

Das Lernen von Mensch und Tier kann auf verschiedenen Untersuchungsebenen beschrieben werden: Verhaltensbiologen beobachten das Lernen unter natürlichen Bedingungen und in der speziellen Laborsituation von Training und Test (siehe Abbildung 1 auf Seite 83). Neuroanatomen versuchen festzulegen, welche Hirngewebe sich auf welche Gedächtnis-

leistungen spezialisiert haben. Neuropathologen korrelieren Lernstörungen mit lokalisierten Gehirnerkrankungen. Physiologen studieren Mechanismen, die dafür verantwortlich sind, daß natürliche Reize in Sinnesorganen zu Erregungen der Nervenzellen umgewandelt, zum Gehirn weitergeleitet, dort analysiert und mit Befehlen an Muskel- und Drüsenzellen beantwortet werden.

Biochemiker und Zellbiologen sind bemüht, die molekularen und zellulären Voraussetzungen plastischer Veränderungen im Nervensystem zu identifizieren. Die multidisziplinäre Fragestellung erfordert die Zusammenarbeit verschiedener Fachleute und darüber hinaus experimentelle Möglichkeiten mit recht unterschiedlichen – und zum Teil teuren – Apparaturen, Rahmenbedingungen, die

Was lernen wir daraus, wie Fische lernen?

Wie aus Erfahrungen Gedächtnisinhalte werden



Wer Haustiere hält oder Tiere in der „freien“ Natur beobachtet, ist oft von ihren Lern- und Gedächtnisleistungen überrascht. Dem steht die ernüchternde Erfahrung gegenüber, wie häufig menschliches Lernvermögen und Gedächtnis versagen, und wie anfällig sie oft im Alter oder durch Krankheit werden. Können wir durch gezielte Beobachtungen an Tieren verstehen, auf welchen Mechanismen Lernen und Gedächtnisbildung beruhen?

an der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit der Universität Gießen gegeben sind.

Wie lernt ein Tier?

Vielleicht denken wir zuerst an die adressierten Kunststücke von Haus- und Zirkustieren – aber die sind zu schwer zu reproduzieren und für eine detaillierte Analyse kaum geeignet. Der Verhaltensbiologe sucht vielmehr nach modellhaften Lernsituationen, sogenannten



Rupert Schmidt ist überzeugt, daß sich auch komplexe Gehirnfunktionen naturwissenschaftlich beschreiben und verstehen lassen, wenn man bereit ist, seine Forschungsmethoden interdisziplinär zu kombinieren. Nach dem Studium der Chemie, Biologie und Medizin in Mainz, Göttingen und Marburg lag für ihn ein besonderer Reiz in der Kombination von Verhaltensbeobachtung mit molekularer und zellbiologischer Analyse. Er arbeitete am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen, an einem psychiatrischen Krankenhaus in den USA, an der Harvard University, der Anatomie der Universität Marburg, der Zoologie (Neurochemie) im Frankfurter Biozentrum und der Tierphysiologie an der RWTH Aachen. Seit einem Jahr leitet er die interdisziplinär ausgerichtete Zentrale Biotechnische Betriebseinheit der Universität Gießen.

Lernparadigmen, die im Labor standardisiert eingesetzt werden können. Ein gutes Beispiel ist die klassische Konditionierung: So wie ein Haushund schnell lernt, daß auf das rasselnde Geräusch des Schlüsselbundes der ersehnte Spaziergang folgt, merkt sich ein Fisch, wenn nach einem Lichtsignal (konditionierter Reiz) regelmäßig ein schwacher Stromstoß über Elektroden im Wasser verabreicht wird (siehe Kasten rechts), und er lernt, dieser Bestrafung durch rechtzeitiges Davonschwimmen in den unbeleuchteten Teil des Aquariums zu entgehen (konditionierte Meidereaktion in der Wechselkammer). Wird dieser Fisch drei Tage später erneut in das Trainingsbecken eingesetzt (Testphase des Experiments), so erinnert er sich an das gelernte Meideverhalten und schwimmt schon nach Anschalten des Lichtsignals in die sichere Hälfte der Apparatur.

Wie lernt ein Gehirn?

Der Neurobiologe behauptet, daß sich in der Zeit zwischen Training und Test etwas im Gehirn des Versuchstieres verändert haben müsse. Aber kann er das auch nachweisen?

Seit hundert Jahren weiß man, daß auch das Gehirngewebe aus Zellen aufgebaut ist. Die Nervenzellen (Neurone) der Wirbeltiere besitzen lange faserförmige Fortsätze (Axone), über die sie Nachrichten kodiert in Form elektrischer Impulsfolgen unter anderem an kürzere Zellausläufer (Dendriten) anderer Nervenzellen weitergeben. Die Kontaktstellen, an denen Axone und Dendriten aufeinandertreffen, nennt man Synapsen ($\sigma\nu\nu$ = zusammen; $\acute{\alpha}\pi\tau\epsilon\iota\nu$ = heften). Sie sind der Angelpunkt moderner Theorien über das Lernen und das Gedächtnis, denn Synapsen sind erstaunlich variabel und plastisch:

1. Während der Individualentwicklung werden zahlreiche Synapsen auf- und abgebaut (das menschliche Gehirn enthält zum Beispiel mehr als 100 000 000 000 000).

2. An Wirbeltiersynapsen wird die elektrisch kodierte Information in der Regel in ein chemisches Signal (den Botenstoff oder Neurotransmitter) überführt, das von der axonalen Endigung freigesetzt wird.

3. Der Botenstoff kann sich an Er-

kennungsmoleküle (Rezeptormoleküle) in den Membranen nachgeschalteter Neurone anlagern und dadurch Reaktionen auslösen, die elektrische Eigenschaften dieser (postsynaptischen) Membranen verändern. So wird die elektrische Erregung von einer Nervenzelle auf die andere übertragen.

4. Reaktionsmechanismen zur Freisetzung der Botenstoffe und Folgeprozesse an den Rezeptoren können durch Drogen (Pharmaka und Genußgifte) beeinflusst werden.

5. Das Übertragungsverhalten von Synapsen kann sich auch durch wiederholte Aktivierung ändern, ähnlich wie ein Muskel durch häufigen

Gebrauch leistungsfähiger wird.

Daraus folgen zentrale Fragestellungen der Lern- und Gedächtnisforschung:

- Werden Synapsen beim Lernen effektiver?
- Werden beim Lernen zusätzliche Synapsen gebildet?
- Verändern Synapsen beim Lernen ihre Kooperativität?

Lernen wir durch Moleküle?

Die bahnbrechenden Fortschritte der Molekularbiologie in der Mitte unseres Jahrhunderts führten zu der Hypothese, daß das Gedächtnis auf einem chemischen Speichermechanismus beruhen könnte. In einer

Wir lernen in Phasen

Anscheinend läuft im Gehirn ein mehrphasiger Prozeß ab: Zunächst wird gelernt, und erst danach wird entschieden, was aus dem sogenannten Kurzzeitgedächtnis dauerhaft in das Langzeitgedächtnis übernommen wird. Diesen Prozeß bezeichnet man als Gedächtniskonsolidierung.

Zu den Mechanismen des Kurzzeitgedächtnisses gehören vermehrte Transmitterbildung an Synapsen, erhöhter Einbau von Rezeptormolekülen, Phosphorylierungen von Membranproteinen sowie intrazelluläre Signalkaskaden. Aber diese chemischen Bestandteile des Gehirns unterliegen einem schnellen Umsatz, und die induzierten Veränderungen sind vorübergehender Natur. Nur synaptische Strukturen und Konnektivitäten sind stabil genug für das Langzeitgedächtnis, dessen Mechanismen bisher viel weniger verstanden sind, obwohl gerade sie angesichts der steigenden Lebenserwartung immer wichtiger werden.

