

**Akustisches Diskriminierungslernen bei der
Mongolischen Wüstenrennmaus:
Proteinsyntheseabhängigkeit und Veränderungen
der Genexpression im Hörkortex**

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium
(Dr.rer.nat.)**

**genehmigt durch
die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg**

von Michaela Kraus

geb. am 29.07.1972 in Leinefelde

**Gutachter: Prof. Dr. E.D. Gundelfinger
Prof. Dr. H. Schwegler
Prof. Dr. G. Ehret**

Eingereicht am: 26.6.02

Verteidigung am: 18.12.02

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Neurobiologie in Magdeburg angefertigt.

An erster Stelle möchte ich mich besonders bei Dr. Wolfgang Tischmeyer für seine Betreuung, sein Interesse und ständige Diskussionsbereitschaft bedanken- besonders dann, wenn mal wieder nichts funktionierte.

Prof. Eckart Gundelfinger danke ich für die Arbeitsmöglichkeit in der Abteilung Neurochemie/Molekularbiologie, für seine Unterstützung und dem Interesse am Fortgang der Arbeit.

Mein Dank gilt Dr. Horst Schicknick, ohne den ein Teil meiner Arbeit, insbesondere die Rapamycin-Experimente, überhaupt nicht möglich gewesen wäre. Lydia Löw und Chris Leusche bin ich für die Hilfe bei den Lernexperimenten dankbar.

Sabine Staak möchte ich für ihre Hilfe und die aufmerksame Durchsicht des Manuskriptes während des Endspurts meiner Arbeit danken.

Katrin Schumacher danke ich für die vielen Stunden, die sie aufwendete für die Anfertigung der Gefrierschnitte.

PD Dr. Dirk Montag danke ich für die Bereitstellung der Arc-Sonde und den vielen hilfreichen Tipps und Tricks für die *in situ* Hybridisierung. Dr. Monique Montag-Sallaz möchte ich sehr danken, da sie mir mit viel Geduld und Hilfe bei meinen ersten *in situ* Hybridisierungen zur Seite gestanden hat.

Dr. Rainer Pielot möchte ich dafür danken, dass er immer wieder bei den vielen großen und kleinen Problem mit den Computer geholfen hat.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern der Abteilung Neurochemie/Molekularbiologie und den Neurogenetikern für die Hilfsbereitschaft und die gute Stimmung die einen wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatte.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung und den Glauben, dass ich das Ganze ja wohl doch irgendwann zu Ende bringen werde.

1. EINLEITUNG	1
1.1. Lernen und Gedächtnis	1
1.1.1. Definition von Lernen und Gedächtnis	1
1.1.2. Gedächtnisformen- und modelle	1
1.1.3. Die Bildung eines Kurzzeitgedächtnisses	2
1.1.4. Die Bildung eines Langzeitgedächtnisses	3
1.2. Der auditorische Kortex der Mongolischen Wüstenrennmaus.....	7
1.3. Zielstellung.....	10
2. MATERIAL UND METHODEN	11
2.1. Verhaltensexperimente	11
2.1.1. Tiermaterial	11
2.1.2. Lernparadigma	11
2.1.3. Intrakortikale Injektionen	13
2.1.3.1. Operative Eingriffe	13
2.1.3.2. Substanzapplikationen	13
2.2. Analysen zur Veränderung der Genexpression nach FM-Diskriminierungstraining	16
2.2.1. Chemikalien	16
2.2.2. Kits und Enzyme	16
2.2.3. Vektoren	17
2.2.4. Bakterienstamm	17
2.2.5. Allgemeine Lösungen	17
2.2.6. Krampfauslösende Stimulation mit Kainat.....	17
2.2.7. Präparation verschiedener Hirnregionen des Gerbils.....	17
2.2.8. Isolierung von Gesamt-RNA.....	18
2.2.9. Subtraktive Hybridisierung	19
2.2.9.1. cDNA-Synthese	19
2.2.9.2. Subtraktive Hybridisierung.....	21
2.2.10. Charakterisierung der erhaltenen Klone	24

2.2.10.1.	Transformation von Bakterien.....	25
2.2.10.2.	Plasmid-Präparation (Mini-, Midipräparation).....	25
2.2.10.3.	Restriktion von DNA.....	25
2.2.10.4.	Agarose-Gelelektrophorese und Elution von DNA.....	26
2.2.10.5.	Sequenzierung und Sequenzanalyse der Klone.....	26
2.2.11.	Dot-Blot-Hybridisierung.....	26
2.2.11.1.	Amplifikation der Klone.....	27
2.2.11.2.	Immobilisierung der PCR-Fragmente.....	27
2.2.11.3.	Radioaktive Markierung der Sonden.....	28
2.2.11.4.	Dot-Blot-Hybridisierung.....	28
2.2.12.	Klonierung von BDNF-, Activin- β A- und GAPDH-cDNA.....	29
2.2.13.	Expressionsanalyse durch Northern-Blot-Hybridisierung.....	30
2.2.13.1.	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese und Northern-Blot-Hybridisierung.....	30
2.2.13.2.	Herstellung der cDNA-Sonden.....	31
2.2.13.3.	Radioaktive Markierung der Sonden.....	31
2.2.13.4.	Northern-Blot-Hybridisierung.....	31
2.2.13.5.	Autoradiographie und Auswertung der Autoradiogramme.....	32
2.2.14.	Nicht-radioaktive <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	32
2.2.14.1.	Präparation des Gewebes.....	33
2.2.14.2.	Herstellung der Sonden.....	33
2.2.14.3.	<i>in situ</i> -Hybridisierung.....	35
2.2.14.4.	Bestimmung der Neuronenzahl im AC.....	36
2.2.14.5.	Auswertung der ISH und die Bestimmung der Neuronenzahl.....	36
3.	ERGEBNISSE.....	37
3.1.	Einfluss von Proteinsyntheseinhibitoren auf das FM-Diskriminierungsverhalten.....	37
3.1.1.	Methodische Vorarbeiten für die pharmakologischen Studien.....	40
3.1.1.1.	FM-Diskriminierungslernen bei unbehandelten Gerbils.....	40
3.1.1.2.	Einfluss von Operation und Narkose auf die Diskriminierungsleistung.....	41
3.1.1.3.	Sensitivität der Diskriminierungsreaktion gegenüber unilateral rechts verabreichtem ANI.....	43
3.1.2.	Injektion von ANI oder EME in den AC des Gerbils.....	44
3.1.2.1.	Injektion von ANI 5 min und 2 h nach dem initialen Training.....	44

