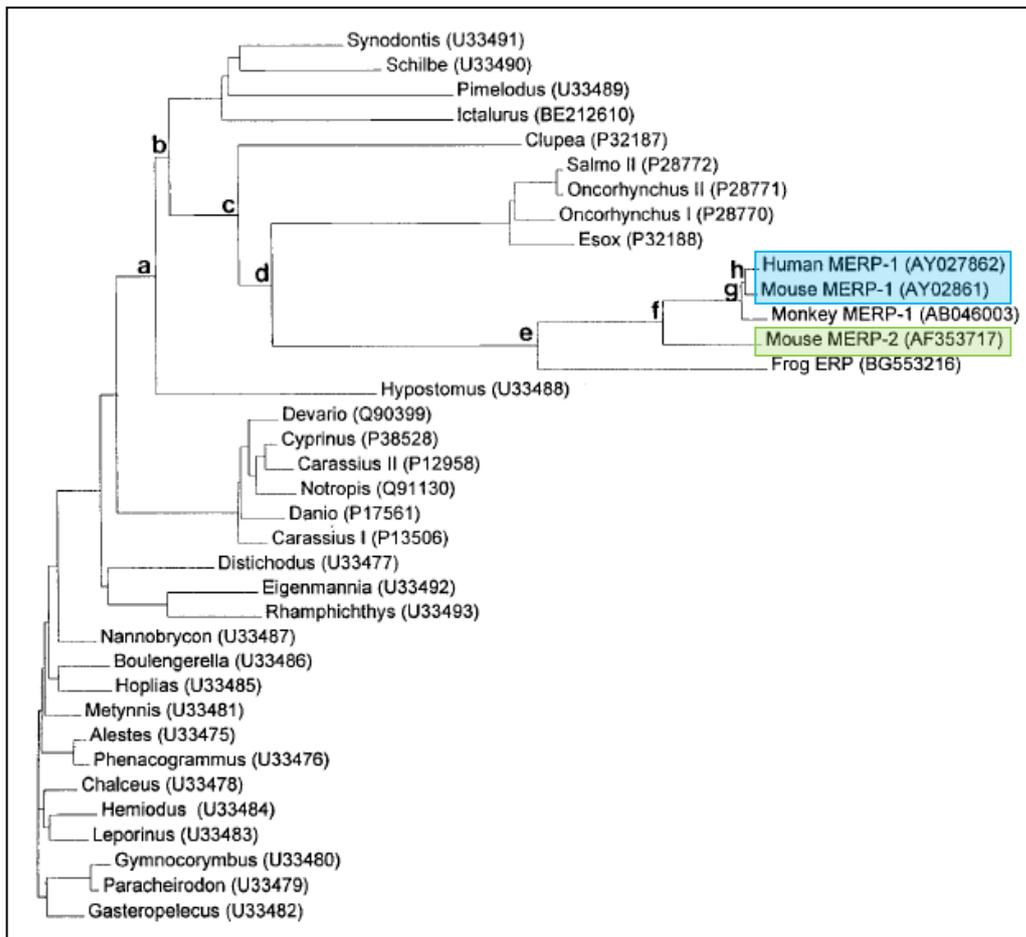
Nachdem alle Mäuse trainiert, die RT-PCR durchgeführt und die erhaltenen Werte für einen Vergleich modifiziert wurden, konnten nun die Ergebnisse der MERP1 und MERP2 mRNA Expression als eine Zeitverlaufskurve dargestellt werden. Hierzu wurden jeweils die QL-Werte gegen die Zeit aufgetragen. Durch die Umformung der Software, welche zur Auswertung der Ergebnisse verwendet wurde, ist die QL-Einheit vorgegeben gewesen. Sie sind zwar proportional zu den eigentlichen cDNA Konzentrationen, welche auf das Gel aufgetragen wurden, jedoch lässt sich leider kein Rückschluss auf die genauen Konzentrationen in einer Einheit des SI-Systems ziehen. Da es sich in diesem Versuch aber um eine semi-quantitative Analyse handelt, sind diese Angaben ohnehin nicht entscheidend. Die hier gewonnenen Werte werden nur untereinander verglichen; somit ist eine relative Größenordnung ausreichend. Entscheidend ist die Veränderung der Konzentration in Abhängigkeit zu einer Referenzgröße, welche in der gleichen Einheit angegeben ist. Hier beziehen sich die Werte auf einen Grundwert, welcher von der cDNA Konzentration untrainierter Mäuse repräsentiert wird. Von dieser Grundlinie ausgehend kann so beobachtet werden, wie sich die mRNA Expression zu den gemessenen Zeitpunkten verändert.

Sehr deutlich ist beim Vergleich der beiden Kurven des MERP1 und des MERP2 zu erkennen, dass sie ein unterschiedliches Expressionsniveau haben. Während sich die QL-Werte des MERP1 auf einen Bereich zwischen 18 und 130 QL verteilt, erstreckt sich der Bereich der MERP2 QL-Werte von 365 bis 604. Dazu passend sind die Grundlinien der mRNA Expression der untrainierten Mäuse (*Baseline*) bei 16 QL (MERP1), bzw. 368 QL (MERP2) zu finden. Auch der zeitliche Verlauf unterscheidet sich. Während das MERP1 eventuell einen etwas erhöhten Wert nach 30 Minuten aufweist, weichen im weiteren Verlauf die Werte kaum vom Grundniveau ab. Beim MERP2 Kurvenverlauf ist hingegen nach 30 Minuten ein deutlich höherer QL Wert im Vergleich zur *Baseline* zu erkennen. Erneute 30 Minuten später hat sich dieser weiter erhöht, fällt aber bis zur zwei Stunden Messung auf das Grundniveau ab. Ein erneuter Anstieg ist nach drei Stunden abschließend messbar.

Um eine Vermutung über die Bedeutung dieses Expressionsverlaufs der beiden mRNAs anstellen zu können, sollte man sich zunächst deren Verwandtschaftsverhältnisse ansehen. Beide cDNA-Sequenzen wurden von der Gruppe um Apostolopoulos zuerst näher beschrieben (Apostolopoulos et al., 2001). Beide Sequenzen sind auf dem Chromosom 13 der Maus identifiziert wurden. In der codierenden Region haben sie eine übereinstimmende Aminosäuren-Identität von lediglich 78%, im Vergleich zu 99% Übereinstimmung zwischen MERP1 der Maus und dem humanen MERP1. Jedoch generieren alle 3 Sequenzen ein 224 Aminosäuren langes Protein. Bei allen ist auch eine ähnliche Struktur zu vermuten. Neben vielen Aminosäuren, welche typischerweise in der Ependymin-verwandten Protein Familie konserviert sind, sind vor allem auch die vier strukturgebenden Cysteine an den Positionen 42,113,172 und 210 vorhanden. Auch das Hydrophathie-Profil ist erstaunlich gut in der gesamten Proteinfamilie konserviert, einschließlich der hier betrachteten murinen MERPs (vergl. Abb. 6.2). Besonders interessant ist jedoch, dass das murine MERP1 scheinbar näher verwandt mit dem humanen MERP1 ist, als mit dem murinen MERP2. Dazu passt es, dass die beiden MERP1 phylogenetisch später entstanden sind, als das murine MERP2. Dieses ist folglich auch näher mit dem ursprünglich entdeckten Ependymin der Teleostei verwandt (vergl. Abb. 6.3).



**Abb. 6.2: Hydropathie-Diagramm von ausgewählten Vertretern der Ependymin-verwandten Proteinklasse.** In der Abbildung ist der Verlauf des Hydropathieplots für ausgewählte Proteine dargestellt. Die Kurvenverläufe für humanes MERP1, murines MERP1 und murines MERP2 (von oben nach unten) sind hellblau markiert. Auffällig ist der sehr ähnliche Verlauf aller Kurven. Besonders die potentiellen Membran-Querungen der unterlegten Proteine sind scheinbar gut konserviert. Die Abbildung wurde Apostolopoulos und Mitarbeitern (2001) entnommen und leicht verändert.

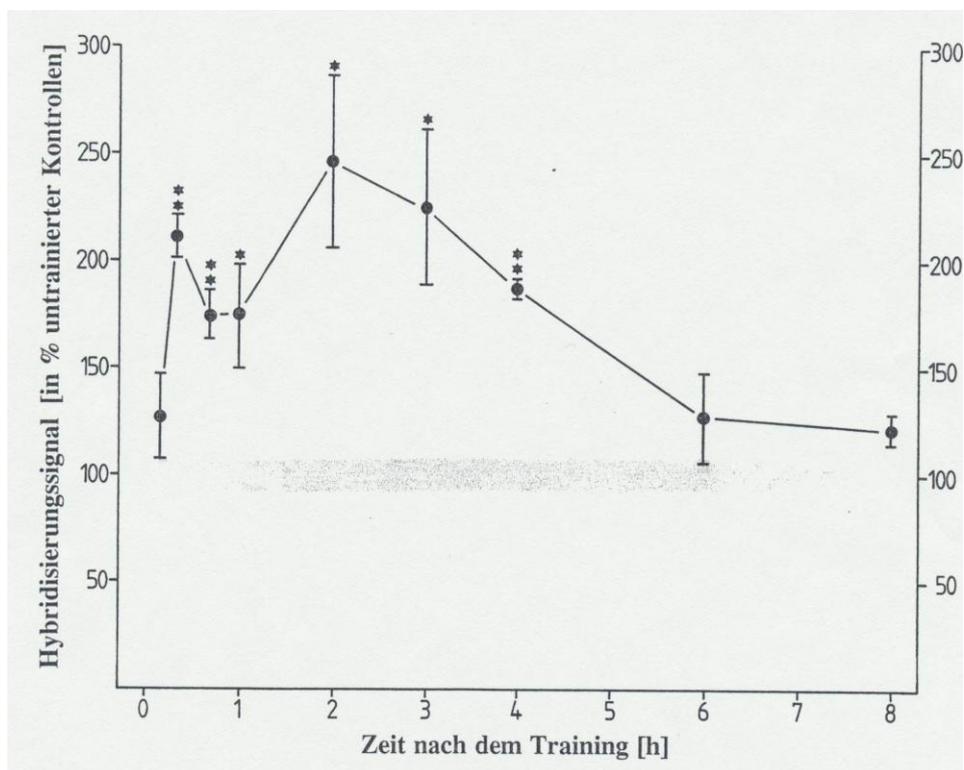


**Abb. 6.3: Phylogenetischer Baum der Ependymin-verwandten Proteine.** In der Abbildung ist der phylogenetische Baum der Ependymin Familie dargestellt. Wie zu erkennen ist, sind die Ependymine der Säuger erst spät in der Evolution entstanden. Ebenso sieht man, dass das humane MERP1 und das murine MERP1 enger verwandt sind, als das murine MERP2 mit einem der beiden. Auch sind die beiden MERP1 evolutionär jünger einzuordnen. Hellblau unterlegt sind das humane MERP1 und das murine MERP1, hellgrün das murine MERP2. Die *Accession number* des murinen MERP1 ist fehlerhaft, sie lautet korrekterweise AY 027861. Die Abbildung wurde Apostolopoulos und Mitarbeitern (2001) entnommen und leicht verändert.