Die semantische Bedeutung der gespeicherten Information ist in den synaptischen Konnektivitäten kodiert. Die Eingangskanäle bestimmen, was ein Neuron verarbeiten kann. Das einzelne Neuron kann aber an der Prozessierung vieler verschiedener Informationen beteiligt sein, und verschiedene Aspekte einer Wahrnehmung (z.B. die Form, Geschwindigkeit und Farbe eines Objektes) werden in verschiedenen Gehirngebieten gespeichert. Die temporären neuronalen Erregungen werden teilweise als wieder auffindbare Gedächtnisspur (Engramm) festgeschrieben, weil die Erregbarkeit der beteiligten Neurone durch Bildung (und Abbau) neuer Synapsen oder durch eine bleibende Veränderung in der Übertragungseffizienz schon bestehender Synapsen dauerhaft verändert wird. Für solche Konsolidierungsprozesse an Synapsen sind Eiweißmoleküle erforderlich, die (durch Transkriptionsfaktoren induziert werden und dann) in prä- oder postsynaptische Membranen eingebaut werden. Es leuchtet daher ein, daß die Hemmung der Proteinbiosynthese die Gedächtniskonsolidierung verhindern kann. Die beteiligten Proteine können jedoch zunächst in einem anderen Kontext, zum Beispiel im Zusammenhang der Individualentwicklung, entstanden und erst später in den Funktionskreis der Verhaltensplastizität eingegliedert worden sein. Kann man die beteiligten Proteine identifizieren?

Fische, die lernen

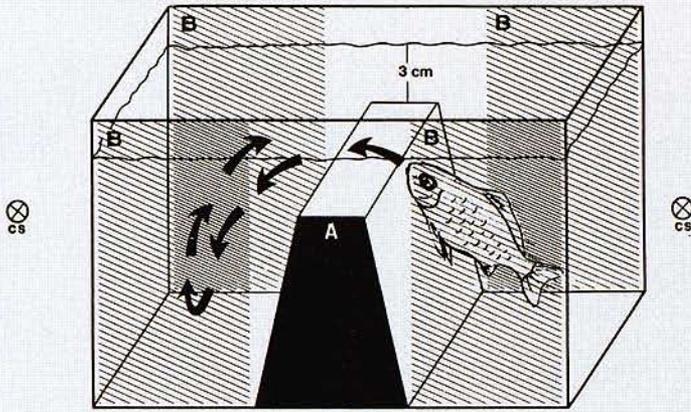


Abbildung 1:

In einer klassischen Meidekonditionierung müssen Goldfische lernen, nach Aufleuchten eines Lichtsignals (CS) über eine Hürde (A) hinweg in die jeweils unbeleuchtete Hälfte einer sogenannten Wechselkammer zu schwimmen, um einen Elektroschock zu meiden, der sonst über Elektroden (B) verabreicht wird. Jede Minute wechselt das Licht auf die andere Seite des Beckens. Lernkurven zeigen nach 20 Minuten im Mittel 80% richtige Verhaltensantworten (vgl. Abbildung rechts).

Welche Proteine sind beteiligt?

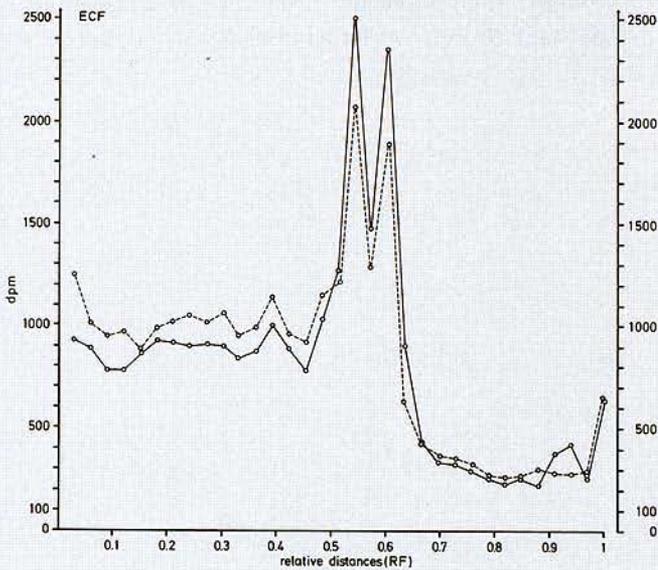


Abbildung 3:

Will man wissen, welche Proteine (= Eiweißstoffe) am Lernen beteiligt sind, kann man dem Goldfisch radioaktiv markierte Aminosäuren als Vorstufen der Proteinsynthese ins Gehirn injizieren. Die gebildeten Proteine werden später in elektrischen Feldern nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (x-Achse von links nach rechts). Wird als Folge des Lernens mehr von einem Protein gebildet (durchgezogene Linie), dann lagert es auch mehr von der radioaktiven Aminosäure ein (Spitzen).

dpm = radioaktive Zerfälle des Proteins pro Minute.

Fische, die sich (nicht) erinnern

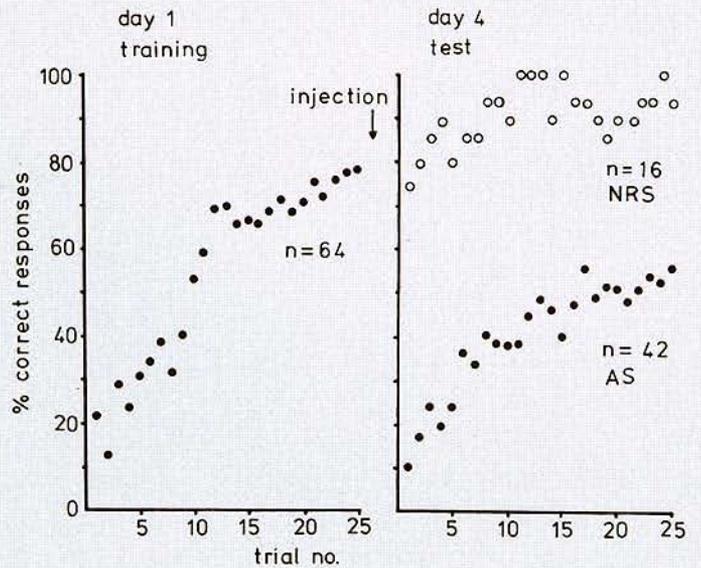


Abbildung 2:

Nach dem Lernen (links) ist das Erinnerungsvermögen im Test (drei Tage später, rechts) gut, selbst wenn die Fische mit Neutralserum (NRS, offene Kreise) injiziert wurden. Wenn aber ein bestimmtes Eiweiß, das Ependymin, aus der Extrazellulärflüssigkeit des Gehirns mit Antikörpern weggefangen wird, können sie sich im Test zunächst nicht erinnern. Sie müssen neu lernen, weil die Gedächtnisbildung gestört wurde (AS, geschlossene Kreise).