3.1.2.2.	Injektion von ANI 4 h und 6 h nach dem initialen Training.....	47
3.1.2.3.	Einfluss von ANI auf eine vollständig etablierte FM-Diskriminierungsreaktion.....	48
3.1.2.4.	Einfluss von ANI auf eine partiell etablierte FM-Diskriminierungsreaktion.....	49
3.1.2.5.	Einfluss von EME auf eine partiell etablierte FM-Diskriminierungsreaktion.....	50
3.1.2.6.	Injektion von ANI oder EME mehrere Tage vor dem initialen Training.....	52
3.1.2.7.	Zusammenfassung der Wirkung von bilateral in den AC applizierten Proteinsyntheseinhibitoren.....	53
3.1.3.	Injektion von RAPA und FK506 in den AC des Gerbils.....	54
3.1.4.	Zusammenfassung der Effekte bilateraler Injektionen in den AC des Gerbils.....	57
3.2.	Analysen zur Veränderung der Genexpression nach FM-Diskriminierungstraining.....	59
3.2.1.	Analyse von Arc (Arg3.1)-mRNA mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	59
3.2.2.	Subtraktive Hybridisierung.....	61
3.2.3.	Dot-Blot-Hybridisierung und Identifizierung nicht-mitochondrialer DNA.....	62
3.2.4.	Analyse durch Northern-Blot-Hybridisierung.....	66
3.2.5.	Analyse durch nicht-radioaktive <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	69
3.2.5.1.	VILIP-1 <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	69
3.2.5.2.	Nurr1/Nurr2 <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	72
3.2.5.3.	Ermittlung der Neuronendichte im AC des Gerbils.....	74
4.	DISKUSSION.....	76
4.1.	Pharmakologische Untersuchungen zu Proteinsynthese-abhängigen Prozessen im auditorischen Kortex der Mongolischen Wüstenrennmaus im Zusammenhang mit FM-Diskriminierungslernen.....	76
4.1.1.	Einfluss von Operation, Narkose und Injektionsprozedur auf die Diskriminierungsleistung.....	76
4.1.2.	Injektionen von Anisomycin und Emetin.....	77
4.1.3.	Injektion von Rapamycin und FK506.....	82
4.2.	Veränderungen in der Genexpression nach FM-Diskriminierungstraining.....	86
4.2.1.	Erhöhte Expression von Arc (Arg3.1)-mRNA nach FM-Diskriminierungstraining.....	86
4.2.2.	Subtraktive Hybridisierung zur Detektion differentiell exprimierter Gene.....	87
4.2.3.	Veränderungen der Genexpression nach FM-Diskriminierungstraining und Stimulation mit Kainat.....	89

4.2.3.1.	Northern-Blot-Hybridisierung	89
4.2.3.2.	Nicht-radioaktive <i>in situ</i> -Hybridisierung	90
4.3.	Zusammenfassung und Ausblick	92
5.	ZUSAMMENFASSUNG	94
6.	LITERATURVERZEICHNIS	95
7.	ABKÜRZUNGEN	107

1. Einleitung

1.1. Lernen und Gedächtnis

1.1.1. Definition von Lernen und Gedächtnis

Eine Voraussetzung für die Fähigkeit, sich auf ständig wechselnde Umweltbedingungen einzustellen, ist es neues Wissen zu erwerben (Lernen) und dieses Wissen abrufbar abzuspeichern (Gedächtnisbildung) (Strube, 1996). Eine große Anzahl von Studien hat gezeigt, dass an der Gedächtnisbildung unterschiedliche, zeitlich getrennte Prozesse beteiligt sind (Übersicht siehe Abel und Lattal, 2001). Der erste Schritt während des Lernens ist die Aufnahme von Informationen aus der Umwelt über die Sinnesorgane. Hier erfolgt eine erste Auswahl der zu speichernden Information sowie deren Enkodierung in abrufbare Information während des Lernens (Akquisition) einer Aufgabe. Die Speicherung und die stabile Festigung (Konsolidierung) erfolgt nach der Aufnahme der Informationen. Was als die eigentliche Gedächtnisleistung definiert wird, ist das Behalten (Retention) und die Widerabrufbarkeit von gespeicherter Information. Wenn gespeicherte Information wieder angewendet wird, bezeichnet man dies als Abrufung (Tulving, 1999). Untersuchungen deuten darauf hin, dass, wenn gespeicherte Information wieder abgerufen wird, das Gedächtnis dafür in eine labile Phase treten und dann, ähnlich der Konsolidierung, nochmals gefestigt werden kann. Dies wird als Rekonsolidierung bezeichnet.