Mit Hilfe dieser Informationen lassen sich die unterschiedlichen Expressionsverläufe des MERP1 und des MERP2 eventuell erklären. Das MERP1 könnte durch Genduplikation im Laufe der Evolution entstanden sein. Dafür spricht, dass sie dicht nebeneinander auf dem gleichen Chromosom liegen und auch eine sehr ähnliche Sequenz aufweisen. Bekannt ist hierzu jedoch nichts. Es wäre jedoch auch eine Erklärung, weshalb das MERP1 evolutionär später entstanden ist, als das MERP2, obwohl sie im gleichen Organismus vorhanden sind. Geht man also davon aus, dass das MERP1 als Duplikat des MERP2 entstanden ist, so könnte sich auch dessen schwacher, scheinbar unveränderter Expressionsverlauf seiner mRNA erklären. Neben der codierenden Sequenz spielen für die Aktivierung eines Gens weitere Faktoren eine wichtige Rolle: neben der Promotorsequenz vor allem Transkriptionsfaktoren. Durch die Duplikation des MERP2 ist nicht zwangsläufig gewährleistet, dass alle Bindungsstellen für diese Faktoren mit verdoppelt worden sind, geschweige denn, dass sie nach diesem Vorgang auch nur intakt vorliegen.

Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass bei dieser evolutionär so jungen Genverdoppelung die Expressionsrate wesentlich geringer ausfällt, als beim ursprünglichen Gen, dem MERP2. Somit würden sich die geringen, bis kaum messbaren mRNA Expressionsprodukte des MERP1 erklären. Es mag eventuell eine Variation in dessen Expression vorhanden sein, wenn dies jedoch der Fall ist, so ist sie mit der hier verwendeten Methode nicht detektierbar.

Somit bleibt zu klären, wie der Verlauf der MERP2 mRNA Expressionsrate zustande kommt. Wie bereits zuvor erwähnt, so ist das MERP2 enger mit dem als erstes entdeckten Ependymin des Goldfisches verwandt, als das MERP1. Bereits 1992 hat Rother zu diesem Protein mRNA Expressions-Untersuchungen durchgeführt (Rother, 1992). Hier wurde die mRNA Synthese nach einem Konditionierungstraining über einen Zeitraum von null Minuten bis acht Stunden untersucht (Abb. 6.4).



**Abb. 6.4: Zeitverlauf der mRNA-Expression des Ependymins bei konditionierten Fischen.** In der Abbildung ist der Expressionsverlauf des Ependymins beim Goldfisch nach einer Konditionierung dargestellt. Man erkennt, dass bereits nach wenigen Minuten die Expressionsrate deutlich ansteigt. Danach beschreibt sie ein Tal bei etwa 60 Minuten, bevor das Maximum nach 120 Minuten erreicht wird. Bis zum letzten Messpunkt nach acht Stunden nähert sich der Kurvenverlauf dem Ausgangsniveau wieder an. Die Abbildung ist Rother (1992) entnommen.

Wie in der Abbildung 6.4 von Rother gezeigt wurde, steigt die Expressionsrate des Ependymin unmittelbar nach dem Konditionierungs-Training stark an. Bereits nach 20 Minuten hat sich die mRNA-Anzahl mehr als verdoppelt. Dieser schnelle Anstieg wurde von ihm mit der Begründung des Stresses während der Trainingseinheiten erklärt. Dazu wurden Fische genarrt, indem Warnsignale randomisiert Stromschlägen vorausgingen. Somit konnten die Fische das Signal nicht mit dem Reiz verbinden

und kein Meideverhalten erlernen. In Folge dessen wurde lediglich ein Anstieg der mRNA Expression in den ersten Minuten nach dem Training gemessen, nach 60 Minuten wurde jedoch der Ausgangswert erneut erreicht. Somit wurde zum einen gezeigt, dass die Ependymin mRNA Synthese nicht durch das Training als solches langfristig erhöht wurde. Ebenso, dass der erste Anstieg der Syntheserate wohl auf den Stress durch das Lernparadigma zurückzuführen ist.

Auch bei den hier durchgeführten Untersuchungen ist ein erster Anstieg der Syntheserate für die MERP2-mRNA zu erkennen. Nach 30 Minuten ist der Ausgangswert um 59 %, nach 60 Minuten um 64 % übertroffen. Nach 120 Minuten sinkt die Syntheserate jedoch wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Es wäre also durchaus möglich, dass auch hier für die initiale Erhöhung der mRNA Syntheserate der Faktor Stress die entscheidende Rolle spielt.

Da die Syntheserate sich nicht im gleichen Maße wie beim Goldfisch erhöht, mag vielleicht mit der allgemeinen Abundanz zusammenhängen. Während das Ependymin beim Goldfisch das am häufigsten vorkommende Protein in der extrazellulären Flüssigkeit des Gehirns ist und dort 14% des Gesamtproteingehalts ausmacht (Schmidt, 1987), ist es im Mausgehirn kaum nachweisbar, weshalb zum Beispiel eine Protein-Aufreinigung in unseren Versuchen bisher scheiterte. Auf Grund seiner Struktur und seiner Verwandtschaft zum Ependymin wird davon ausgegangen, dass das MERP2 auch der Familie der Zelladhäsionsmoleküle angehört (vergl. Einleitung 3.4). Zu dieser Klasse gehören weitere Vertreter, wie die Cadherine (u.a. Hatta et al., 1987; Takeishi, 1990; Gumbiner, 2005) und die Neuronale Zelladhäsionsmoleküle, NCAMs (u.a. Reyes et al., 1991; Pathology outlines, 2011). Sie und viele andere sind daran beteiligt, dass die extrazelluläre Matrix sich bildet, umbildet und Bestand haben kann (vergl. Einleitung 3.2). Da das MERP in diesem Orchester von Molekülen eine nicht so vorherrschende Rolle spielen mag, wie das Ependymin beim Goldfisch, kann es durchaus sein, dass neben dem MERP während des räumlichen Lernens im MWM auch andere Zelladhäsionsmoleküle in ihrer Synthese hochreguliert werden. Somit würde im Gesamt-Kontext eine niedrigere MERP2 Syntheserate als im Vergleich zum Ependymin beim Goldfisch, eventuell dadurch ausgeglichen werden, dass andere Moleküle ebenfalls hochreguliert würden, welche die Funktion des MERP2 teilen oder ergänzen.

Im Vergleich zur Expressionsrate der mRNA des Ependymin fällt auch ein zeitlicher Unterschied auf. Während das Ependymin, vermutlich auf Grund des Stresses, bereits nach 20 Minuten einen Syntheseraten-Höhepunkt erreicht, scheint dieser bei der Maus erst nach 120 Minuten erreicht zu sein. Auch der zweite Anstieg, als Folge des Lernereignisses, ist im zeitlichen Vergleich unterschiedlich. Beim Goldfisch ist das Maximum nach 120 Minuten erreicht. Bei der Maus scheint der Anstieg der Syntheserate nach 180 Minuten noch nicht beendet zu sein. Hier sind weitere Untersuchungen sicherlich von Nöten. Es konnte gezeigt werden, dass bei Ratten ein ähnlicher, zweigipfliger Verlauf zur Proteinbiosynthese vorhanden ist (Matthies, 1989). Der zweite Anstieg wurde ab vier Stunden nach einem Lern-basierten Training festgestellt. Jedoch wurde hier nicht die mRNA-Synthese, sondern die Protein-Abundanz als solche untersucht. Somit ist der hier im Versuch festgestellte, zeitlich etwas früher einsetzende Anstieg im Kurvenverlauf durchaus zu erklären, da der Vorgang der Translation bei Matthies mit zu berücksichtigen ist. Daher könnte der

zeitlich leicht unterschiedliche Verlauf der mRNA Expression des MERP2 im Vergleich zum Ependymin als artenspezifisch gelten.

Der gesamte Verlauf der Expressionskurve nach einem Lern-basiertem Training, zusammen mit der nahen Verwandtschaft der Proteine und eine wahrscheinlich sehr ähnliche Struktur, deuten stark auf eine ähnliche Funktion des MERP2 im Vergleich zum Ependymin hin. Somit würde auch dieses in seiner Funktion als Zelladhäsionsmolekül der extrazellulären Matrix zur Festigung der Synapsen nach einem Lernereignis dienen. Auf Grund seines geringen Vorkommens bei gleichzeitigem Vorhandensein vieler weiterer Adhäsionsmoleküle in der extrazellulären Flüssigkeit, wird es jedoch keine vorherrschende Rolle einnehmen, viel mehr als ein Teil des Ganzen fungieren.

Das MERP1 ist wohl erst vor kurzem im Genom der Hausmaus durch Duplikation aus dem MERP2 entstanden. Seine Funktion scheint noch nicht klar zu sein, jedoch lässt die mRNA Expressionsrate und dessen Abundanz im Gehirn auf keine bedeutende Rolle schließen. Vielmehr scheint es durch die Duplikation für Transkriptionsfaktoren nicht mehr vollständig erreichbar zu sein und somit seine Funktion im Vergleich zum MERP2 nicht durchsetzen können. Um diese Hypothese jedoch zu verifizieren, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

## 6. 3 *In-situ* Hybridisierung

Der dritte Teil der Diskussion beleuchtet die Untersuchungen mittels *in-situ* Hybridisierung näher. Hier wurde versucht, den Synthesort des MERP2 innerhalb des Gehirns der Maus zu lokalisieren. Anhand der vorausgegangenen Lernversuche konnte ebenfalls überprüft werden, ob sich dieser Synthesort mit der Latenzzeit zwischen Lernereignis und Todeszeitpunkt verändert. Durch die Quantifizierung des ISH-Signals konnte ebenfalls eine Zeitverlaufskurve der mRNA Expression erstellt und mit derjenigen aus dem RT-PCR Versuch verglichen werden.