Wandlungsfähige Moleküle

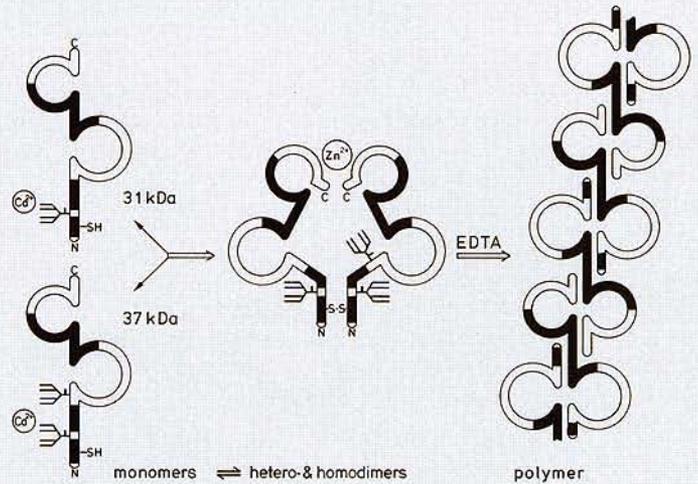


Abbildung 4:

Abgeleitete Struktur der Ependymine. Variable Regionen der Primärstruktur (Aminosäuresequenz) sind schwarz wiedergegeben, konservierte Regionen weiß. Links: Monomere von 31 bzw. 37 kDa besitzen eine bzw. zwei N-glycosidisch gebundene Kohlenhydratseitenketten (kleine „Bäumchen“) und mindestens ein HNK-1-Epitop. Ependymine binden Calcium (Ca^{2+}) an ihre Kohlenhydratketten. Mitte: Ependymin-Untereinheiten bilden durch Schwefelbrücken Homo- und Heterodimere, die durch Zinkkationen (Zn^{2+}) stabilisiert werden. Rechts: Polymerisation von Ependyminen nach Entfernung der Metallkationen durch EDTA.

Zeit, in der zahlreiche neue Botenstoffe entdeckt wurden, lag es nahe anzunehmen, daß vielleicht jede erlernte Information durch eine spezifische chemische Substanz, zum Beispiel ein definiertes Fett-, Eiweiß- oder Säuremolekül im Gehirn repräsentiert werden könnte. Schließlich ist ja auch die Erbinformation in der genauen Zusammensetzung von Säuren (Desoxyribonukleinsäuren) kodiert gespeichert.

Der Triumph war zunächst groß, als mit Experimenten an Goldfischen und Mäusen gezeigt werden konnte, daß trotz erfolgreichem Lernen keine anhaltende Erinnerung an das neu Gelernte möglich war, wenn ihnen bis zu Stunden nach dem Verhaltenstraining Substanzen injiziert wurden, welche die Synthese von Eiweißmolekülen (Proteinen) im Gehirn verhindern. Was schon lange zuvor erlernt worden war, wurde durch solche Gifte nicht beeinflusst. Damit schien ein alter Traum in Erfüllung zu gehen: Wenn es gelänge, die richtigen Eiweißmoleküle zu identifizieren und diese Proteine künstlich herzustellen, könnte man sie dann nicht „einfach“ in das Gehirn injizieren, und so die langjährigen Bemühungen der Lehrer und Studenten auf eine kurze Behandlung reduzieren? Sollte man die Gehirne verstorbener Gelehrter aufar-

beiten, um deren Wissen von ihren unterbewußten Neigungen zu separieren? War man daran, die molekularbiologische Variante eines Nürnberger Trichters zu entwickeln?

Aber der Triumph war von kurzer Dauer: Die ersten nach Lernversuchen an Ratten isolierten Peptide (~ kleine Proteine) wurden bald als Analoga natürlicher Hormone entlarvt, die nach Injektion zwar das Verhalten der Versuchstiere beeinflussen, aber kein Wissen übertragen konnten. Der Befund, daß Inhibitoren der Proteinbiosynthese mit der Gedächtnisbildung nach dem Lernen interferieren, blieb zunächst unverständlich.

Wie findet man die beteiligten Proteine?

Um jene Proteine zu identifizieren, die zur Gedächtnisbildung notwendig und hinreichend sind und deren Umsatz zum Zeitablauf der sogenannten Gedächtniskonsolidierung paßt (siehe Kasten auf Seite 82), bedient man sich der Tatsache, daß Proteine nur aus bestimmten Vorstufen, den Aminosäuren, aufgebaut werden. Aminosäuren enthalten unter anderem Wasserstoff- und Kohlenstoffatome. Deshalb kann man einen einfachen Trick anwenden: Man injiziert dem Versuchstier, zum Beispiel einem Goldfisch, der

gerade das Meideverhalten erlernt hat (siehe Abbildung 3 auf Seite 83), eine Aminosäure, in welcher der Wasserstoff durch radioaktiven Wasserstoff (Tritium) ersetzt ist. Diejenigen Goldfische, die es – aus welchen Gründen auch immer – nicht geschafft haben, die Meidereaktion zu erlernen, bekommen stattdessen eine Aminosäure in das Gehirn injiziert, in der normaler Kohlenstoff

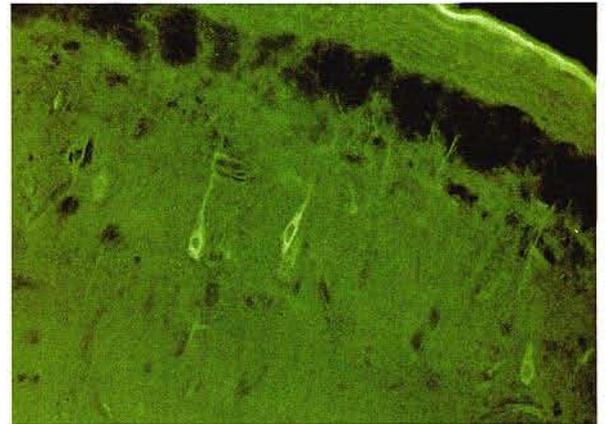


Abbildung 5: Gehirnspezifische Proteine. Ein dünnes Scheibchen wurde aus einem Fischgehirn herausgeschnitten und mit einer Lösung von Antikörpern gegen Ependymin behandelt, die durch chemische Modifizierung so verändert wurden, daß sie fluoreszieren (Sekundärantikörpertechnik). Überall dort, wo sich Ependyminmoleküle im Gehirn befinden, bindet jetzt der anti-Ependymin-Antikörper. Die Hirnhaut (oben rechts) und Typ-I-Neurone leuchten daher grün auf. Die Lage des Scheibchens in einem wichtigen Reflexzentrum, dem Tectum, ist in Abbildung 6 rot eingezeichnet.