1.1.2. Gedächtnisformen- und modelle

Generell werden zwei Formen von Gedächtnis unterschieden (Thompson und Kim, 1996; Tulving, 1999). Das bewusste Abrufen von Wissen über Fakten (semantisches Gedächtnis) und Ereignisse (episodisches Gedächtnis) bezeichnet man als explizites (deklaratives) Gedächtnis. Modelle für explizites Gedächtnis sind z. B. das Modell für räumliches Lernen im Wasserbecken (*Morris water maze*), räumliches Lernen in einer strahlenförmigen und T-förmigen Kammer (*radial arm maze*, *t-maze*), bestimmte Formen olfaktorischen Lernens oder Kontext-bezogene Angstkonditionierung (Thompson und Kim, 1996; Squire und Knowlton, 1999; Eichenbaum, 2001). Implizites (nicht-deklaratives) Gedächtnis dagegen ist durch unbewusstes Abrufen von motorischen, sensorischen oder anderen Fähigkeiten gekennzeichnet (Squire und Knowlton, 1999). Diese Gedächtnisform beinhaltet einfache assoziative sowie nicht-assoziative Formen. Formen von nicht-assoziativem implizitem Lernen sind Habituation (Gewöhnung an einen

bestimmten Reiz) und Sensitivierung (Verstärkung einer Reaktion auf aversive Reize). Zu assoziativem implizitem Lernen zählt die klassische (Pawlovsche) und die operante Konditionierung. Ein einfaches Modell für die klassische Konditionierung ist der sogenannte Kiemenrückzugsreflex der Meeresschnecke *Aplysia californica*. In diesem Modell wird ein Reiz (Berührung des Mantelrandes, bedingter Reiz = CS), welcher normalerweise eine schwache oder keine Reaktion hervorruft, gepaart mit einem aversiven Reiz (starker elektrischer Reiz im Schwanzbereich, unbedingter Reiz = UCS). Nach einer solchen Konditionierung löst der bedingte Reiz allein die gleiche Reaktion aus wie sonst der unbedingte Reiz. Die Stärke der bedingten Reaktion nimmt ab, wenn der bedingte Reiz öfters ohne den unbedingten Reiz gegeben wird. Diesen Vorgang bezeichnet man als Auslöschung. Ebenfalls häufig angewendete Modelle klassischer Konditionierung sind der sogenannte Lidreflex und die Angstkonditionierung (Thompson und Kim, 1996; Fendt und Fanselow, 1999). Eine operante Konditionierung ist z. B. das *leverpressing operant conditioning paradigm* (wasserdeprivierte Ratten lernen nach einem Ton einen Hebel zu drücken, um an Wasser zu gelangen) (Kelly und Deadwyler, 2002).

Für Vertebraten konnte gezeigt werden, dass explizites und implizites Gedächtnis verschiedene neurale Verschaltungen und Teile des Gehirns involvieren. Kortex, Hippokampus sowie Regionen des Dienzephalons sind Strukturen, die für die Verarbeitung und Abspeicherung eines expliziten Gedächtnisses benötigt werden, wohingegen das implizite Gedächtnis auf den Temporallappen nicht angewiesen ist aber später die selben motorischen, sensorischen oder assoziativen Bahnen nutzt für Konsolidierung, Stabilisierung und Abrufung des Gelernten (Thompson und Kim, 1996; Squire und Knowlton, 1999).

Beide Gedächtnisformen lassen sich in mindestens zwei zeitliche Komponenten unterteilen: das Kurzzeitgedächtnis, das zwischen wenigen Minuten bis zu einigen Stunden anhält und das Langzeitgedächtnis, welches persistent für einige Tage, Jahre oder ein ganzes Leben ist (Barondes und Cohen, 1968; Goelet *et al.*, 1986; McGaugh, 2000).

1.1.3. Die Bildung eines Kurzzeitgedächtnisses

Experimentelle Befunde sprechen dafür, dass für die Bildung eines Kurzzeitgedächtnisses kovalente Modifikationen von bereits existierenden Proteinen notwendig sind, wie z. B. Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Enzymen, Rezeptoren sowie Ionenkanälen. Änderungen der Genexpression auf Ebene der Transkription oder Translation werden dafür nicht benötigt. Diese Modifikationen tragen zu einer sehr schnellen Veränderung der synaptischen Transmission und zur Änderung von Kanalkinetiken bei, sind aber nicht lang anhaltend

(Übersicht siehe Izquierdo *et al.*, 1999; Rose, 2000; Dineley *et al.*, 2001). Informationen im Kurzzeitgedächtnis können schnell durch neue ersetzt werden. Um Informationen für längere Zeit zu speichern, müssen sie ins Langzeitgedächtnis überführt werden.

1.1.4. Die Bildung eines Langzeitgedächtnisses

Das Abspeichern und die Abrufbarkeit von Informationen für lange Zeit ist bei Gedächtnisphänomenen abhängig von verschiedensten molekularen Ereignissen während der Konsolidierung. Die Umwandlung des Kurzzeitgedächtnisses in eine lange stabile Form dürfte durch Veränderungen der Eigenschaften des neuronalen Netzwerkes, wie z. B. die Bildung neuer synaptischer Verbindungen, gekennzeichnet sein (Hebb, 1949; Yuste und Bonhoeffer, 2001). Die Konsolidierungsphase ist sehr anfällig für verschiedenste Interventionen, wie z. B. dem Einsatz von elektrokonvulsivem Schock, Hypoxie und Hypothermie. Ferner kann die Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses durch Inhibitoren der Transkription oder der Translation gehemmt werden (Übersicht siehe Davis und Squire, 1984; Stork und Welzl, 1999).