### 6. 3. 1 Kontrollen

Neben der Integritätsprüfung der Sonden und der obligatorischen Nullkontrolle, lag das Hauptaugenmerk auf der Verwendung der randomisierten Sonden zur Kontrolle. Diese wurden zu jeder Hybridisierung mit verwendet und trugen den unspezifischen Bindungen Rechnung. Im Idealfall wird durch eine 100%ig komplementäre Sonden-Bindung an der Zielsequenz, gekoppelt mit einer sehr stringenten Posthybridisierung, jegliches Hybridisierungssignal vermieden, bei dem eine Sonde nicht vollständig und korrekt hybridisiert ist. Somit würde sich keinerlei Hintergrundsignal ergeben. Realistischerweise strebt man normalerweise jedoch eine Posthybridisierung an, nach welcher alle Sonden mit mehr als 80%iger Bindung erhalten bleiben. Somit ergibt sich zwangsläufig jedoch auch ein Hintergrundsignal. Dieses würde das Signal der „korrekten“ Bindungen aber artifiziell erhöhen. Daher wurde die randomisierte Sonde ebenfalls hybridisiert und ihr Signal vom Signal der *anti-sense* Sonde abgezogen.

Typischerweise ist das Signal, welches durch eine randomisierte Sonden-Hybridisierung entsteht, deutlich schwächer als das der komplementären Sonden. Ebenfalls ergibt sich kein spezifisches Verteilungsmuster innerhalb eines Gewebes, sondern eine einheitliche Verteilung über das gesamte Präparat ist zu erwarten. Lediglich an Zellkern-armen Regionen wird man eine niedrigere Signalstärke detektieren als an Zellkern-reichen. Die Wahrscheinlichkeit des Auffindens einer möglichst passenden Sequenzübereinstimmung ist bei einer vermehrten Anzahl an Nukleinsäuren größer. Eben dieses Bild ergab sich grundsätzlich durch das hier verwendete Protokoll: relativ schwache, homogen über das Präparat verteilte Signale (vergl. Ergebnisse, Abb. 5.10). Folglich konnte durch das Subtrahieren der Signalstärken, welche durch die Verwendung der randomisierten Sonden erhalten wurde, das Signal der *anti-sense* Sonden um den Wert der unspezifischen Bindungen bereinigt werden.

### 6. 3. 2 Überlegungen zu den rechnerischen Korrekturen

Wie bereits unter Punkt 2 der RT-PCR-Diskussion beschrieben, so erfolgten auch bei der ISH unterschiedliche rechnerische Umformungen. Diese waren nötig, um auf verschiedene Parameter zu reagieren, welche einen Vergleich der gewonnenen Daten sonst nicht erlaubt hätten. Dazu wurde der Hintergrund, ein Zerfalls-Quotient, sowie ein *Inter-Assay* Faktor berücksichtigt. Des Weiteren wurden die erhobenen Datensätze bei Bedarf einem Ausreißertest nach Nalimov unterzogen.

## 2.1 Abzug des individuellen Hintergrunds

Dieser Punkt wurde im vorherigen Diskussionsabschnitt bereits erläutert, die mathematische Umsetzung ist die gleiche wie bei der RT-PCR. Hier hängt die Notwendigkeit eines individuellen Hintergrundes mit der praktischen Durchführung der Versuche zusammen. Während der Hybridisierung werden die Gewebeschnitte mit einem Photokleber umrandet, so dass die Hybridisierungslösung nicht vom Präparat abfließen kann. Diese Umrandungen werden manuell aufgetragen und können somit nicht identisch sein. Daher ergibt es sich, dass im Anschluss an die Posthybridisierung auf den mit Gelatine-beschichteten Objektträgern ein unterschiedlich starkes Hintergrundsignal zurück bleibt.

## 2.2 Einführen eines Zerfalls-Quotienten

Als Detektionssystem wurde bei der ISH Radioaktivität verwendet. Einer der großen Vorteile dieser ist die hohe Sensitivität des Signals, wodurch auch kleinste Mengen eines Isotops noch nachgewiesen werden können. Jedoch muss man für eine statistische Auswertung gerade ihre charakteristischste Eigenschaft berücksichtigen, den Zerfall. Mit fortschreitender Zeit zerfällt immer mehr des Ausgangsnuklids und folglich nimmt auch dessen Aktivität ab. Die Geschwindigkeit dieses Zerfalls ist für jedes Nuklid spezifisch und wird durch die Zerfallskonstante  $\lambda$  zum Ausdruck gebracht. Diese Überlegungen spielen eine entscheidende Rolle. Zum Zeitpunkt der Markierung der Sonden wird eine bestimmte Menge Radioaktivität eingesetzt. Aber durch den permanenten Zerfall stimmt diese Größenangabe zum Zeitpunkt der Konzentrationsmessung nicht mehr mit dem Ausgangswert überein und erst recht nicht mehr nach dem Exponieren der hybridisierten Gewebeschnitte und dem Auslesen am Phosphorimager.

Es ist jedoch möglich diese Parameter zu eliminieren. Da das Nuklid bekannt ist, folglich auch dessen Halbwertszeit, ebenso das Datum der Markierung, sowie das Datum des Auslesens, kann mittels der Berechnungen unter Tab. 4.5 (vergl. Ergebnisse) der aktuelle Wert der Aktivität auf den Tag genau bestimmt werden. Das Verhältnis dieser zur Ausgangsaktivität kann nun als Faktor verwendet werden, um alle Werte von einer einheitlichen Ursprungsaktivität ausgehend zu berechnen.

## 2.3 Ein [ $^{14}\text{C}$ ]-Marker als *Inter-Assay* Faktor

Wie bereits bei der RT-PCR, so wurde auch zur Berechnung der ISH Daten ein *Inter-Assay* Faktor eingeführt. Dieser diente hauptsächlich dazu die unterschiedlichen Expositionszeiten der Gewebeschnitte auf den *Screens* auszugleichen. Dadurch, dass die Sonden zu unterschiedlichen Zeiten unterschiedlich aktiv waren (vergl. Punkt 2.2), mussten die hybridisierten Präparate zum Teil unterschiedlich lange exponiert werden, damit ein Signal gut detektierbar war. Hierdurch veränderte sich natürlich die beim scannen aufgezeichnete Leuchtstärke. Innerhalb einer ISH-Durchführung veränderten sich die leuchtstärken konstant zueinander. Jedoch wären so die verschiedenen Durchführungen nicht miteinander vergleichbar gewesen. Daher wurde während jeder Exposition ein Standard auf den *Screen* mit aufgebracht. Dieser besteht aus [ $^{14}\text{C}$ ]-Nukliden, welche auf Grund ihrer Halbwertszeit (5730 Jahre) mit einer konstanten Rate zerfallen. Das heißt, ein Marker, welcher im Vergleich mit einem anderen Marker für die doppelte Zeit exponiert wurde, für den würde eine doppelt so hohe Leuchtstärke detektiert werden. Vorausgesetzt wurde, dass sich die Werte in einem vorgegebenen linearen Bereich des *Screens* befanden und nicht im Sättigungsbereich lagen. Somit konnte durch die Festlegung eines Referenzwertes (hier: der Mittelwert der Leuchtstärke aller gemessener Marker) wie unter

„Ergebnisse, Tab. 5.7“ beschrieben, ein Faktor gebildet werden, der für jede ISH und deren Präparate spezifisch ist und es ermöglichte, sie untereinander zu vergleichen.

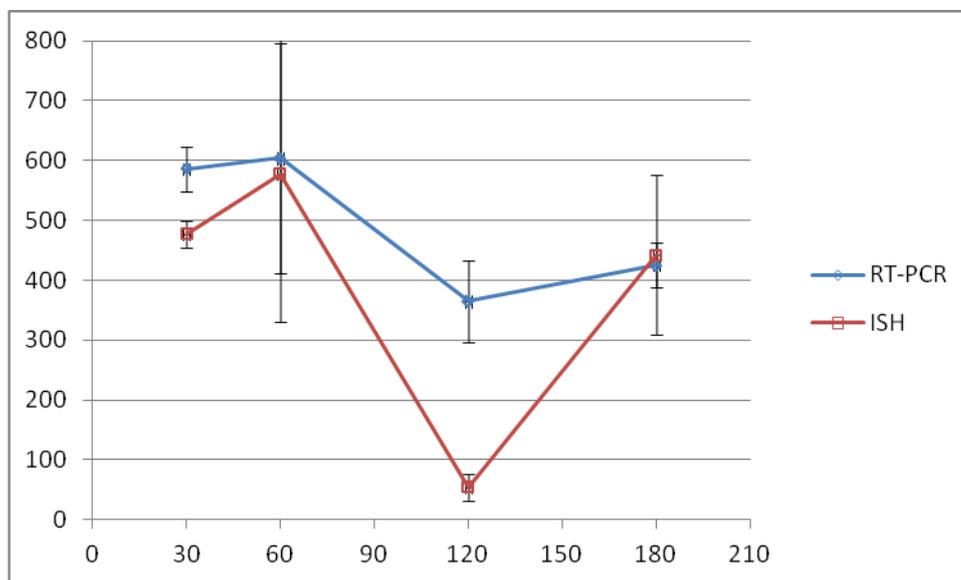
### 6. 3. 3 Die MERP2 mRNA Synthese im Zeitverlauf

Wie bereits zuvor erwähnt, lässt sich Radioaktivität äußerst sensitiv detektieren. In Verbindung mit den hier verwendeten Geräten und den hochauflösenden *Screens* konnte somit mittels der ISH die Signalstärke der verschiedenen Tötungszeitpunkte miteinander verglichen und ein Zeitverlauf der mRNA Expression erstellt werden. Ursprünglich war es angedacht gewesen, dass neben dem MERP2 auch die mRNA des MERP1 untersucht wird. Dazu wurden verschieden entworfene *anti-sense* Sonden getestet. Jedoch konnte keine dieser Sonden ein Signal liefern, welches deutlich vom Hintergrund unterschieden werden konnte. Auch Variationen im Protokoll führten nicht zum gewünschten Erfolg.