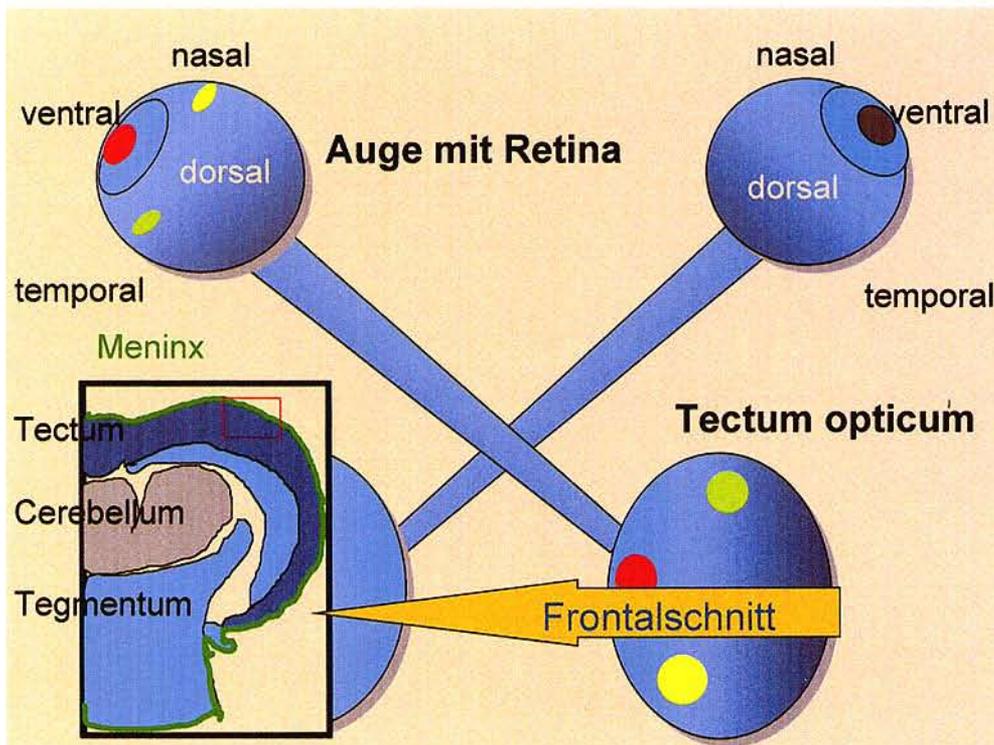


Abbildung 6: Projektion vom Auge ins Gehirn. Im Knochenfisch kreuzt der Sehnerv vollständig und erreicht ein Mittelhirngebiet, das Tectum, der anderen Körperseite. Der Faserverlauf folgt dabei strengen Regeln: Zum Beispiel projizieren die Fasern von den nasalten Retinabereichen in das caudale Tectum, die temporalen in das rostrale Tectum usw. Das Fisch-Tectum proliferiert zeitlich an seinem caudalen Rand. Retinale Ganglienzellen werden dagegen konzentrisch außen nachgebildet. Um die retinotectale Zuordnung beizubehalten, müssen deshalb in der Individualentwicklung ständig Synapsen aufgelöst und neu gebildet werden.



Gabriele Pradel hat in ihrer Doktorarbeit mit Untersuchungen zur Beteiligung verschiedener Zelladhäsionsmoleküle an der Gedächtnisbildung nachgewiesen, daß die Ependymine kein Sonderfall sind. Frau Pradels Versuchstier ist ein Verwandter des Goldfisches, der Zebraäbrbling. „Zebraäbrlinge haben Vorteile,“ sagt sie, „denn ihre Erbsubstanz ist molekular weitgehend beschrieben, so daß bald transgene Fische für Untersuchungen zur Verfügung stehen werden.“

durch ein radioaktives Isotop (C-14) ausgetauscht wurde. Die radioaktiven Vorstufen werden ebenso in Proteine eingebaut, wie die natürlichen Aminosäuren. Aus den Gehirnen beider Tiergruppen werden dann die Proteine mit gängigen, biochemischen Methoden (Affinitätschromatographie, Fällungen, Molekularsiebfiltrationen usw.) isoliert. Schließlich werden die Proteine in starken elektrischen Spannungsfeldern nach ihrer Größe sortiert. Mit speziellen Geräten kann gemessen werden, wieviel Tritium und wieviel radioaktiven Kohlenstoff sie enthalten. Proteine, die mehr Tritium als Kohlenstoff-14 eingebaut haben, müssen nach dem Lernen bevorzugt synthetisiert worden sein (siehe Abbildung 3 auf Seite 83).

Es sind zwei kleine, lösliche Proteine (der Masse 31 bzw. 37 kDa), die deutlich verstärkt im Goldfischgehirn gebildet werden, nicht nur nach der Meidekonditionierung in der Wechselkammer, sondern auch nach ganz anderen Lernparadigmen. Da diese Proteine also nicht für einen bestimmten Lernprozeß charakteristisch sind, können sie auch nicht die „semantische“ Bedeutung des Gelernten kodieren. Sie sind vielmehr an biochemischen Mechanismen nach verschiedenen Lernaufgaben beteiligt und immer im Fischgehirn anzutreffen.

Wo findet man die Proteine?

Wenn ein Biochemiker seinen Ehrgeiz verwirklicht hat, ein zu 95% reines Protein in Händen zu halten, kann er einen weiteren Trick der Natur nutzen: Er injiziert das Protein zum Beispiel einem Kaninchen. Dessen Körper wehrt sich gegen das artfremde Eiweiß, indem er Abwehrstoffe, auch Antikörper oder Immunglobuline genannt, gegen das Protein bildet, die dann im Blut des Kaninchens zirkulieren. Man kann sie aus dem Serum isolieren. Immunglobuline besitzen die Fähigkeit, die ursprünglich injizierten Proteine selektiv zu erkennen, und sie gehen stabile chemische Bindungen mit ihnen ein. Diese Eigenschaft kann selbst dann erhalten bleiben, wenn an die Immunglobuline ein Farbstoff gekoppelt wird, der in blauem Licht grün fluoresziert.

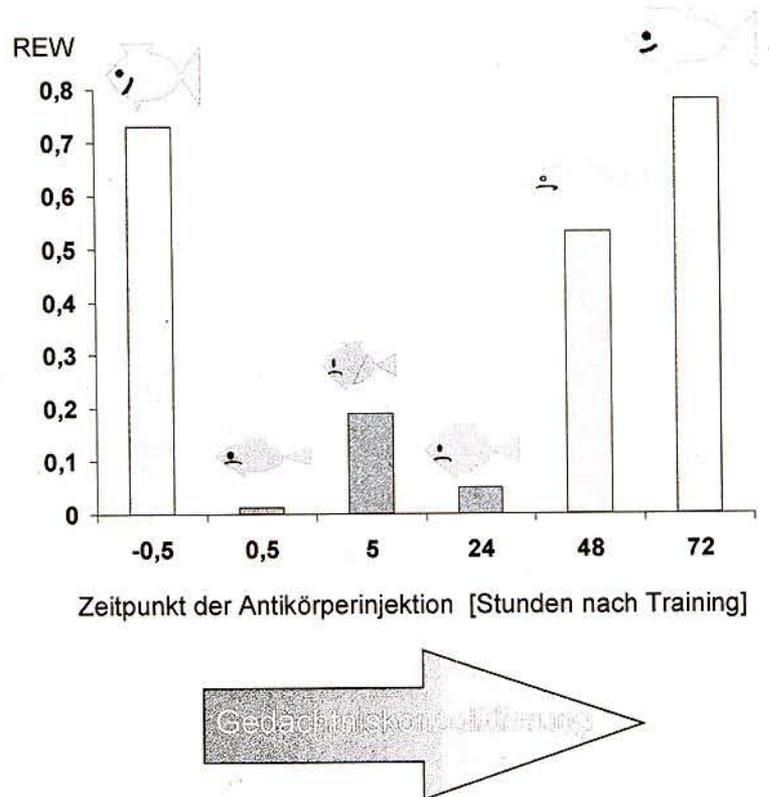


Abbildung 7: Gedächtnislücken nach Zeitplan. Goldfische wurden in der Wechselkammer konditioniert und zu unterschiedlichen Zeiten vor (-0,5 Stunden) bzw. nach (0,5 bis 72 Stunden) dem Training mit anti-Ependymin in die Hirnventrikel injiziert. Gegen diesen Injektionszeitpunkt ist der mittlere relative Erinnerungswert (REW) aufgetragen. Er setzt mit einem Algorithmus die Zahl der Fehler im Test- und im Trainingsdurchlauf zueinander in Beziehung. Erinnert sich ein Fisch im Test sofort, so wird sein REW = 1. REW wird 0, wenn der Fisch im Test nicht erfolgreicher ist, als im Training. Ob es zur Amnesie kommt, hängt also vom Zeitpunkt der anti-Ependymin-Injektion ab.