Wie bereits an verschiedensten Lernparadigmen und Spezies nachgewiesen wurde, so z. B. in Invertebraten (z.B. O'Leary *et al.*, 1995; Ramirez *et al.*, 1998; Casadio *et al.*, 1999; Menzel, 2001), Vögeln (z. B. Ribeiro und Mello, 2000; Rose, 2000) und Nagetieren (z. B. Grecksch und Matthies, 1980; Bourtchouladze *et al.*, 1998; Quevedo *et al.*, 1999; Schafe und LeDoux, 2000), beeinträchtigten diese Inhibitoren zwar die Langzeitspeicherung, nicht aber Prozesse der Akquisition und des Kurzzeitgedächtnisses. Dies weist darauf hin, dass für die Konsolidierung eines Langzeitgedächtnisses die Neubildung von Proteinen notwendig ist. Frühere Studien deuteten darauf hin, dass Prozesse der mRNA- und Proteinsynthese, die essentiell für die Konsolidierung eines Langzeitgedächtnisses sind, noch während oder kurze Zeit nach der Akquisitionsphase angestoßen werden (Davis und Squire, 1984). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass abhängig vom Paradigma, der Spezies und der untersuchten Gehirnregion die Konsolidierung eines Langzeitgedächtnisses oft mehr als ein Zeitfenster erhöhter Translation aufweist. In verschiedenen Spezies, wie z. B. Küken, Maus und Ratte wurde nachgewiesen, dass Langzeitgedächtnis eine zweite Phase intakter Proteinsynthese benötigt, die mehrere Stunden nach dem Training beginnt (Grecksch und Matthies, 1980; Chew *et al.*, 1995; Freeman *et al.*, 1995; Bourtchouladze *et al.*, 1998; Tiunova *et al.*, 1998; Quevedo *et al.*, 1999). Zur Aufrechterhaltung eines auditorischen Gedächtnisses für Gesänge beim Zebrafinken sind sogar multiple Phasen der Proteinsynthese beschrieben (Chew *et al.*, 1996).

Die separaten Phasen der Proteinsynthese könnten in verschiedenen zellulären Kompartimenten stattfinden und somit unterschiedlichen Zeitregimes folgen (Wells *et al.*, 2000). Ein möglicher Mechanismus könnte die erhöhte Produktion von mRNA im Nukleus durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (TF) sein. Die neu synthetisierte mRNA könnte dann entweder im Soma der Zelle oder im Dendriten translatiert werden. Ein weiterer möglicher Mechanismus ist Proteinsynthese durch Translation von bereits im Dendriten lokalisierter mRNA. Solch lokale Translation wurde vermutet nach der Identifizierung von Polyribosomen (Steward und Levy, 1982) und verschiedener mRNAs (Kleiman *et al.*, 1990) in Dendriten von hippocampalen Neuronen. Verschiedene Studien deuten z. B. auf dendritische Proteinsynthese in einigen Formen von Langzeitpotenzierung (LTP) (Kang und Schuman, 1996; Ouyang *et al.*, 1999) und Langzeitdepression (LTD) hin (Huber *et al.*, 2000). Untersuchungen an *Aplysia* weisen darauf hin, dass lokal synthetisierte Proteine entweder synaptisch lokalisiert bleiben oder Signale zum Zellkern vermitteln können (Martin *et al.*, 1997; Casadio *et al.*, 1999). Die zellweite transiente Form der Langzeitverstärkung in *Aplysia* kann an spezifischen Synapsen durch lokale Proteinsynthese stabilisiert werden (Martin *et al.*, 1997; Casadio *et al.*, 1999). Das Zusammenspiel zwischen Proteinen, die an der Synapse translatiert werden, und Proteinen, die als ein Ergebnis von transkriptioneller Aktivierung im Kern generiert wurden, ist wahrscheinlich eine molekulare Grundlage für die Fähigkeit sich zu erinnern (Wells *et al.*, 2000). Die neu synthetisierten Proteine werden zur Reorganisation von bereits vorhandenen Synapsen genutzt, um z. B. die Effizienz der synaptischen Transmission zu verändern bzw. synaptische Verbindungen zu verstärken. Es können auch neue synaptische Verbindungen durch Auswachsen und Synaptogenese gebildet werden (Moser, 1999).

Verschiedene Autoren beschreiben, dass einige Behandlungen, welche die Konsolidierung eines Gedächtnisses vermindern, auch die Stabilität eines Gedächtnisses nach der Abrufung beeinträchtigen. Es zeigte sich, dass die Stabilität des reaktivierten Gedächtnisses beeinträchtigt sein kann, wenn in zeitlicher Nähe zur Abrufung eines Gedächtnisses Inhibitoren der Proteinsynthese (Judge und Quartermain, 1982; Nader *et al.*, 2000; Taubenfeld *et al.*, 2001), elektrokonvulsiver Schock (Misanin *et al.*, 1968), Hypothermie (Mactutus *et al.*, 1979), glutamaterge und β -adrenerge Antagonisten (Summers *et al.*, 1997; Przybylski *et al.*, 1999) verabreicht werden. Es wird vermutet, dass, wenn Gedächtnisinhalte abgerufen werden, um z. B. neue Erfahrungen hinzuzufügen, eine labile Phase eintritt und Prozesse der Rekonsolidierung benötigt werden, die den Mechanismen der Konsolidierung nach Akquisition ähnlich sind (Übersicht siehe Sara, 2000).