Dieser Misserfolg beim Versuch, die MERP1 mRNA zu lokalisieren und zu quantifizieren, ist nicht ganz unerwartet. Wie durch die Versuche der RT-PCR gezeigt, scheint die Abundanz der MERP1 mRNA äußerst gering zu sein. Auf den Gelen konnte die MERP1 cDNA Bande häufig nur durch eine verlängerte Belichtungszeit dargestellt werden. Dass dort überhaupt eine Quantifizierung möglich war, liegt an der Vervielfältigung der cDNA durch die PCR im Anschluss an die reverse Transkription. Dort wurden 28 Zyklen der Duplikation vorgenommen. In der Praxis geht man von einer Rate der Vervielfältigung von 1,7 bis 1,9 aus (Pfaffel, 2004). Somit würde man, grob abgeschätzt, bei der Analyse der RT-PCR Bänder des MERP1 das  $14 \cdot 10^6$ -fache der eigentlichen Konzentration betrachten. Des Weiteren kommt hinzu, dass man bei der ISH nicht das gesamte Gehirn der entsprechenden Maus betrachtet, sondern lediglich einen 12 µm dicken Schnitt davon. Somit verringert sich das mRNA Vorkommen erneut deutlich. Alles in allem ist es also durchaus nicht ungewöhnlich, dass die mRNA des MERP1 nicht dargestellt werden konnte. Es ist eher bemerkenswert, dass die MERP2 mRNA so deutlich abgebildet werden konnte und unterstreicht somit die hohe Sensitivität dieser Methode. Dass die MERP1 mRNA scheinbar unterhalb der Detektionsgrenze in diesem Versuch lag, stützt zudem die These, dass die Funktion des MERP1 auf Grund der Duplikation des Gens eventuell verloren gegangen ist oder aber, dass die Expression zumindest nicht in voller Stärke zum Tragen kommen kann.

In der Abbildung 5.14 (vergl. Ergebnisse) ist der zeitliche Verlauf der MERP2 mRNA Expression bei der ISH dargestellt. Der interessanteste Aspekt ist sicherlich der Vergleich mit dem Zeitverlauf, welcher durch die semi-quantitative Auswertung durch die RT-PCR für die MERP2 mRNA erhalten wurde (vergl. Ergebnisse, Abb. 5.9). Dieser ist in der Abbildung 6.5 dargestellt. Zunächst einmal sollte bemerkt werden, dass die Skalierungen der beiden Graphen nicht als Absolut-Werte miteinander verglichen werden können. Es handelt sich hierbei zwar um die gleiche Einheit (QL), da in beiden Versuchsreihen die Datensätze mit dem gleichen Programm erhoben wurden, jedoch ist diese nur für eine Beurteilung untereinander geeignet. Somit sind jedoch die Steigungen und folglich auch der eigentliche Verlauf der Kurve durchaus miteinander vergleichbar.

Als Referenz ist der MERP2 mRNA Mittelwert der „nicht-Lerner“ aufgetragen. Diese wurden nach dem gleichen ISH Protokoll wie die „Lerner“ behandelt, jedoch konnte für diese Gruppe natürlich kein Zeit-Wert angegeben werden. Die „nicht-Lerner“ wurden als Vergleichswert herangezogen, da sie zwei wichtige Eigenschaften erfüllen: zum Einen kann die MERP2 mRNA Expression nicht auf ein Lernereignis zurückgeführt werden, da dieses nicht eingetreten ist (vergl. Ergebnisse, Tab. 5.1 und Abb. 5.5; Diskussion 6.1.4). Zum Anderen dürfte der zuvor diskutierte Faktor Stress hier einen wesentlich geringeren Einfluss haben. Die „nicht-Lerner“ Mäuse haben durchschnittlich mehr Trainingsdurchgänge absolviert als die „Lerner“. Erst nachdem keine Aussicht mehr auf einen Lernerfolg bestand, wurde das Training abgebrochen. Bis zu diesem Punkt hatten die Mäuse Zeit sich an das Trainingsparadigma zu gewöhnen. War der Stress-Faktor zu Beginn der Trainingseinheiten noch sehr hoch, so sank dieser mit der Anzahl der Durchgänge auf Grund der gesammelten Erfahrung. Um diese Aussage wissenschaftlich zu bestätigen, müssten Konzentrationsmessungen des Cortisols im Blut der Mäuse nach einer unterschiedlichen Anzahl von Trainingsdurchgängen gemacht werden. Jedoch stütze ich diese Aussage auf Beobachtungen des Verhaltens der Mäuse. Reagierten sie zu Beginn der Versuchsreihe noch mit hektischen Schwimmbewegungen und starkem Fluchtverhalten beim Einsetzen ins Becken, so verringerte sich dieses Verhalten mit dem Dauer der Versuchsreihe meist deutlich. Daher gehe ich davon aus, dass der Faktor Stress für diese Gruppe zwar nicht komplett ausgeschaltet, wohl jedoch verringert wurde. Somit liefert diese Gruppe einen guten Vergleich für die zeitliche Veränderung der MERP2 mRNA im Zeitverlauf.



**Abb. 6.5: Vergleich der MERP2 mRNA Expression im Zeitverlauf, ermittelt durch die RT-PCR bzw. der ISH.** Dargestellt sind die Ergebnisse der RT-PCR (blau) und der ISH (rot). Auf der Ordinate ist der Expressionswert in QL aufgetragen, die Abszisse stellt die Zeit in Minuten dar. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.

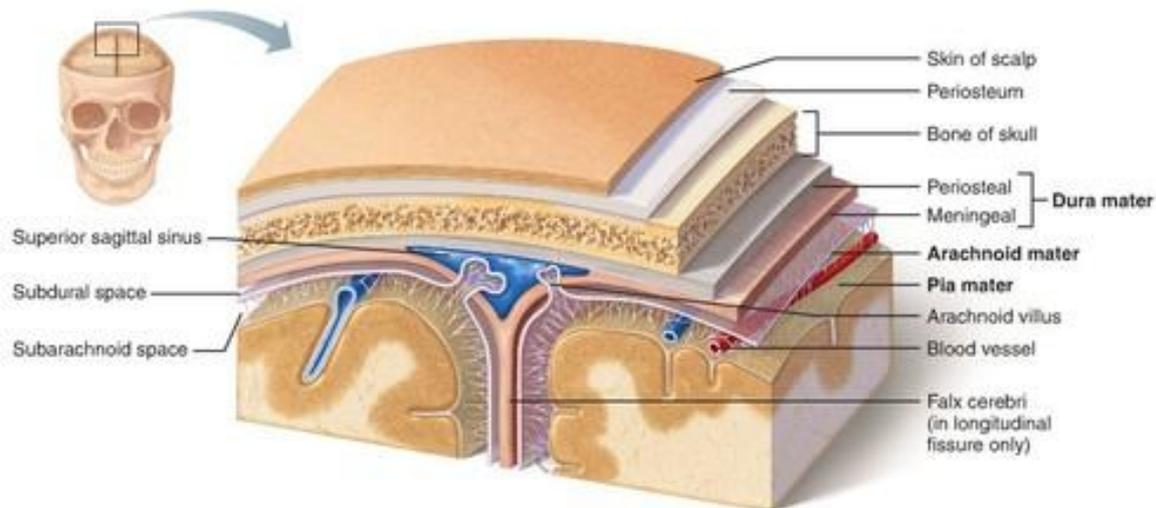
Auffällig beim Vergleich der beiden Zeitverlaufskurven ist deren Steigungsmuster. Beiden gemein ist ein Anstieg der Syntheserate. Von einem erhöhten Synthese-Wert nach 30 Minuten im Vergleich zu den Referenzwerten, steigt der Verlauf weiter hin zu 60 Minuten an, gefolgt von einem deutlichen Einbruch innerhalb der nächsten Stunde. Abschließend steigen beide QL-Werte wieder an. Unterschiedlich ist jedoch die Qualität der Steigungen. Bei der RT-PCR-Kurve erscheinen diese im Allgemeinen eher etwas flacher zu verlaufen. Man sollte aber die recht deutlichen Fehlerbalken beachten. Diese könnten eine Erklärung für die unterschiedliche großen Steigungen darstellen. Aber selbst unter ihrer Berücksichtigung ergibt sich bei beiden Zeitverläufen ein ähnlicher, zweigipfliger Expressionsverlauf. Die Ergebnisse der ISH scheinen diejenigen der RT-PCR zu bestätigen. Dies unterstreicht also die Vermutung, dass ein ähnlicher Mechanismus hinter der MERP2 mRNA Expression steht, wie er für das Ependymin diskutiert wird.

#### **6. 3. 4 Die MERP2 mRNA Lokalisation im Zeitverlauf**

Auf Grund der hohen Auflösung (25 x 25 µm; Herstellerangabe), welche mit dem Phosphorimager und den speziellen hochauflösenden *Screens* erreicht werden konnte, war eine gute Lokalisierung des MERP2 mRNA Syntheseortes möglich (vergl. Ergebnisse, Abb. 5.15). Die deutlichste Erkenntnis aus den hier durchgeführten Versuchen war, dass keine zeitspezifische Veränderung des Syntheseortes auszumachen war. Unabhängig vom Tötungszeitpunkt nach dem Lernereignis blieb das markierte Gewebe das Selbe. Auch das Lernereignis an sich hatte keinen Einfluss auf den Expressionsort. Die Gruppe der „nicht-Lerner“ zeigte ebenfalls keine unterschiedliche Gewebe-Präferenz im Vergleich mit der Gruppe der „Lerner“.

Grundsätzlich ist zu sagen, dass ständig ein kontinuierliches Hintergrundsignal detektiert werden konnte. Dieses war jedoch weitestgehend gleichmäßig über das gesamte Präparat verteilt. Dieses Signal konnte durch eine stringenter Posthybridisierung verringert werden. Jedoch waren die spezifischen Signale ebenfalls sehr schwach. Durch stringenteres „Waschen“ konnten so diese Signale ebenfalls kaum noch, teilweise überhaupt nicht mehr, wahrgenommen werden. Wie bereits zuvor erwähnt, scheint das MERP2 zwar in größerer Anzahl als das MERP1 im Mausgehirn vorhanden zu sein, jedoch immer noch in einer sehr geringen Größenordnung. Daher wurde das angewandte ISH Protokoll als ein Kompromiss zwischen spezifischen und Hintergrund-Signalen akzeptiert. Damit der Hintergrund jedoch keinen Einfluss auf das eigentlich zu untersuchende Signal hatte, wurde das Hintergrundsignal rechnerisch abgezogen (vergl. 6.3.2).

Deutliche Signale wurden vor allem im äußeren dorsalen Bereich des Mausgehirns gefunden. Diese markierten eine Struktur, die wie ein dünner Strich die Kontur des Gehirns nachvollzog. Diese Markierungen verwundern nicht weiter, wenn man die Verwandtschaft des MERP2 zum Goldfisch Ependymin berücksichtigt. Rother konnte zeigen, dass das Ependymin nicht in seinem namensgebenden Gewebe, der ependymalen Zone des Goldfischgehirns, sondern ausschließlich in der Endomeninx und in endomeningealen Invaginationen synthetisiert wird (Rother, 1992). Daher lag es nahe den Syntheseort des MERP2 in der homologen Struktur des Säugers zu vermuten. In der Abbildung 6.6 ist der Aufbau der Säugermeninx dargestellt.