Behandelt man ein dünnes Scheibchen eines Fischgehirns mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Proteine, welche nach dem Lernen verstärkt synthetisiert werden, dann werden sie an jene Stellen gebunden, an denen sich die untersuchten Proteine befinden (siehe Abbildung 5 auf Seite 85). Wer sich in der Anatomie eines Fischgehirns zurechtfindet, kann nun unter spezieller Beleuchtung im Fluoreszenzmikroskop erkennen, an und in welchen Zellgruppen die untersuchten Proteine auftreten. Erstaunlicherweise wurden die beiden Proteine in denselben Zellpopulationen aufgespürt: In der Hirnhaut, in bestimmten Neuronenklassen und in der ependymalen Zone um die Hirnventrikel. Weil sie hier durch Shashoua und Mitarbeiter an der Harvard Medical School

zuerst nachgewiesen worden waren, wurden sie „Ependymine“ genannt. Später konnten wir zeigen, daß die beiden Proteine (Glycosylierungs-) Varianten desselben Ependyminmoleküls sind (Abbildung 4 und Kasten auf Seite 89).

Werden die mikroskopischen Schnitte von Goldfischen hergestellt, die kurz nach dem Vermeidungslernen getötet wurden, so erkennt man mehr Ependymin in der Hirnhaut. Vier Stunden später ist die Anfärbung vermehrt an Nervenzellen in einem zentralen Reflexzentrum des Fischgehirns zu beobachten, dem optischen Tectum. Wir haben immunchemische Meßverfahren entwickelt, mit denen kleine Konzentrationsänderungen des Ependymins bestimmt werden konnten (10^{-15} mol in RIAs und ELISAs): Auf den vor-



Juliane Hohmann hat eine zoologische Diplomarbeit an der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit begonnen. Sie untersucht, ob mit der Immun-Elektronenmikroskopie nach Lernversuchen Zelladhäsionsmoleküle verstärkt an den funktionellen Kontaktzonen zwischen Nervenzellen, den sogenannten Synapsen, nachgewiesen werden können.

übergehenden Anstieg der zellulären Ependymkonzentration nach dem Lernen folgt eine signifikant erhöhte Sekretion in die Extrazellulärflüssigkeit des Gehirns, die erst acht Stunden nach verschiedenen Lernaufgaben ihr Maximum erreicht.

Ursache oder Folge?

Die Befunde einer spezifischen Syntheseleistung und Umverteilung erlaubten aber noch keine Aussage über eine funktionelle Bedeutung des Proteins. Messen wir vielleicht nur das Epiphänomen eines durch die Lernsituation veränderten Stoffwechsels? Oder wird Ependymin für das Lernen und Gedächtnis in Fischen benötigt?

Wir haben versucht, Ependymin durch Injektion von Antikörpern aus der Extrazellulärflüssigkeit des Gehirns wegzufangen und dadurch das Lernen zu blockieren. Als Kontrolle sollten Fische dienen, denen die Antikörper erst nach dem Lernen über die Hirnventrikel verabreicht wurden.

Das Experiment ergab ein unerwartetes Ergebnis: Vor dem Training injizierte Fische konnten normal lernen und sich im Test erinnern. Wurden die Antikörper jedoch nach dem Lernen appliziert, so konnten sich diese Fische im Verhaltenstest nicht erinnern (siehe Abbildung 2 und 7).

Durch Variation des Injektionszeitpunktes konnte Marie Piront, eine Doktorandin unserer Arbeitsgruppe, nachweisen, daß das Ependymin weder beim Lernen, noch beim Kurzzeitgedächtnis, noch bei der Erinnerungsleistung der Goldfische involviert ist; es ist aber für die Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses erforderlich und zwar nach unterschiedlichen Lernparadigmen. Offen blieb zunächst, an welchem physiologischen Elementarprozeß es beteiligt ist.

Wirkt hier ein Relikt aus der Entwicklung?

Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen (siehe Abbildung 4 und Kasten auf Seite 89) ergaben, daß Ependymin mit Zelladhäsionsmolekülen verwandt ist.

Homologe Proteine wurden in vielen Fischfamilien nachgewiesen. Auch im embryonalen Säugetiergehirn tritt ein immunologisch verwandtes Protein in geringer Menge auf. Allerdings gelang es bisher nicht, ein Ependymin-Gen im Säugetier zu identifizieren.

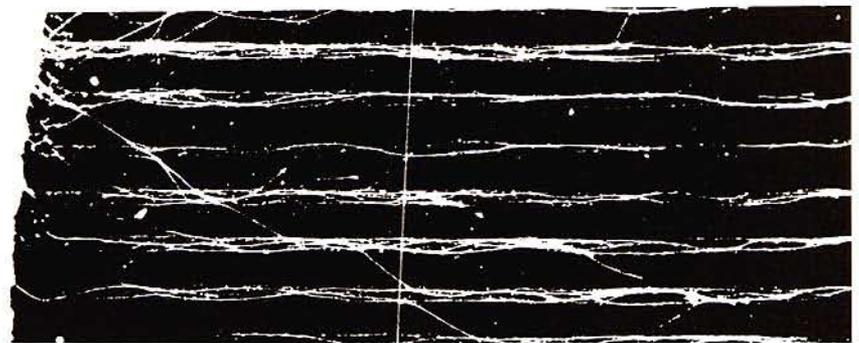
Die Netzhaut (Retina) des Wirbeltierauges entwickelt sich aus Gehirngewebe. Ihre Nervenzellen teilen sich noch im adulten Knochenfisch, und ihre Axone können regenerieren. Das gelingt sogar an isolierten Retinae in Kultur („in vitro“). Um zu testen, ob Ependymin Zelladhäsionseigenschaften für Nervenzellen besitzt, wurde die Netzhaut von Goldfischen auf Glasplättchen explantiert, auf die zuvor Ependymin in Form feiner Streifen aufgetragen worden war. Tatsächlich wuchsen die regenerierenden Axone der Retina in die Ependyminstreifen hinein (siehe Abbildung unten). Ependymin ist also ein Adhäsionsmolekül, das in vitro zentrale Axone dirigieren kann.

Auch am lebenden Fisch bleiben

Netzhaut und Gehirn plastisch: Sinesindrücke werden von Knochenfischen überwiegend im Tectum verarbeitet und mit Reflexen beantwortet. Es ist bekannt, auf welche Neurone verschiedene Sinnesmodalitäten projizieren. Zum Beispiel kreuzt der Sehnerv vollständig, und es besteht eine streng retinotopische Projektion: Dabei verlaufen die Fasern von benachbarten nasalen Retinabereichen zu benachbarten Regionen im caudalen Tectum, jene von der temporalen Retina in das rostrale Tectum usw. (siehe Abbildung 6).

Durchtrennt man den Sehnerv beim adulten Goldfisch, so werden die Axone aus der Retina zunächst abgebaut. Danach regenerieren sie und finden wieder den Weg in ihr altes Innervationsgebiet. Wenn sie es etwa drei Wochen nach der Verletzung fast erreicht haben, steigt die Ependyminsynthese an.