Es wurde gezeigt, dass Proteinsyntheseinhibitoren sowohl die Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses als auch die Stabilität eines reaktivierten Gedächtnisses beeinträchtigen können. Zwei häufig in der Lernforschung verwendete Inhibitoren der Proteinsynthese sind Anisomycin (ANI) und Emetin (EME) (Davis und Squire, 1984). Beide Substanzen hemmen die Elongation der Translation, greifen aber in unterschiedliche Schritte der Polypeptidketten-Verlängerung ein und unterdrücken so die Translation der Gesamtheit eukaryotischer mRNA (Huang und Grollman, 1970).

Ein weiterer Inhibitor hat erst in neueren Studien Anwendung gefunden, das bakterielle Makrolid Rapamycin (RAPA). RAPA interagiert, im Gegensatz zu ANI und EME, im Komplex mit seinem intrazellulären Rezeptor FK506-bindendes Protein (FKBP12), mit der Kinase *mammalian target of rapamycin* (mTOR) und beeinflusst damit Signalwege, welche u. a. in die Regulation der Initiation der Translation von bestimmten mRNA-Subgruppen involviert sind (Raught *et al.*, 2001). Komponenten dieser Signalwege sind in verschiedenen Zellkompartimenten nachgewiesen worden, so auch in neuronalen Dendriten (Tang *et al.*, 2002). *In vitro*-Studien an Neuronen von Invertebraten lassen eine funktionelle Bedeutung RAPA-sensitiver, lokaler Proteinsynthese für Mechanismen synaptischer Langzeitplastizität vermuten. So konnten Casadio *et al.* (1999) am Modell des Kiemenrückzugreflexes der Meeresschnecke *Aplysia* nachweisen, dass die lokale, auf den Synapsenbereich beschränkte Applikation von RAPA zur Aufhebung einer durch Serotonin induzierten Langzeitverstärkung führt. Dieser Effekt zeigte sich erst 72 h nach der Stimulation mit Serotonin. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass Mechanismen zur Stabilisierung der Langzeitverstärkung eine RAPA-sensitive Komponente benötigen, deren Fehlen die Aufrechterhaltung von lang anhaltenden funktionellen und strukturellen Veränderungen von Synapsen verhindert.

Wie bereits oben erwähnt, konnten in verschiedenen Modellsysteme zwei oder mehrere Proteinsynthese-abhängige Phasen der Gedächtniskonsolidierung nachgewiesen werden. Untersuchungen des Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine verschiedener Hirnstrukturen von Ratten und Kücken weisen darauf hin, dass bis ca. 2 h nach einem Lernexperiment vor allem lösliche (möglicherweise regulatorische) Proteine und 6 - 10 h nach dem Lernexperiment vor allem membrangebundene Proteine (mögliche Strukturproteine) gebildet werden (Übersicht siehe Matthies, 1989). In den letzten Jahren wurden insbesondere solche Gene identifiziert, die in der ersten Phase erhöht exprimiert werden. Dazu gehören die sogenannten *immediate early genes* (IEG) (Dragunow, 1996; Herdegen und Leah, 1998; Lanahan und Worley, 1998; Tischmeyer und Grimm, 1999), deren Expression nach extrazellulären Stimuli

sehr schnell geregelt wird. Die Induktion ist meist transient und unabhängig von neuer Proteinsynthese. Die mRNAs dieser Gene haben oft nur eine kurze Halbwertszeit. Diese strenge Kontrolle der Expression weist auf eine regulatorische Funktion der Proteine hin. Einige IEGs kodieren für TF oder zumindest für DNA-bindende Proteine, welche die Expression von später transkribierten Genen regulieren. Zu den am besten charakterisierten IEG-Proteinen gehören die induzierbaren TF der Fos, Jun und Krox Familie. Weitere Klassen von IEG-Proteinen sind z. B. nur/77 sowie Nurr1 (Mitglieder einer Steroid-Hormon-Rezeptor-Familie), Cox-2 (eine induzierbare Zyklooxygenase), Narp (Pentraxin-Familie), Homer (ein zytosolisches Protein, welches an mGluRs bindet) und Arc/Arg3.1. (interagiert mit zytoskelettalen Proteinen) (Übersicht siehe Lanahan und Worley, 1998; Maruyama *et al.*, 1998).

Verschiedene neurotrophe Faktoren (*nerve growth factor*, *brain derived neurotrophic factor* [BDNF], Neurotrophin-3, -4 und -6), welche das Überleben und die Differenzierung von Neuronen während der Entwicklung regulieren, können ebenfalls sehr schnell in Paradigmen von synaptischer Plastizität, wie z. B. das durch Läsionen induzierte Auswachsen neuer Verbindungen, Induktion einer LTP und räumliches Lernen induziert werden (Übersicht siehe Thoenen, 1995).

Es gibt bisher relativ wenige Untersuchungen zu Veränderungen auf mRNA- oder Proteinebene 4 – 6 Stunden oder zu noch späteren Zeitpunkten nach einem Lernvorgang. Gene, die in der zweiten Phase erhöht exprimiert werden, bezeichnet man auch als *late genes*. Zu den Genen oder Proteinen, die bisher zu späten Zeitpunkten nach einem Training oder einer Konditionierung als in ihrer Expression verändert identifiziert wurden, gehören Glykoproteine, z. B. NCAM, L1, Neuroligin1 (Rose, 2000; Stork *et al.*, 2001), Proteine des Zytoskeletts, z. B. Aktin, MARCKS (Hatada *et al.*, 2000; Matus, 2000), Bestandteile von Rezeptoren (AMPA-, NMDA- [Untereinheit NR2B], Ryanodin- [Typ 2] und Serotonin-Rezeptor Nayak *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 1998), Ca²⁺-bindende Proteine, z. B. Calreticulin, Neurocalcin δ (Kennedy *et al.*, 1992; Stork *et al.*, 2001), Komponenten der Endozytose und Exozytose, z. B. Clathrin leichte und schwere Kette, Syntaxin 1B und Synapsin I (Hicks *et al.*, 1997; Stork und Welzl, 1999), aber auch die Haushaltsenzyme Glutamat-Dehydrogenase, Aldehyd-Reduktase, Phosphofruktokinase (Cavallaro *et al.*, 1997; Stork *et al.*, 2001) sowie Komponenten verschiedener Signaltransduktionswege und Proteine für strukturelle Reorganisationsprozesse (Stork *et al.*, 2001). Die Proteinprodukte dieser Gene könnten zur funktionellen und strukturellen Reorganisation von Synapsen und Neuronen beitragen.