**Abb. 6.6: Aufbau der Meninx beim Säuger.** In der Abbildung ist schematisch der Aufbau der Säugermeninx dargestellt. Sie ist dreischichtig und besteht von außen nach innen liegend aus der *Dura mater*, der *Arachnoidea* und der *Pia mater*. Die *Dura mater* ist ein festes Bindegewebe, welches aus Kollagenfasern gebildet wird. Die *Arachnoidea* bildet ein Geflecht aus kollagenen Fasern und bildet zusammen mit der *Pia mater* den äußeren Raum des *cerebrospinal Liquors*. Die innerste Schicht ist die *Pia mater*, welche auf Grund ihrer weichen Bindegewebsstruktur auch die Furchenzeichnung des Gehirns nachvollziehen kann.

Die Abbildung ist der Internetseite [quizlet.com](http://o.quizlet.com/i/60G_nQHjEO9qyUpXQFOXQA.jpg) entnommen und unter der Adresse [http://o.quizlet.com/i/60G\\_nQHjEO9qyUpXQFOXQA.jpg](http://o.quizlet.com/i/60G_nQHjEO9qyUpXQFOXQA.jpg) aufzurufen.

Der Syntheseort des Ependymins, die Endomeninx des Goldfisches, entspricht in der Funktion der Säuger *Arachnoidea*, sowie der *Pia mater* (Bargmann, 1954). Auf Grund des engen Kontakts dieser Schichten zu den jeweiligen Cerebrospinalflüssigkeiten und der Lokalisation der eigentlichen Proteine auch an entfernter liegenden Strukturen (Ependymale Region, Goldfisch; Hippocampus, Maus; siehe Ergebnisse, Abb. 5.19 ff.), wären diese Zellen geeignet, das Ependymin, bzw. das MERP2 zu synthetisieren und zu sezernieren. Auch hier erkennt man also wieder eine Homologie des MERP2 zum Ependymin, was ein weiteres Argument für eine gleiche oder zumindest ähnliche Funktion darstellt.

Überraschend war jedoch die Feststellung, dass sich durch die Lokalisierung herausstellte, dass eine scheinbare Präferenz des MERP2 mRNA Syntheseortes für die rechte Hemisphäre auftritt. Dieses Ergebnis wurde häufig beobachtet, jedoch nicht immer. Durch die unterschiedliche Lage der Präparate während der Hybridisierung sollte der Einfluss der Gravitation möglichst ausgeschlossen werden, ebenso wie durch den Einsatz einer Wasserwaage. Da dieser Effekt jedoch nicht immer zu beobachten war, sollte diese Hemisphären-spezifische Präferenz mit Vorsicht diskutiert werden. Geht man jedoch davon aus, dass sie nicht artifiziell ist, so bleibt die Frage, warum diese Spezifität auftritt? Eine erste Vermutung berücksichtigt den verwendeten Lerntest, das Morris Water Maze. Hierbei handelt es sich um einen Test, bei dem das Orientieren im Raum erlernt werden soll. Zum Einen wird diese Orientierung durch geometrische Formen (Kreis, bzw. Kreuz) an den Wänden unterstützt, zum Anderen erkennt die Maus, während der Orientierungszeit von der Plattform aus, die schwarze Becken Wand im Kontrast zum Milchpulver-

getrübten Wasser. Somit ist ihr eine Abschätzung der Distanz der Plattform zu den geometrischen Zeichen an der Wand, sowie zur Beckenwand möglich. Die Unterschiede in der Funktion der beiden cerebralen Hemisphären werden schon seit langem untersucht. Neben den jeweiligen dominanten Bereichen der Gehirnhälften für sprachliche (beim Menschen), taktile und weitere Funktionen, ergeben sich auch Unterschiede bei den visuellen und räumlichen Fähigkeiten. So konnte gezeigt werden, dass die rechte Hemisphäre dominant ist beim Erkennen von geometrischen Mustern. Ebenso führten Läsionen innerhalb der rechten Gehirnhälfte zu schlechteren Ergebnissen bei der räumlichen Orientierung (Corkin, 1965; Ratcliff and Newcombe, 1973). Daher könnte man vermuten, dass die Präferenz der rechten Hemisphäre für die mRNA Synthese des MERP2 vielleicht mit diesen Erkenntnissen im Zusammenhang steht. Durch eine nähere Lokalisation zu den entsprechenden Strukturen (Hippocampus, vergl. Ergebnisse, Abb. 5.19 ff.) innerhalb der rechten Gehirnhälfte, ist vielleicht ein schnelleres Bereitstellen des Proteins möglich. Dagegen spricht jedoch, dass durch die Nähe der *Pia mater* zur Cerebrospinalflüssigkeit ein Transport zum Hippocampus und anderen Strukturen, unabhängig von den Hemisphären möglich ist. Eine weitere Möglichkeit wäre das Vorhandensein eines regional wirkenden Rückkoppelungsmechanismus für die Synthese des MERP2. Da durch das räumliche Lernen vor allem (aber nicht ausschließlich!) die rechte Hemisphäre beansprucht wird, könnte damit eine erhöhte Aktivität näherliegender, synthetisierender Zellen einhergehen. Dies ist jedoch eine Hypothese, die durch Untersuchungen belegt werden müsste.

## 6. 4 Immunhistochemie

Der abschließende Teil der Diskussion verlässt die Untersuchung der mRNA und befasst sich mit dem eigentlichen Protein. Mittels immunhistochemischen Untersuchungen wurde die Lage der Proteine innerhalb des Mausgehirns an Gewebeschnitten aufgezeigt. Ebenfalls können Vermutungen über die subzelluläre Lage des Proteins aufgestellt werden.

### 6. 4. 1 Die primären Antikörper und deren Aussagekraft

Für die Immunhistochemie wurden insgesamt vier verschiedene primäre Antikörper eingesetzt. Der Antikörper gegen das GFAP wurde von der Firma Invitrogen bezogen und konnte problemlos verwendet werden. Der Antikörper gegen das humane MERP1, anti-Epdr1, wurde ebenfalls kommerziell bezogen. Hierbei ergaben sich zwei Probleme: zum Einen war es gegen das humane MERP1 gerichtet, nicht gegen das murine. *Alignment*-Untersuchungen ergaben jedoch, dass die Aminosäuren der humanen MERP1 und des murinen MERP1 zu 99% übereinstimmen. Die Übereinstimmung zwischen murinem MERP1 und murinem MERP2 beträgt allerdings nur 78% (Apostolopoulos, 2001). Somit ist es zwar sehr wahrscheinlich, dass dieser Antikörper das MERP der Maus binden kann. Ob aber auch das MERP2 gebunden werden kann ist hingegen nicht absolut sicher. Dabei ist davon auszugehen, dass nach denen in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnissen, gerade das MERP2 in deutlich höherer Anzahl vorhanden sein dürfte. Das zweite Problem ergibt sich durch die Art der Herstellung des Antikörpers. Da bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine genügend großen Mengen an MERP2, geschweige denn MERP1, gewonnen werden konnte, ist es bisher auch noch nicht gelungen einen Antikörper *in-vivo*, also gegen das gefaltete Protein, herzustellen. Die Tatsache, dass der vorliegende Antikörper gegen eine Proteinsequenz hergestellt wurde, lässt die Möglichkeit zu, dass dieser den Sequenzabschnitt, an welchen der Antikörper binden soll, gar nicht erkennen kann. Somit wäre auch eine Bindung an das Zielmolekül nicht möglich. Da dieser Antikörper in unseren Versuchen jedoch spezifische Bindungen zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass der avisierte Aminosäure-Sequenzabschnitt an der Oberfläche des Zielmoleküls liegt. Dass es sich dabei um das gesuchte MERP handelt ist nun ebenfalls sehr wahrscheinlich, da der Antikörper speziell gegen dessen Aminosäure Sequenz synthetisiert wurde.

Um dennoch weitere Sicherheit zu erhalten, dass der anti-Epdr1 Antikörper das MERP bindet, haben ebenfalls zwei weitere Antikörper Anwendung gefunden. Die Antikörper *Perseus* und *Beteigeuze* sind jeweils gegen eine der Ependymin Isoformen gerichtet (*Perseus* Immunogen: deglykosyliert monomeres, cytoplasmatisches Ependymin; *Beteigeuze* Immunogen: bi-N-glykosyliert

monomeres, cytoplasmatisches  $\beta$ -Ependymin). Dadurch, dass die Ependymin-Antikörper an den gleichen Regionen innerhalb der Mausgehirnschnitte banden, ergibt sich eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit dafür, dass sie, zumindest zum Teil konservierte Sequenzen an den MERPs der Maus erkannt haben. Diese Bindungen konnte leider nicht durch Doppel- oder Mehrfachmarkierungen innerhalb eines Schnittes gezeigt werden, da die Antikörper im gleichen Wirtsorganismus (Kaninchen) hergestellt wurden und somit eine spezifische Detektion durch unterschiedliche sekundäre Antikörper nicht möglich war. Jedoch wurden die Antikörper auf konsekutiven Schnitten aufgetragen, wodurch ein guter Vergleich möglich wurde.

#### **6. 4. 2 Antikörpermarkierungen der meningealen Bereiche**

In der Abbildung 5.16 (vergl. Ergebnisse, Abb. 5.16) sind beispielhaft Markierungen durch den anti-Epdr1 und den anti-GFAP Antikörper dargestellt. Es sind deutlich Markierungen im Bereich der Meninx zu erkennen. Doch welche Zellen sind es genau, die hier markiert wurden? Als potentielle Kandidaten hierfür bieten sich besonders die Ependymocyten an. Neben der Funktion des Stoffaustauschs zwischen Subarachnoidalflüssigkeit und *Liquor cerebrospinalis* sind sie auch selbst sekretorisch aktiv. Es handelt sich um einen „Epithelverband, welcher eine funktionsaktive Schranke zwischen den Hohlräumen des Nervensystems und den Neuronen darstellt“. (Liebich, 2010) Auf Grund ihrer Lage und ihrer Eigenschaften wären sie prädestiniert, um das Gewebe darzustellen, welches das MERP synthetisiert: durch die ISH wurde die MERP mRNA im Bereich der Meninx lokalisiert; durch die IF wurde das Protein ebenfalls an gleicher Stelle aufgefunden; diese Zellen sind sekretorisch aktiv und könnten somit das synthetisierte MERP in die Cerebrospinalflüssigkeit abgeben. Da sie zur Gruppe der Gliazellen zählen, sprechen auch die Markierung durch das anti-GFAP Antiserum in der Abbildung 5.16 für diese Zellen als den gesuchten Syntheseort.