Der Fisch kann dann aber noch nicht scharf sehen, denn die Nervenzellen im Mittelhirn antworten noch auf Lichtreize, die aus einem unphysiologisch großen Blickwinkel stammen. In den folgenden Wochen verschärfen sich die rezeptiven Felder durch die lichtinduzierte, synchrone Aktivität in benachbarten Axonen auf den physiologischen Wert unverletzter Tiere. John Schmidt in Albany hat gezeigt, daß diese Verschärfung der rezeptiven Felder unterbleibt, wenn Goldfischen nach



→
200 µm

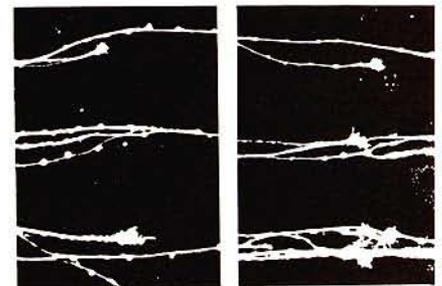


Abbildung 8: Axone wachsen auf Ependymin. Wachstum retinaler Ganglionzellaxone auf Ependymin in vitro. Goldfisch-Retinae wurden explantiert und bilden auf Glasplättchen regenerierende Axone, die bevorzugt in Ependymin/Laminin-Gemische einwachsen. Im unteren Teil der Abbildung sieht man die Wachstumspitzen dieser von links einwachsenden Zellausläufer bei höherer Vergrößerung. (Experimente in Zusammenarbeit mit John Schmidt, Albany, und Claudia Stürmer, Konstanz)

Über Proteininduktion...

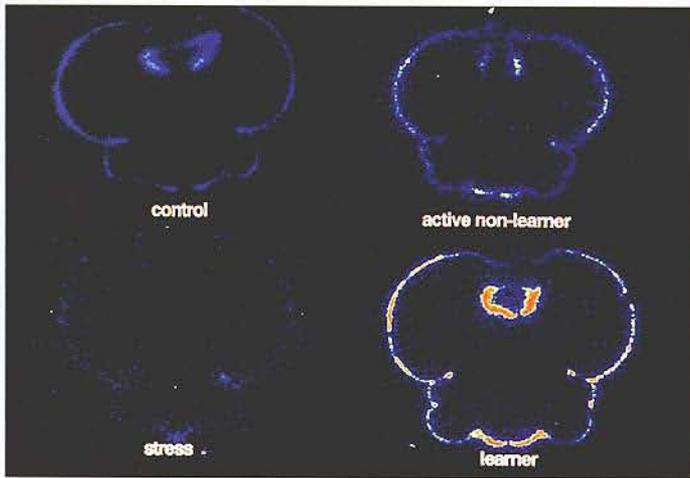


Abbildung 9:

Zur Synthese von Proteinen wird in den Zellen des Organismus zunächst eine mRNA-Kopie der Erbinformation hergestellt. Sie kann mit radioaktiv markierten Oligodesoxynucleotid-Sonden sichtbar gemacht werden. Diese autoradiographische Darstellung zeigt die Ependymin-mRNA in Frontalschnitten durch Goldfischgehirne. Ein kurz zuvor konditionierter Fisch (unten rechts) zeigt mehr Ependymin-mRNA als ein nicht trainierter Fisch (oben links). Links unten als Streßkontrolle ein Fisch, der den Licht- und Strafreizen in stochastischer Folge ausgesetzt wurde. Das Autoradiogramm rechts oben stammt von einem übertrainierten Tier, das die Meidereaktion schon lange zuvor erlernt hatte.

...und Membranbindung...

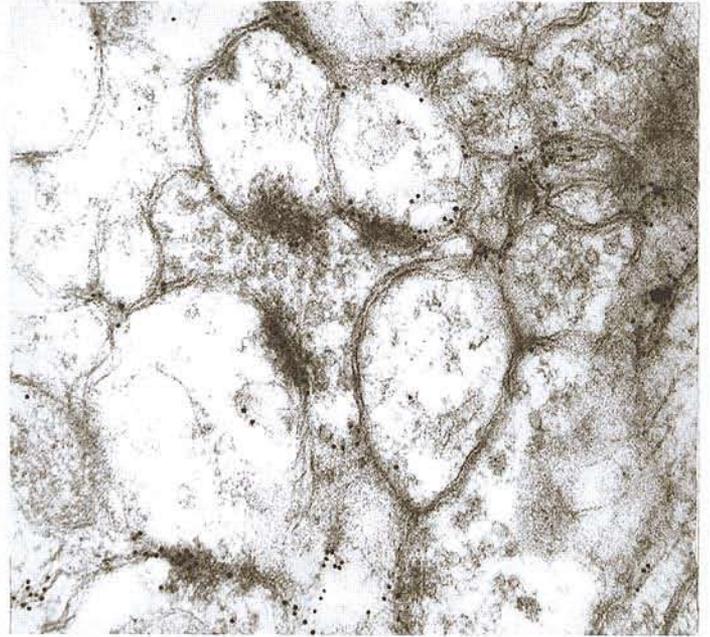


Abbildung 10:

Obwohl das Ependymin in Fibroblasten der Hirnhaut hergestellt wird, findet man es an spezifischen Nervenzellen wieder. Hier werden Ependyminmoleküle im Elektronenmikroskop durch Antikörper detektiert, die mit kleinen Goldkugeln (schwarze Punkte) beladen sind. Man erkennt das Protein an Synapsen, die optische Fasern und Marginalfasern mit den Typ-I-Neuronen in einem wichtigen Reflexzentrum (Tectum) des Fischgehirns bilden. Die Typ-I-Neurone können Erregungen integrieren, die für die Meidekkonditionierung in der Wechselkammer essentiell sind. Eine zentrale Frage ist daher, ob die Zelladhäsionseigenschaften der Ependymine diese Synapsen bei der Gedächtnisbildung nach dem Lernen verändern.

...zur neuronalen Konnektivität

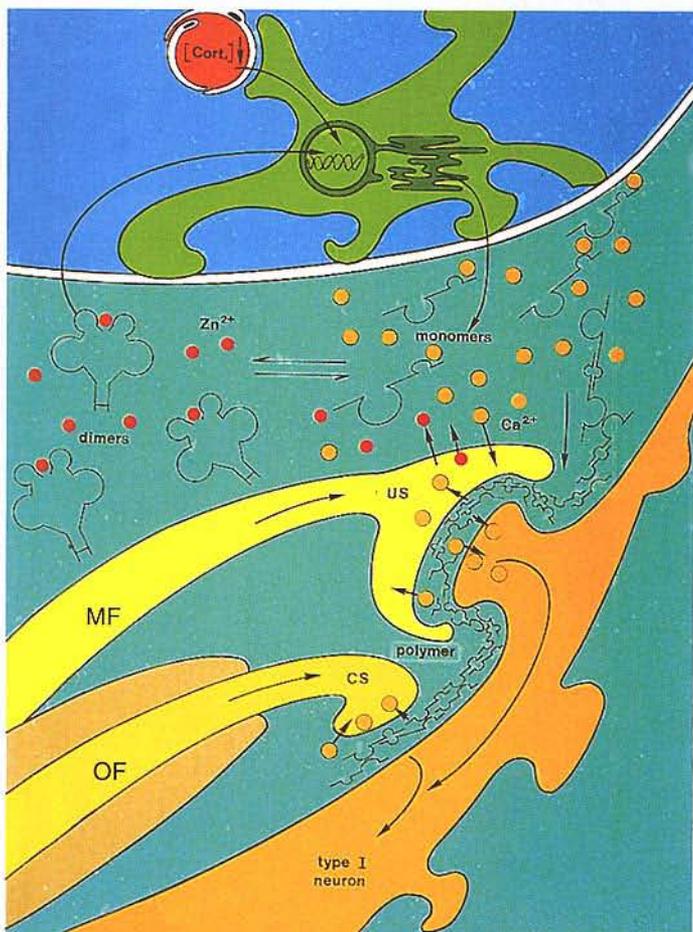


Abbildung 11:

Hypothese zur Gedächtniskonsolidierung mit zwei Regelkreisen. Oben: Streßhormone (Cortisol u.a.) regulieren die Synthese des sekretorischen Zelladhäsionsmoleküls Ependymin in Fibroblasten (grün) der Hirnhaut. Unten: Veränderungen der Konzentration von Metallkationen (Ca^{2+} , Zn^{2+}) in der Mikroumgebung von Neuronen (gelb), die in der vorangegangenen Lernphase aktiviert wurden, führen zur Ablagerung des Ependymins an jenen Synapsen der Typ-I-Neuronen, die bei der Gedächtniskonsolidierung stabilisiert werden müssen. CS, Erregung durch den konditionierten Stimulus über die optische Faser; MF, Marginalfaser; OF, optische Faser; US, Erregung durch den unkonditionierten Stimulus über die Marginalfaser.

Durchtrennung des Sehnerven anti-Ependymin-Antikörper in das Gehirn infundiert werden. Sie „lernen“ also nicht mehr, scharf zu sehen.

Vielleicht war das Ependymin in der Evolutionsgeschichte ursprünglich an der synaptischen Feinabstimmung während der Individualentwicklung und bei Regenerationsprozessen beteiligt, ehe die hierbei eingesetzten Zelladhäsionsmechanismen auf andere Funktionen der verhaltensinduzierten neuronalen Plastizität übertragen wurden?

Eine solche Spekulation fiel lange Zeit auf wenig Gegenliebe. Kürzlich hat Gabriele Pradel in ihrer Doktorarbeit aber zeigen können, daß auch weitere Zelladhäsionsmoleküle (L1.1 und NCAM) im nahe verwandten Zebraquariabild an der Gedächtnisbildung beteiligt sind. Von anderen Arbeitsgruppen wurden in den letzten drei Jahren vergleichbare Befunde an Säugetieren und Vögeln erhoben.

Wo werden die Proteine gebildet?

Um ein Protein zu synthetisieren, wird im Organismus in einem ersten Schritt die zugehörige Erbinformation abgelesen und in eine Matrize (die mRNA) umgeschrieben. Diese mRNA läßt sich mit molekularbiologischen Sonden nachweisen, so daß der Ort der Proteinsynthese bekannt wird. Obwohl das Ependymin in verschiedenen Zellpopulationen auftritt, konnte seine Synthese ausschließlich in der weichen Hirnhaut dokumentiert werden (Abbildung 9). Im Elektronenmikroskop sieht man durch Einsatz von Antikörpern, an die kleine Goldkügelchen gebunden sind (für die Detektion ersetzen sie im Elektronenmikroskop den Fluoreszenzfarbstoff der Lichtmikroskopie), daß Ependymin in markanten, krakenförmigen Fibroblasten der Endomeninx gebildet wird. Diese Fibroblasten sind jenen der Säuger-Arachnoidea homolog und für ihre sekretorische Aktivität bekannt.

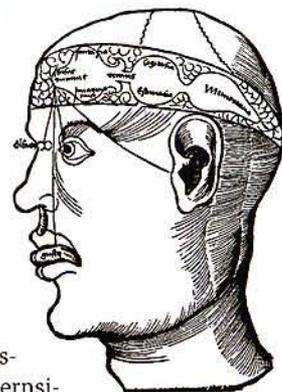
Die Expression der Ependymin-mRNA wurde auch nach Lernexperimenten untersucht. Im Vergleich zu nicht trainierten und zu trainierten, aber nicht lernenden, Kontrollen ergab sich ein spektakulärer Anstieg der Ependymin-mRNA nach dem Lernen (Abbildung 9). Verzö-

gert nach der mRNA steigt die Konzentration des Proteins zunächst in den Zellen und dann nach Sekretion auch in der Extrazellulärflüssigkeit des Gehirns an. Durch negative Rückkoppelung fällt die mRNA später wieder ab, wenn die Menge an extrazellulär zirkulierendem Ependymin steigt.

Stefan Rother, der die mRNA-Expression in unserem Labor untersuchte, hat noch einen weiteren Zusammenhang aufgespürt: „Streßt“ man den Fisch durch eine stochastische Folge von Lichtreizen und Elektroschocks, dann fällt die mRNA-Expression vorübergehend noch unter das Kontrollniveau unbehaltener Tiere ab, gerade so, als würde der Streß blockierend wirken (Abbildung 9). Anscheinend liefert erst Stunden später das Abklingen der Streßreaktion ein Signal dafür, die Ependyminsynthese über neue mRNA wieder voll aufzunehmen. Streß führt bekanntlich zu einer Fülle von physiologischen Reaktionen, die dem Gehirn insbesondere durch Hormone

der Nebennierenrinde, die sogenannten Glucocorticoide (Cortisol u.a.), mitgeteilt werden.

Wenn der Konzentrationsabfall der Glucocorticoide beim Abklingen einer Streßreaktion die Gedächtniskonsolidierung auslösen kann, erweist sich ein zweiphasiger Lernvorgang als sinnvoller Mechanismus. Biologisch relevante Lernsituationen sind bei Wirbeltieren immer von Streß begleitet, egal ob das Tier Futter sucht oder einen Partner oder – noch schlimmer – ob es vor einem Freßfeind flieht. Und immer wenn eine erinnerungswerte Verhaltensantwort gefunden worden ist, klingt die physiologische Streßreaktion ab. Organismen, die jene Verhaltensweisen konsolidieren, die ihre Streßreaktionen verminderten, erwerben mit Sicherheit Selektionsvorteile. Ein solcher Gedächtnismechanismus, der erst nach dem Lernen selektiert, was erinnert werden



Schon früh ergaben Obduktionen, daß das Gehirn hohl ist. Man vermutete, daß die Erfahrungen beim Lernen über feine Nervenleitungen wie durch Röhren in diese Hohlräume gepumpt werden. In dieser Zeichnung aus der Enzyklopädie „Margarita Philosophica“ des Gregor Reisch (um 1500) ist das menschliche Gehirn als Schachtelsystem dargestellt, in dem allerlei untergebracht werden kann. Im IV. Hirnventrikel ist die Memorativa eingetragen, das Gedächtnis. Jedoch kann man den Inhalt dieser Hohlräume austauschen, ohne daß das Gedächtnis verblaßt. Seit Ende des 17. Jahrhunderts weiß man, daß das Gedächtnis in den Nervenzellverbänden der Hirnrinde versteckt ist.