1.2. Der auditorische Kortex der Mongolischen Wüstenrennmaus

Die Mongolische Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*, Mongolischer Gerbil) wurde in den letzten Jahren zu einem wichtigen Tiermodell für die Erforschung des auditorischen Systems, seiner Physiologie sowie möglicher plastischer Veränderungen. Einer der wichtigsten Gründe hierfür ist, dass die Hörschwellenkurve des Gerbils im niederfrequenten Bereich der des Menschen sehr ähnlich ist (Ryan, 1976), was sich auch in der deutlichen Repräsentation von niedrigen Frequenzen in den unterschiedlichen Strukturen der Hörbahn widerspiegelt (Ryan *et al.*, 1982).

Mittlerweile ist der Gerbil sehr gut untersucht. Seine Haltung und Züchtung ist relativ einfach und der auditorische Kortex (AC) für unterschiedlichste Untersuchungen leicht zugänglich. Für die Charakterisierung der funktionellen Organisation des AC wurden nicht nur reine Töne (Töne, welche nur eine Frequenzkomponente besitzen) verwendet (Hess und Scheich, 1996; Sugimoto *et al.*, 1997) sondern auch frequenzmodulierte Töne (Zuschratter *et al.*, 1995; Schulze *et al.*, 1997). Es wurden neun auditorische Felder identifiziert (Scheich *et al.*, 1993a; Thomas *et al.*, 1993; Budinger *et al.*, 2000a) (siehe Abb. 2.1 in "Material und Methoden"). Vier von diesen Feldern zeigen eine tonotope Organisation, d. h. Frequenzen reiner Töne werden in einer räumlichen Ordnung repräsentiert. Orthogonal zum tonotopen Gradienten verlaufen in diesen Feldern sogenannte Isofrequenzlinien, entlang derer sich die Bestfrequenzen der Neuronen nicht ändern. Die vier tonotopen Areale sind der primäre auditorische Kortex (AI) mit dem dorsalen Unterfeld AId, das kleinere rostral gelegene anteriore auditorische Feld (AAF) und zwei kleine kaudale Felder, das dorsoposteriore (DP) sowie ventroposteriore (VP) Feld (siehe Abb. 2.1). Verschiedenste kortikokortikale Verbindungen der vier tonotopen Felder wurden identifiziert (Budinger *et al.*, 2000a; Budinger *et al.*, 2000b). Es existieren z. B. ipsilaterale Projektionen von AI zu den anderen auditorischen Feldern und diese scheinen reziprok zu sein. Ebenso projiziert jedes Feld zu seinem homotopen Gegenstück in die kontralaterale Hemisphäre. Weitere Verbindungen bestehen zu ipsilateralen assoziativen Kortizes, wie perirhinaler und entorhinaler Kortex und sensorische Kortizes, wie zum somatosensorischen Kortex. Starke reziproke subkortikale Projektionen der tonotopen Felder zeigten sich zu den Kernen des Corpus geniculatum mediale oder zu den drei Untereinheiten des Colliculus inferior (Budinger *et al.*, 2000b). Diese vielfältigen Verbindungen der einzelnen auditorischen Felder deuten auf verschiedene Funktionen dieser Felder bei der Hörverarbeitung hin.

Unterschiedlichste Hinweise für mögliche lerninduzierte Prozesse im AC nach aversiver Tonkonditionierung wurden bereits beschrieben. Physiologische Korrelate für lerninduzierte

Veränderungen im AC nach Tonkonditionierung konnten z. B. durch die Anwendung des Fluoro-2-Desoxyglukose-Verfahrens (2DG) dargestellt werden. Dort fanden sich vor allem räumliche Veränderungen der Aktivierungsmuster, wobei es sich nicht einfach um eine Ausdehnung des jeweiligen auditorischen Feldes handelte, sondern um Verschiebungen über den tonotopen Gradienten (Scheich *et al.*, 1993b; Scheich *et al.*, 1997). Elektrophysiologisch konnten diese Befunde bestätigt werden (Ohl und Scheich, 1996; Ohl und Scheich, 1997). Cahill *et al.* (1996) wiesen mittels 2DG nach, dass es nach wiederholter Tonstimulation, gepaart mit aversivem Fußreiz, zu einer Neuverteilung der metabolischen Aktivierungsmuster von AI zu den anderen Feldern (insbesondere AAF und DP) kommt. Die Gesamtaktivität bleibt dabei unverändert. Mittels aversiver auditorischer Konditionierung mit reinen Tönen und gleichzeitigen Einzel- und Multizellableitungen von frequenzrezeptiven Feldern konnten Verschiebungen der kortikalen Karte (Scheich *et al.*, 1997), komplexe Muster von gesteigerten sowie reduzierten Aktivierungswahrscheinlichkeiten von Neuronen nach CS+, die frequenzspezifische Plastizität eines rezeptiven Feldes sowie die durch Lernen induzierte Modulation von schnellen neuronalen Antworten im AC (Ohl und Scheich, 1996; Ohl und Scheich, 1997) beobachtet werden. CS+ sind dabei auditorische Stimuli, bei deren Präsentation der Gerbil mit einem Kompartimentwechsel in einer zweigeteilten Kammer reagieren muss, um einem Strafreiz zu entgehen. Während der Darbietung eines CS- sollen die Tiere dagegen in der Startbox verbleiben. Mittels 2DG konnte nach dem Erlernen der Diskriminierungsreaktion von reinen Tönen eine Ausdehnung der den CS+ repräsentierenden Kolumne und eine Verringerung der metabolischen Aktivität der Kolumne für den CS- gezeigt werden (Scheich *et al.*, 1993b).