Verfolgt man den Verlauf der Meninx vom dorsalen Bereich sagittal medial, so erkennt man, dass dieser Weg zum dorsalen dritten Ventrikel führt (Ergebnisse, Abb. 5.17 und 5.18). Dort scheinen die markierten Zellen zumindest einen Teil der Auskleidung zu bilden. Und auch hier spielen die Ependym-Zellen eine Rolle. Eine Untergruppe, die Tanycyten, sind in zirkumventrikulären Organen zu finden. Besonders gehäuft treten sie in der Wand des dritten Ventrikels auf (Liebich, 2010). Somit wäre es sicherlich möglich, dass diese Zellen hier markiert wurden. Passend hierzu konnte Rother bereits nachweisen, dass in endomeningealen Invaginationen des Goldfischgehirns die mRNA des Ependymins lokalisiert war, was eine weitere Homologie zwischen dem Ependymin und dem MERP darstellt (Rother, 1992).

### **6. 4. 3 Antikörpermarkierungen am Hippocampus**

Mit Immunfluoreszenz konnten ebenfalls deutliche Markierungen im Hippocampus der Maus ausgemacht werden (vergl. Ergebnisse, Abb. 5.19 ff.). Diese Region ist im Zusammenhang mit der Verwandtschaft des MERP zum Ependymin besonders interessant. Shashoua und Schmidt haben einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Ependymin und dem Lernen beim Goldfisch untersucht und mit einer Arbeitshypothese zusammengefasst (Shashoua and Schmidt, 2004). Die hippocampale Region ist schon seit langem ein Untersuchungsschwerpunkt, wenn die Mechanismen der Langzeitgedächtnisbildung beim Säuger aufgeklärt werden sollen. Angefangen mit der Einführung der „Hebbschen Lernregel“ (Hebb, 1949), über die Entdeckung der Langzeit-Potenzierung im Hippocampus des Kaninchens (Lømo, 1966) bis hin zur Erkenntnis, dass der Hippocampus am räumlichen Orientieren beteiligt ist (u.a. Morris, 1986), sind bis heute unzählige, weitere Untersuchungen in dieser Forschungsrichtung unternommen worden. Auch in der hier vorgelegten Arbeit konnten Immunfluoreszenz-Signale im Hippocampus detektiert werden. Diese Ergebnisse unterstützen die vorherigen Untersuchungen zur Beteiligung des MERP an der Langzeit Konsolidierung nach einem räumlichen Lernereignis.

### **6. 4. 4 Verteilung des MERPs auf zellulärer Ebene**

Wie bei lichtmikroskopischen Untersuchungen schon zu vermuten war, wurde durch die konfokale Analyse eine zirkuläre Verteilung des MERPs in der Region des Gyrus dentatus (vergl. Ergebnisse, Abb. 5.21) und der CA3-Region deutlich. Wie kommt es jedoch zur Ausbildung dieser Strukturen? An den Membranen der Zellen des Gyrus dentatus und der CA3-, bzw., CA4-Regionen der adulten Ratte konnten die neuronalen Zelladhäsionsmoleküle L1, NCAM, NCAM180, beta1 Integrin, an NCAM gekoppelte Polysialinsäure, sowie das Tenacin-R aus der extrazellulären Matrix lokalisiert werden (Schuster et al., 2001). Das ist besonders interessant, da diese Moleküle mit der synaptischen Plastizität und somit auch mit der Langzeit-Gedächtnisbildung in Verbindung gebracht werden (Schachner, 1997; Schmidt et al., 1997; Schmidt and Pradel, 1997). Auf Grund des vermuteten Aufbaus des MERPs ist seine Einteilung in die Klasse der Zelladhäsionsmoleküle zu erwarten. Zu dieser gehört auch das oben aufgezählte Molekül Tenacin-R. Somit würde der Schluss, dass das MERP an den Membranen der Zellen bindet durchaus sinnvoll erscheinen. Zieht man weiterhin in Betracht, dass die MERPs, ebenso wie ihr Pendant im Goldfisch, das Ependymin, beim Abfall der Kalziumkonzentration in der direkten Umgebung lange Fasern ausbilden würde (Shashoua et al., 1990), somit könnte die hier gezeigte zelluläre Verteilung erklärt werden. Wie Schuster und Mitarbeiter (2001) beschrieben, wurde das Tenacin-R besonders zwischen Moosfasern detektiert, ebenso an unmyelinisierten

Axonen und glialen Elementen der Molekularschicht des Gyrus dentatus. Auch in der CA3 Region wurden starke Markierungen zwischen den Somata der Pyramidenzellen gefunden. Jedoch konnten keine Signale in den Gebieten der synaptischen Dornen, bzw. der synaptischen Stiele festgestellt werden. Würden sich also Faser-artige Strukturen des MERP bilden und diese ähnlich dem Tenascin-R verteilen, so wäre eine seil-artige Umwicklung an der Membran der Neuronen durchaus denkbar. Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie würden genauere Aufschlüsse zu dieser Vermutung bringen und tiefere Einblicke in die genaue Verteilung des MERP auf ultrazellulärer Ebene gewähren.

## 6. 5 Ausblicke

Es ergeben sich einige Ansatzpunkte für die nächsten Schritte zur Erforschung des MERP der Hausmaus anhand der hier gewonnenen Ergebnisse, besonders im Hinblick darauf, dass die Untersuchungen zu diesem Protein noch nicht sehr weit vorangeschritten sind.

Ein großer Fortschritt wäre die Gewinnung und Aufreinigung des MERP2 aus dem Gehirn der Maus. Mit diesem könnten sowohl weitere Untersuchungen durchgeführt, als auch *in-vivo* erzeugte Antikörper gewonnen werden. Somit könnten noch zuverlässigere immunhistochemische Untersuchungen erreicht werden.

Im Hinblick auf die Zeitverlaufskurven, welche in dieser Arbeit erstellt wurden, wären weitere Untersuchungen über drei Stunden hinaus dringend notwendig. Somit könnte geklärt werden, ob und wann es zu einem Maximum in der Syntheserate des MERP2 kommt. Ebenso könnte somit die Frage beantwortet werden, ob auch bei dem zweiten Anstieg der Syntheserate im Vergleich mit dem Ependymin, eine ähnliche zeitliche Verschiebung auftritt, wie beim ersten.

Zur Lokalisierung des Syntheseortes des MERPs, als auch zum Bestimmen des Vorkommens des eigentlichen Proteins, konnten hier einige Aussagen getroffen werden. Um eine genauere Lokalisierung zu ermöglichen, gerade im subzellulären Bereich, wären elektronenmikroskopische Untersuchungen hervorragend geeignet. Somit könnte geklärt werden, ob das MERP tatsächlich in den Ependymocyten gebildet und von diesen sezerniert wird und ob, bzw. wo sie an den Membranen der Zellen des Hippocampus binden.

In diesem Zusammenhang wären auch Untersuchungen zu den Bindungseigenschaften des MERPs an das Kalzium angebracht. Hat ein Absenken der lokalen Kalziumkonzentration eine Polymerisierung des MERPs zur Folge, vergleichbar wie beim Ependymin? In diesem Fall wäre es ein unterstützendes Argument für die hier angebrachte Erklärung der zirkulären Struktur des MERPs im Hippocampus. Dazu wären ebenfalls Untersuchungen zu den Bindungspartnern des MERP hilfreich: Geht das MERP Dimerbildungen ein? Bindest es andere Moleküle, z.B. an Rezeptoren auf den Membranen von Neuronen oder an Molekülen der extrazellulären Matrix? Hierzu wäre besonders eine Co-Immunopräzipitation (Co-IP) geeignet. Jedoch wäre auch hier wieder das Vorhandensein eines zuverlässigen Antikörpers die wichtigste Voraussetzung.

Ebenfalls wären Untersuchungen des MERPs im Zusammenhang mit der Entwicklung des Gehirns von Interesse. Sollten die Vermutungen zutreffen, dass das MERP an der Plastizität und der Richtungsführung der Axone beteiligt ist, so wären

auch Unterschiede in seiner Konzentration während der verschiedenen Stadien der Gehirnentwicklung nicht unwahrscheinlich. Mittels der RT-PCR wären für diese Überlegungen Ergebnisse zu erzielen. Idealerweise würden diese Untersuchungen jedoch mit einer quantitativen, sprich einer *real time* PCR durchgeführt werden, um noch genauere Daten zu erhalten.

Es haben sich jedoch noch weitere, grundlegendere Fragen aufgetan. Das Ependymin wird oft in den Zusammenhang mit der Gedächtniskonsolidierung gebracht. Daher richtete sich bei den hier durchgeführten Untersuchungen auch das Augenmerk auf das MERP im Zusammenhang mit einem Lernereignis. Jedoch sollte weder die Rolle des Ependymins, noch des MERPs auf diesen Punkt beschränkt betrachtet werden. Die Stabilisierung neuer synaptischer Verbindungen kann auch an anderer Stelle auftreten. So wird seit einiger Zeit auch das Cerebellum mit kognitiven Fähigkeiten in Verbindung gebracht. Vor allem beim implizierten Lernen, also dem Erlernen von unbewussten Handlungen, aber auch von neuen Bewegungsabläufen, spielt das Kleinhirn anscheinend eine Schlüsselrolle. Auch eine Beteiligung am räumlichen Orientieren wird diskutiert (Dahhaoui et al., 1992; Rochefort et al., 2013). Passend hierzu konnten auch Signale für das MERP im Cerebellum in den hier durchgeführten Ergebnissen detektiert werden. Um dies näher zu untersuchen, wurden bereits Vorversuche in dieser Richtung begonnen: Mittels der in dieser Arbeit beschriebenen Methoden werden das Cerebellum und das übrige Gehirn miteinander verglichen. Dazu wurden Mäuse in drei Gruppen eingeteilt, in „untrainierte“ Kontrollmäuse, in „Lerner“ mit einem Tötungszeitpunkt drei Stunden nach dem Lernereignis (dem bisher zuverlässigsten, bekannten Zeitpunkt des Anstiegs der MERP2 Synthese) und in die Gruppe derer, die lediglich schwimmen gelassen wurden, jedoch ohne eine Plattform. Diese Vorversuche sollen zeigen, ob das Erlernen eines neuen Bewegungsablaufs, dem Schwimmen, einen Anstieg der MERP2-Konzentration im Cerebellum zur Folge hat. Dieses Ergebnis könnte die Vermutung unterstützen, dass das MERP2 eine Rolle bei der allgemeinen synaptischen Plastizität und axonalen Richtungsführung spielt.