Molekulare Eigenschaften der Ependymine

Warum zeigte sich zwischen dem 31-kDa- und dem 37-kDa-Ependymin Kreuzreaktivität, so daß Antikörper gegen das eine auch das andere Protein im Radioimmunoassay erkannten und immunhistologisch im Fischgehirn eine identische Verteilung gefunden wurde? Scatchard-plot-Analysen ergaben gemeinsame antigene Determinanten, die Aminosäurezusammensetzungen stellten sich als nicht unterscheidbar heraus, und begrenzte Proteolysen führten zu fast identischen Peptidkarten. Die Klärung brachte erst der molekularbiologische Ansatz nach der Klonierung: Beide Ependymine besitzen dieselbe Primärstruktur, mit zwei N-Glycosylierungsstellen. Das 31-kDa-Ependymin ist die mono-N-glycosylierte, das 37-kDa-Ependymin die bi-N-glycosylierte Form (siehe auch Abbildung 4 auf Seite 83), die beide mikroheterogene Varianten bilden. Ihre Kohlenhydratseitenketten lassen sich mit Enzymen abtrennen. Darüber hinaus bilden diese monomeren Formen über Schwefelbrücken dimeren Tertiärstrukturen, welche von den amnestisch wirkenden Antikörpern nicht erkannt werden, also wahrscheinlich auch nicht an der Gedächtniskonsolidierung beteiligt sind. Die monomeren Ependymine binden Calciumionen an ihren Zuckerketten, die dimeren werden wahrscheinlich durch Zinkionen stabilisiert. Noch wichtiger war die schon zuvor von Shashoua und Mitarbeitern gemachte Entdeckung, daß Ependymine in ihren Kohlenhydratseitenketten eine endständige, 3-sulfatierte Glucuronsäure besitzen, die für viele Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie charakteristisch ist. Können Ependymine als Zelladhäsionsmoleküle wirken?

soll, müßte sich also in der Evolution bewähren.

Da Injektionen von Antikörpern vor dem Lernen nicht amnestisch wirken (Abbildung 7 auf Seite 86), sind anscheinend nur die neu synthetisierten Ependyminmoleküle an der Gedächtniskonsolidierung beteiligt. Das konnte mit sogenannten Antisense-Sonden überprüft werden, die in die Fibroblasten aufgenommen werden und im lebenden Fisch durch Hybridisierung mit der komplementären mRNA die Neusynthese des Ependymins verhindern. Mit Antisense-Sonden behandelte Goldfische lernten normal, erwiesen sich im Test jedoch als ebenso amnestisch wie die mit Antikörpern injizierten Fische. Dies war der erste Nachweis für die Interferenz einer spezifischen Antisense-Sonde in einem Verhaltensexperiment.

Da die Antisense-Sonden nicht auf das schon gebildete Protein einwirken, sind tatsächlich nur die neu synthetisierten Ependyminmoleküle an der Gedächtnisbildung beteiligt. Zwei Erklärungsmöglichkeiten bieten sich an: (1.) Sezernierte Ependyminmoleküle können schnell an Zellmembranen gebunden werden, oder sie können (2.) ihre Konformation (~ räumliche Gestalt), z.B. durch Wechselwirkung mit Metallkationen, verändern (vgl. Abbildung 4 auf Seite 83) und danach für andere Reaktionen nicht mehr zur Verfügung stehen.

Wo wirken die Proteine?

Wird ein Goldfischgehirn schnell eingefroren, so findet man das Ependymin weit über die Zellzwischenräume verteilt. Wäscht man das Gehirn dagegen vor der immunhistochemischen Färbung durch Perfusionsmethoden von extrazellulären

Substanzen frei, so erkennt man das Ependymin an einzelnen Zellpopulationen, insbesondere den großen Typ-I-Neuronen (im Stratum fibrosum et griseum superficiale, vgl. Abbildung 5 auf Seite 85 und Abbildung 10 auf Seite 88) des Tectum, also an Zellen, die es nicht selbst synthetisieren, sondern aus der Extrazellulärflüssigkeit gebunden oder aufgenommen haben müssen.

Der Fachmann weiß, daß diese Typ-I-Neurone visuelle Informationen von der Netzhaut erhalten. Außerdem endigen an ihnen die dünnen Marginalfasern (vom Torus longitudinalis), die wahrscheinlich Informationen über die zeitliche Einordnung von erwarteten Ereignissen weitergeben (Abbildung 11 auf Seite 88). Während der im trüben Gewässer lebende Goldfisch nicht besonders begabt im Erlernen räumlicher Beziehungen ist, kann er sich zeitliche Assoziationen sehr exakt einprägen.

Die Typ-I-Neurone erscheinen stärker mit dem Immunglobulin markiert, wenn der Fisch zuvor die zeitliche Assoziation zwischen Lichtsignal und Elektroschock gelernt hat. Juliane Hohmann untersucht an der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit mit dem Elektronenmikroskop, ob das Ependymin nach dem Lernen bevorzugt an Synapsen dieser Nervenzellen abgelagert wird (Abbildung 10 auf Seite 88). Victor Shashoua von der Harvard Universität in Boston hat nämlich gemessen, daß bei Aktivierung der Projektionen auf die Typ-I-Neurone der Calciumgehalt in ihrer Mikroumgebung abfällt, und er berichtet, daß Ependymine in Abwesenheit von Calciumionen faserförmige Präzipitate bilden (vgl. Abbildung 4 auf Seite 83).

Eine Spekulation über den Wirkungsmechanismus

Natürlich ist die Zeit lange noch nicht reif, um eine schlüssige Theorie der Gedächtniskonsolidierung zu

formulieren, aber es ist nie zu früh, die erhobenen Daten in Form eines interpretierenden Cartoons zur Diskussion zu stellen (Abbildung 11 auf Seite 88).

Möglicherweise greifen zwei Regelkreise ineinander: Hormone können die vorangegangene Lernphase nach ihrer biologischen Bedeutung gewichten und könnten so regulieren, wann und wieviel Zelladhäsionsmoleküle synthetisiert und sezerniert werden. Dagegen zeigen loka-

Jedermann klagt über
sein Gedächtnis,
niemand über seinen
Verstand.

La Rochefoucauld

le Änderungen der Ionenkonzentrationen, welche spezifischen Verschaltungen beim Lernen aktiviert wurden. Sie repräsentieren dadurch nicht nur den semantischen Aspekt der neuen Information, sondern liefern zugleich ein Signal, um die sezernierten Zelladhäsionsmoleküle in ihrer Konformation zu verändern. Diese molekulare Reaktion kann genau dort stattfinden, wo die synaptische Effizienz durch Bindung der Adhäsionsmoleküle an Membranen verbessert werden soll. •

LITERATUR

- Schmidt R (1995): Cell-adhesion molecules in memory formation. *Behav Brain Res* 66:65-72.
- Schmidt, R. (1997): Regulated expression of the CNS-specific cell adhesion molecule ependymin after acquisition of an active avoidance behaviour provides a possible mechanism for memory consolidation. In: *Neurochemistry, Cellular, Molecular, and Clinical Aspects*, 869-876 (A. Teelken, J. Korf, eds.), New York/London: Plenum Press.
- Schmidt, R. (1998): Learning and memory, neurochemical aspects. In: *Encyclopedia of Neuroscience*, (2nd ed., G. Adelman, B. Smith, eds.), auf CD, Amsterdam: Elsevier.
- Shashoua, V.E. & Schmidt, R. (1998): Ependymins: Secretory cell adhesion molecules in the CNS. In: *Encyclopedia of Neuroscience*, (2nd ed., G. Adelman, B. Smith, eds.), auf CD, Amsterdam: Elsevier.

JUSTUS-LIEBIG-



UNIVERSITÄT
GIESSEN

Prof. Dr. Rupert Schmidt

Zentrale Biotechnische Betriebseinheit
Leihgesterner Weg 217
35392 Gießen

Telefon (06 41) 99-1 65 00 oder -1 65 01
Telefax (06 41) 99-1 65 09

e-mail Rupert.Schmidt@strz.uni-giessen.de