Für das IEG *c-fos* konnte nach kurzer Stimulation mit reinen Tönen eine spezifische Expression in AI, sichtbar durch ein sehr schmales Band c-Fos-immunpositiver Zellen, besonders stark in den Schichten II und IV, detektiert werden. Durch Vergleich mit 2DG-Mustern benachbarter Hirnschnitte wurde nachgewiesen, dass die Expression von *c-fos* zu Isofrequenzlinien korrespondiert und es sich somit wahrscheinlich um frequenzspezifische Aktivierungen handelt (Scheich und Zuschratter, 1995; Zuschratter *et al.*, 1995).

Die Involvierung des dopaminergen, aber nicht des serotonergen Systems am ersten Tag eines Vermeidungslernen, wurde im AC durch Mikrodialyse gezeigt. Die Antwort des dopaminergen Systems spiegelt wahrscheinlich die initiale Bildung der verhaltensrelevanten Assoziationen während des ersten Trainings wieder (Stark und Scheich, 1997). Ein weiteres Indiz für plastische Prozesse im AC war die Möglichkeit der Auslösung von LTP- und LTD-ähnlichen Phänomenen nach fokaler transkranieller magnetischer Stimulation (Wang *et al.*, 1996).

In den bisher genannten Studien wurden Paradigmen zum Diskriminierungslernen oder zur klassischen Konditionierung unter Verwendung reiner Töne untersucht. In der natürlichen Vokalisation von Tieren und Menschen spielen jedoch komplexe Muster frequenzmodulierter Töne eine wichtige Rolle. Wetzell *et al.* (1998b) untersuchten daher, ob der Mongolische Gerbil in der Lage ist, die Modulationsrichtung von symmetrisch gepaarten, linear-frequenzmodulierten Tönen (FM) zu unterscheiden. Dazu wurden Gerbils in einer zweigeteilten Kammer, der sogenannten Shuttle-Box, daraufhin trainiert, auf die Präsentation von aufwärts oder abwärts modulierten Tönen mit der Ausübung bzw. Unterlassung von Kompartimentwechseln zu reagieren. Es zeigte sich, dass die Versuchstiere innerhalb weniger Tage in der Lage waren, diese FM-Diskriminierungsreaktion zu erlernen. Mehr noch, die wiederholte Präsentation neuer Frequenzen während der Trainingssitzungen führte dazu, dass die Tiere unbekannte Stimuli der richtigen Kategorie, also aufwärts oder abwärts moduliert, zuordnen konnten. Mit Hilfe eines auf den AC gerichteten 18-Elektroden-Arrays konnte für diesen Übergang von der Diskriminierung der Richtung der Modulation der FMs hin zur Kategorisierung von aufsteigenden und abfallenden Ton-Frequenzen ein elektrophysiologisches Korrelat gefunden werden (Ohl *et al.*, 2001). Ferner zeigten Läsionsstudien, dass der AC des Gerbils für die Diskriminierung der Richtung der Modulation von FMs, nicht aber für die Unterscheidung von reinen Tönen von großer Bedeutung ist (Wetzell *et al.*, 1998a; Ohl *et al.*, 1999). So führte die bilaterale oder die unilateral-rechtsseitige Entfernung des ACs mittels Thermokoagulation zu einer massiven Beeinträchtigung der FM-Diskriminierungsreaktion.

Zusammenfassend weisen die Befunde darauf hin, dass der AC des Gerbils eine kritische Rolle für die Diskriminierung der Modulationsrichtung von FMs spielt. Es bleibt die Frage offen, ob sich diese Rolle auf sensorische Mechanismen der FM-Verarbeitung beschränkt oder ob der AC auch in Aspekte des Lernens und der Gedächtnisbildung involviert ist. Über zelluläre und molekulare Vorgänge im AC des Gerbils oder auch anderer Mammalia nach Erwerb einer FM-Diskriminierungsreaktion ist bislang nichts bekannt.

1.3. Zielstellung

Phänomene neuronaler Plastizität im Rahmen der Langzeitgedächtnisbildung sind an Änderungen der Genexpression auf Ebene der Transkription und/oder Translation involvierter Neuronen gebunden. Bisherige Studien am auditorischen Kortex des Gerbils weisen auf eine Schlüsselstellung dieser Hirnregion für das Erlernen einer Reaktion zur Diskriminierung der Modulationsrichtung frequenzmodulierter Töne hin. Als Beitrag zur Klärung der Frage, ob die Bedeutung des auditorischen Kortex für FM-Diskriminierungslernen sich in rein sensorischen Phänomenen der FM-Verarbeitung erschöpft oder aber Aspekte des Lernens und der Gedächtnisbildung beinhaltet, wurde die vorliegende Arbeit mit den folgenden Fragestellungen vorgenommen:

1. Ist die Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses für die FM-Diskriminierungsreaktion des Gerbils sensitiv gegenüber der Gabe von Proteinsynthesehemmstoffen in den auditorischen Kortex?
2. Sind nach Training zum Erwerb einer FM-Diskriminierungsreaktion im auditorischen Kortex des Gerbils Änderungen der Genexpression auf Ebene der Transkription nachweisbar?