## 7. Literatur

Agranoff, B.W., Davis, R.E. and Brink, J.J. (1966): Chemical studies on memory fixation in goldfish. *Brain res.*, **1**, 303-309.

Albarran-Zeckler, R.G., Brantley, A.F. and Smith, R.G. (2012): Growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a) knockout mice exhibit improved spatial memory and deficits in contextual memory. *Behav. Brain Res.*, **232**, 13-19.

Alberts, B., Bray, D., Hopin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2004): Tissues and Cancer. Essential cell biology. *Garland Science*, **2**.

Apostolopoulos, J., Sparrow, R.L., McLeod, J.L., Collier, F.M., Darcy, P.K., Slater, H.R., Ngu, C., Gregorio-King, C.C. and Kirkland, M.A. (2001): Identification and characterisation of a novel family of Mammalian Ependymin Related Proteins (MERPs) in hematopoietic, nonhematopoietic and malignant tissues. *DNA Cell Biol.*, **20**, 625-635.

Arbeitsgemeinschaft der Tierschutzbeauftragten in Baden-Württemberg: Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft der Tierschutzbeauftragten in Baden-Württemberg-ATBW. **Kapitel 13**.

Atkinson, R.C. and Shiffrin, R.M. (1968): Human memory: A proposed system and its control processes. *The psychology of learning and motivation*, **2**, 89-195.

Ayad, S., Boot-Hanford, R.P., Humphries, M.J., Kadler, K.E. and Shuttleworth, C.A. (1998): The Extracellular Matrix (Facts Book). *Academic Press*, 3 ff.

Baddeley, A.D. (2000): The episodic buffer: a new component of working memory? *Trends Cogn. Sci.*, **4**, 417-423.

Baddeley, A.D. and Hitch, G.J. (1974): Working memory. *Recent advances in learning and motivation*, **8**, 47-90.

Bargmann, W. (1954): Über die Endomeninx der Fische. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, **40**, 88-100.

Benowitz, L.I. and Shashoua, V.E. (1977): Localisation of a brain protein metabolically linked with behavioural plasticity in the goldfish. *Brain Res.*, **136**, 227-242.

Bettis, T.J. and Jacobs, L.F. (2009): Sex-specific strategies in spatial orientation in C57BL/6J mice. *Behav. Processes*, **82**, 249-255.

Bliss, T.V.P. and Lømo, T. (1973): Long lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.*, **232**, 357-374.

Borst, P. (2005): Ethidium DNA agarose gel electrophoresis: how it started. *Life*, **57**, 745-747.

Brasil (1904): *Archives de zoologie expérimentale et générale*, **2**, 445.

Caradec, J., Sirab, N., Keumeugni, C., Moutereau, S., Chimingqi, M., Matar, C., Revaud, D., Bah, M., Manivet, P., Conti, M. and Loric, S. (2010): 'Desperate house genes': the dramatic example of hypoxia. *Br. J. Cancer*, **102**, 1037-1043.

Charles River (2013): Research Models and Services 2013 / Deutschland. *Charles River*, **1**, 26.

Chomczynski, P. and Mackey, K. (1995): Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques*, **19**, 942-945.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159.

Coons, A.H., Creech, H.J. and Jones, R.N. (1941): Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **47**, 200-202.

Corkin, S. (1965): Tactually-guided maze learning in man: effects of unilateral cortical excisions and bilateral hippocampal lesions. *Neuropsychologia*, **3**, 339-351.

Cremer, H., Lange, R., Christoph, A., Plomann, M., Vopper, G., Roes, J., Brown, R., Baldwin, S., Kraemer, P., Scheff, S. et al. (1994): Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature*, **367**, 455-459.

Dahhaoui, M., Lannou, J., Stelz, T., Caston, J. and Guastavino, J.M. (1992): Role of the cerebellum in spatial orientation in the rat. *Behav. Neural. Biol.*, **58**, 180-189.

Darling, D.C. und Brickel, P.M. (1996): Nukleinsäure-Blotting. *Spektrum Akademischer-Verlag*.

Della Valle, M.C., Sleaf, D.E., Sohar, I., Wen, T., Pintar, J.E., Jadot, M. and Lobel, P. (2006): Demonstration of lysosomal localization for the mammalian ependymin-related protein using classical approaches combined with a novel density shift method. *J. Biol. Chem.*, **281**, 35436-35445.

Fang, Y., Choi, D., Searles, R.P. and Mathers, W.D. (2005): A time course microarray study of gene expression in the mouse lacrimal gland after acute corneal trauma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **46**, 461-469.

Flexner, J.B., Flexner, L.B. and Stellar, E. (1963): Memory in mice is affected by intracerebral puromycin. *Science*, **141**, 57-59.

Frints, S.G., Marynen, P., Hartmann, D., Fryns, J.P., Steyaert, J., Schachner, M., Rolf, B., Craessaerts, K., Snellinx, A., Hollanders, K., D'Hooze, R., De Deyn, P.P. and Froyen, G. (2003): CALL interrupted in a patient with non-specific mental retardation: gene dosage-dependent alteration of murine brain development and behavior. *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 1463-1474.

Garthe, A., Behr, J. and Kempermann, G. (2009): Adult-Generated Hippocampal Neurons Allow the Flexible Use of Spatially Precise Learning Strategies. *PLoS ONE*, **4**, e5464.

Gesellschaft für Versuchstierkunde (2007): Tiergerechte Haltung: Labormäuse. Version \_20.03.07.

Greer, S., Honeywell, R., Geletu, M., Arulanandam, R. and Raptis, L. (2010): Housekeeping genes; expression levels may change with density of cultured cells. *J. Immunol. Methods*, **355**, 76-79.

Gregorio-King, C.C., McLeod, J.L., Collier, F.M., Collier, G.R., Bolton, K.A., Van der Meer, G.J., Apostolopoulos, J. and Kirkland, M.A. (2002): MERP1: a mammalian ependymin-related protein gene differentially expressed in hematopoietic cells. *Gene*, **286**, 249-257.

Gumbiner, B.M. (2005): Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **6**, 622-634.

Haji-Younes, A. (2001): Bestimmung der mRNA-Kopienzahl vom ribosomalen S6-Protein in HeLa-Zellen durch kompetitive RT-PCR. *Dissertation*.

Hatta, K., Takagi, S., Fujisawa, H. and Takeichi, M. (1987): Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Dev. Biol.*, **120**, 215-227.

Hebb, D.O. (1947): The effects of early experience on problem solving at maturity. *American Psychologist*, **2**, 306-307.

Hebb, D.O. (1949): Organization of Behavior: a Neuropsychological Theory. *John Wiley*.

Heinroth, O. (1910): Beiträge zur Biologie, namentlich Ethologie und Psychologie der Anatiden. *Berichte des V. Int. Ornithologen Kongresses Berlin*, 559 ff.

Hinchliffe, D. (2008): Lokalisierung der Mammalian Ependymin-Related Proteins (MERPs) im Gehirn von *Mus musculus* mit Hilfe der *in-situ* Hybridisierung. *Diplom-Arbeit*.

Hubel, D.H. and Wiesel, T.N. (1970): The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *J. Physiol.*, **206**, 419-436.

Jackson, D., Leitch, A.R. and Schwarzacher, T. (1994): In-situ-Hybridisierung. *Spektrum Akademischer Verlag*, **1**, 75.

Jacque, C.M., Vinner, C., Kujas, M., Raoul, M., Racadot, J. and Baumann, N.A. (1978): Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors. *J. Neurol. Sci.*, **35**, 147-155.

Johnston, R.F., Pickett, S.C. and Barker, D.L. (1990): Autoradiography using storage phosphor technology. *Electrophoresis*, **11**, 355-360.

Kaiser, R. und Gottschalk, G. (1972): Elementare Tests zur Beurteilung von Meßdaten. *B.I.-Wissenschaftsverlag*.

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

Kollmann, K., Mutenda, K.E., Balleininger, M., Eckermann, E., von Figura, K., Schmidt, B. and Lübke, T. (2005): Identification of novel lysosomal matrix proteins by proteome analysis. *Proteomics*, **5**, 3966-3978.

Königstorfer, A., Sterrer, S., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Schmidt, R. and Hoffmann, W. (1989): Molecular characterization of an ependymin precursor from goldfish brain. *J. Neurochem.*, **52**, 310-312.

Krech, D., Rosenzweig, M.R. and Bennett, E.L. (1960): Effects of environmental complexity and training on brain chemistry. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **53**, 509-519.

Kruse, J., Keilhauer, G., Faissner, A., Timpi, R. and Schachner, M. (1985): The J1 glycoprotein – a novel nervous system cell adhesion molecule of the L2/HNK-1 family. *Nature*, **316**, 146-148.

Law, J.W., Lee, A.Y., Sun, M., Nikonenko, A.G., Chung, S.K., Dityatev, A., Schachner, M. and Morellini, F. (2003): Decreased anxiety, altered place learning, and increased CA1 basal excitatory synaptic transmission in mice with conditional ablation of the neural cell adhesion molecule L1. *J. Neurosci.*, **12**, 10419-10432.

Liddell, E. und Weeks, I. (1996): Antikörper-Techniken. *Spektrum Akademischer Verlag*.

Liebich, H.G. (2010): Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel. *Schattauer Verlag*, **5**.

Lømo, T. (1966): Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in the dentate area of the hippocampal formation. *Acta Physiologica Scandinavica*, **68**, 128.

Lorenz, K. (1978): Vergleichende Verhaltensforschung oder Grundlagen der Ethologie. *Springer-Verlag*.

Lowry, E.R., Kruyer, A., Norris, E.H., Cederroth, C.R. and Strickland, S. (2013): The GluK4 Kainate Receptor Subunit Regulates Memory, Mood, and Excitotoxic Neurodegeneration. *Neuroscience*, **235**, 215-225.

Lugo, J.N., Brewster, A.L., Spencer, C.M. and Anderson, A.E. (2012): Kv4.2 knockout mice have hippocampal-dependent learning and memory deficits. *Learn. Mem.*, **19**, 182-189.

Man, M.Z., Hui, T.Y., Schaffer, J.E., Lodish, H.F. and Bernlohr, D.A. (1996): Regulation of the murine adipocyte fatty acid transporter gene by insulin. *Mol Endocrinol.*, **10**, 1021-1028.

Matthies, H. (1989): In search of cellular mechanisms of memory. *Progr. Neurobiol.*, **32**, 277-349.

Moloney, J.B. (1960): Biological studies on a Lymphoid-Leukemia virus extracted from sarcoma 37. I. Origin and introductory investigations. *J. Natl. Cancer Inst.*, **24**, 933-951.

Morris, R.G. (1984): Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*, **11**, 47-60.

Nimmrich, I., Erdmann, S., Melchers, U., Chtarbova, S., Finke, U., Hentsch, S., Hoffmann, I., Oertel, M., Hoffmann, W. and Müller, O. (2001): The novel ependymin related gene UCC1 is highly expressed in colorectal tumor cells. *Cancer Letters*, **165**, 71-79.

O'Keefe, J. and Dostrovsky, J. (1971): The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.*, **34**, 171-175.

Perl, D., Mueller, U., Heinemann, U. and Schmid, F.X. (2000): Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 380-383.

Pfaffel, M.W. (2004): Real Time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum, Sonderausgabe PCR*, **10**, 92-95.

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

Plopper, G. (2007): The extracellular matrix and cell adhesion, in *Cells. Jones and Bartlett*.

Ramón y Cajal, S.F. (1894). The Croonian Lecture: La Fine Structure des Centres Nerveux. *Proceedings of the Royal Society of London*, **55**, 444-468.

Ratcliff, G. and Newcombe, F. (1973): Spatial orientation in man: effects of left, right, and bilateral posterior cerebral lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **36**, 448-454.

Reyes, A.A., Small, S.J. and Akeson, R. (1991): At least 27 alternatively spliced forms of the neural cell adhesion molecule mRNA are expressed during rat heart development. *Mol. Cell Biol.*, **11**, 1654-1661.

Ribeiro, A.S., Eales, B.A. and Biddle, F.G. (2013): Short-term and long-term memory deficits in handedness learning in mice with absent corpus callosum and reduced hippocampal commissure. *Behav. Brain Res.*, **245**, 145-151.

Rocheffort, C., Lefort, J. and Rondi-Reig, L. (2013): The cerebellum: a new key structure in the navigation system. *Front. Neural Circuits*, **7**, 35.

Roessmann, U. and Gambetti, P. (1986): Astrocytes in the developing human brain. An immunohistochemical study. *Acta Neuropathol.*, **70**, 308-313.

Roessmann, U., Velasco, M.E., Sindely, S.D. and Gambetti, P. (1980): Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in ependymal cells during development. An immunocytochemical study. *Brain Research*, **200**, 13-21.

Romeis, B. (1968): Mikroskopische Technik. *R. Oldenbourg*, **16**, §307.

Rother, S. (1992): Expression und ultrastrukturelle Verteilung eines verhaltensassoziierten Glykoproteins (Ependymin) im Goldfischgehirn. *Dissertation*.

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

Scharpekant, S. und Laudén, H. (1980): Einfluss gehemmter Proteinbiosynthese auf Lern- und Gedächtnisleistung von Positiv- und Negativdrückuren beim Goldfisch (*Carassius carassius auratus* L., Pisces Cyprinidae). *Zool. Jb. Physiol.*, **84**, 125-145.

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

Schmidt, R. (2011): Großgeräte und biochemische Methoden in der Zellbiologie. *Versuchsanleitung*.

Schmidt, R. und Hinchliffe, D. (2012): Anwendung und Messung von Radionukliden in den Biowissenschaften. *Versuchsanleitung*.

Schmidt, R., Löffler, F., Müller, H.W. and Seifert, W. (1986): Immunological cross-reactivity of cultured rat hippocampal neurons with goldfish brain proteins synthesized during memory consolidation. *Brain Res.*, **386**, 245-257.

Schmidt, R. and Makiola, E. (1992): Calcium and zinc ion binding properties of goldfish brain ependymin. *Life Sci. Adv.*, **10**, 161-171.

Schmidt, R. and Marktscheffel, P. (1990): Molecular characterization of neuronal cell substrate adhesion molecules implicated in plasticity of the CNS. *Brain-Perception, Cognition, Proceedings of the 18<sup>th</sup> Göttingen Neurobiology Conference*, 441.

Schmidt, R. and Pradel, G. (2000): Cell adhesion molecules L1.1, NCAM and ependymin contribute to the memory consolidation process in the optic tectum of goldfish and zebrafish. *Abstr. X<sup>th</sup> Magdeburg Internatl. Symposium on Mechanisms of Learning and Memory*, 60.

Schmidt, R., Pradel, G. and Schachner, M. (1997): Contribution of HNK-1 bearing cell adhesion molecules to memory consolidation in cyprinids. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.*, **90**, 321.

Schmidt, R. and Shashoua, V.E. (1981): A radioimmunoassay for ependymins  $\beta$  and  $\gamma$ : Two goldfish brain proteins involved in behavioral plasticity. *J. Neurochem.*, **36**, 1368-1377.

Schuster, T., Krug, M., Stalder, M., Hackel, N., Gerardy-Schahn, R. and Schachner, M. (2001): Immunoelectron microscopic localization of the neural recognition molecules L1, NCAM, and its isoform NCAM180, the NCAM-associated polysialic acid, beta1 integrin and the extracellular matrix molecule tenascin-R in synapses of the adult rat hippocampus. *J. Neurobiol.*, **49**, 142-158.

Shashoua, V.E. (1976): Identification of specific changes in the pattern of brain protein synthesis after training, *Science*, **193**, 1264-1266.

Shashoua, V.E. (1977): Ependymin  $\beta$ : A brain protein metabolically linked with behavioral plasticity in goldfish. *Mechanisms, Regulation and Special Functions of Protein Synthesis in the Brain*, Elsevier, 331-342.

Shashoua, V.E. (1986): The role of neurosecretory cells in learning and memory. *Adv. Biosci.*, **61**, 245-254.

Shashoua, V.E. (1989): The role of ependymin in the development of long lasting synaptic changes. *J. Physiol. Paris*, **83**, 232-239.

Shashoua, V.E. (1991): Ependymin, a brain extracellular glycoprotein, and CNS plasticity. *Annal. New York Acad. Sci., Activity-Driven CNS Changes in Learning and Development*, **627**, 94-114.

Shashoua, V.E. and Hesse, G.W. (1989a): Classical conditioning leads to changes in extracellular concentrations of ependymin in goldfish brain. *Brain Res.*, **484**, 333-339.

Shashoua, V.E., Hesse, G.W. and Milinazzo, B. (1990): Evidence for the *in vivo* polymerization of ependymin: A brain extracellular glycoprotein. *Brain Res.*, **522**, 181-190.

Shashoua, V.E. and Moore, M.E. (1978): Effect of antisera to  $\beta$  and  $\gamma$  goldfish brain proteins on the retention of a newly acquired behavior. *Brain Res.*, **148**, 441-449.

Shashoua, V.E. and Schmidt, R. (2004): Ependymins: Cell adhesion proteins of the extracellular matrix and CNS plasticity. *Encyclopedia of Neuroscience*, **3**.

Skinner, B.F. (1953): Science and Human Behavior. *Pearson Education*, **1**.

Sperling, G. (1963): A Model for Visual Memory Tasks. *Human Factors: The Journal of the Human Factors and Ergonomics Society*, **5**, 19-31.

Stavnezer, A.J., Hyde, L.A., Bimonte, H.A., Armstrong, C.M. and Denenberg, V.H. (2002): Differential learning strategies in spatial and nonspatial versions of the Morris water maze in the C57BL/6J inbred mouse strain. *Behav. Brain Res.*, **133**, 261-270.

Suárez-Castillo, E.C. and García-Arrarás, J.E. (2007): Molecular evolution of the ependymin protein family: a necessary update. *BMC Evol Biol*, **7**, 23.

Suárez-Castillo, E.C., Medina-Ortiz, W.E., Roig-Lopez, J.L., García-Arrarás and J.E. (2004): Ependymin, a gene involved in regeneration and neuroplasticity in vertebrates, is overexpressed during regeneration in echinoderm *Holothuria glaberrima*. *Gene*, **334**, 133-143.

Takeichi, M. (1991): Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, **251**, 1451-1455.

Valnes, K. and Brandtzaeg, P. (1985): Retardation of immunofluorescence fading during microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, **33**, 755-761.

Watson, J.B. (1913): Psychology as the Behaviorist Views It. *Psychol. Rev.*, **20**, 158-177.

Wolff, M., Savova, M., Malleret, G., Segu, L. and Buhot, M.C. (2002): Differential learning abilities of 129T2/Sv and C57BL/6J mice as assessed in three water maze protocols. *Behav. Brain Res.*, **136**, 463-474.

Internet-Links:

<http://www.pathologyoutlines.com/topic/cdmarkerscd56.html> (Stand: 19.04.2013)

[http://o.quizlet.com/i/60G\\_nQHjEO9qyUpxQFOXQA.jpg](http://o.quizlet.com/i/60G_nQHjEO9qyUpxQFOXQA.jpg) (Stand: 22.04.2013)

## 8. Danksagung

Zu allererst möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. Rupert Schmidt danken, dafür dass er mir die Möglichkeit gegeben hat meine Doktorarbeit in seinem Labor anzufertigen, für die hilfreichen Diskussionen und Kommentare, sowohl zu theoretischen, als auch praktischen Fragestellungen.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Trenczek, die das zweite Gutachten zu dieser Arbeit angefertigt hat.

Ganz besonderer Dank gilt allen, die an diesem Projekt mitgearbeitet und mich unterstützt haben: Petra Bepler-Kranert, Christiane Happel, Gabi Scheller und Gerd Weigand für die unzählige praktische Unterstützung. Roman Göthe, Florian Kreul und Donato Penninella für fruchtbare Diskussionen. Auch allen Ehemaligen, die mich auf einem Abschnitt meines Weges begleitet haben, möchte ich danken. Alle zusammen haben ihren Teil dazu beigetragen, dass mir eine einmalig angenehme Arbeitsatmosphäre in Erinnerung bleiben wird.

Auch meinen Freunden und Bekannten möchte ich danken. Durch die zahlreichen Aufmunterungen bin ich auch dann noch motiviert und gerne ins Labor gegangen, wenn die Zeiten anstrengend und weniger erfolgreich waren.

Meiner Freundin Eva möchte ich ganz besonders danken, dafür dass ich in ihrer Unterstützung immer sicher sein konnte, in guten wie in schwierigen Zeiten.

Und nicht zuletzt meinen Eltern Roy und Inge bin ich unendlich dankbar. Ohne ihre liebevolle und unbedingte Unterstützung wäre es niemals möglich gewesen, diese Arbeit anzufertigen. Danke.



## 9. Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder Sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

---

Gießen, 29.04.2013

David Hinchliffe