2. Material und Methoden

2.1. Verhaltensexperimente

2.1.1. Tiermaterial

Für die Versuche wurden adulte männliche Mongolische Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*, Gerbil) verwendet. Die Tiere waren mindestens 3 Monate alt und wogen zwischen 70 - 100 g. Sie stammten aus der Eigenzucht des Institutes sowie von der Firma Charles River Inc. Die Haltung der Gerbils erfolgte in Gruppen zu je 5 Tieren in einer Plastschale (36 x 36 x 15 cm). Die Lufttemperatur im Raum variierte zwischen 21 und 24 °C, die relative Luftfeuchte zwischen 40 und 50 %. Durch künstliche Beleuchtung von 6.00 bis 18.00 Uhr wurde ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h Phasenlänge eingestellt. Die Versuche waren tierschutzrechtlich genehmigt (Genehmigungs-Nr. 53b-42502/2-111/150; IfN MD).

2.1.2. Lernparadigma

In dem hier benutzten Lernmodell, dem FM-Diskriminierungslernen, standen die Tiere vor der Aufgabe, die Richtung der Frequenzmodulation eines akustischen Signals zu unterscheiden. In Abhängigkeit von der Modulationsrichtung dieses Signals war in der Lernapparatur innerhalb einer vorgegebenen Zeit das Kompartiment zu wechseln bzw. im selbigen sitzen zu bleiben (Wetzel *et al.*, 1998b).

Lernapparatur

Die Lernapparatur setzte sich aus einem computergestützten Steuerteil und einer sogenannten Shuttle-Box (E10-15, Coulbourn Instruments) zusammen. Die Shuttle-Box war dabei in einer schallgeschützten Kammer untergebracht. Durch ein Sichtfenster konnte das Training verfolgt werden, und über das Steuerteil notwendige Einstellungen, wie z.B. die Höhe der Strafreize, vorgenommen werden. Die Überwachung des gesamten Trainings erfolgte mittels eines Computers, welcher auch alle gemessenen Parameter erfasste. Ein dafür notwendiges Programm wurde von Herrn T. Wagner (IfN, Abteilung Akustik, Lernen, Sprache) entwickelt. Die Shuttle-Box (18 x 16 x 22 cm) wurde durch eine 3 cm hohe Metallhürde in zwei Kompartimente unterteilt. Ein Metallgitter bildete die Bodenfläche, über die ein elektrischer Fußreiz appliziert werden konnte. Die Shuttle-Box wurde mit einem Deckel verschlossen, an dem zwei Lautsprecher (Visaton) angebracht waren. Die dargebotenen Frequenzen waren künstlich

digitalisiert und über eine kommerzielle Soundkarte analog umgewandelt worden. Die Ausgabe der Töne über die Lautsprecher wurde mit einem Spektrumanalysator von Bruel & Kjaer kontrolliert.

Lernexperiment

Das Training fand täglich in der Zeit zwischen 7.00 und 14.00 Uhr statt. Das Intervall zwischen zwei Trainingssitzungen betrug 24 ± 1 h. Der Gerbil wurde zu Beginn für 3 min in die Shuttle-Box gesetzt (Habituation), um sich an die Umgebung zu gewöhnen. Während dieser Zeit wurde die sogenannte Startaktivität (SA, Explorationsaktivität) ermittelt, d.h. die Häufigkeit des Kompartimentwechsels während der Habituationszeit. Das anschließende Training umfasste 60 Läufe. Die Tiere mussten lernen, zwischen 2 linear frequenzmodulierten Tönen (FM) als bedingte Reize zu diskriminieren (CS = bedingter Reiz, 65 - 70 dB, 250 ms Dauer, 250 ms Intervall). Diese Töne überstrichen den gleichen Frequenzbereich zwischen 1 und 2 kHz und unterschieden sich lediglich in der Richtung der Modulation (aufwärts, abwärts). Beide CS wurden den Gerbils jeweils für 6 s präsentiert. Bei Darbietung des aufwärtsmodulierten FM (CS+; 1 - 2 kHz) mussten die Tiere innerhalb von 6 s das Kompartiment wechseln, ansonsten folgte anschließend für bis zu 4 s ein milder elektrischer Fußschock von 200 - 500 μ A (FS, UCS = unbedingter Reiz). Sobald die Tiere aber die gegenüberliegende Seite erreichten, endeten Ton und Fußreiz. Die Höhe des Fußschocks wurde für jedes Tiere zu Beginn einer jeden Trainingssitzung individuell eingestellt. Die Anfangsstärke betrug dabei 250 μ A. Übersprangen die Gerbils aber während der ersten 6 s der Darbietung des CS+ die Hürde, wurde diese Antwort als korrekte konditionierte Reaktion (*correct conditioned response*, CR+) gewertet. Im Gegensatz dazu sollten die Tiere beim abwärtsmodulierten FM (CS-; 2 - 1 kHz) die Seite nicht wechseln. Wenn die Gerbils während der Präsentation des CS- (6 s) das Kompartiment verließen, bekamen sie auf der anderen Seite einen Strafreiz von 300 μ A und diese Reaktion wurde als CR- (falsche Antwort) gewertet. CS+ und CS- wurden je 30 mal in pseudorandomisierter Reihenfolge dargeboten. Die Länge der Pausen zwischen den einzelnen Läufen variierte zwischen 5 - 15 s. Kompartimentwechsel der Tiere während dieser Zeit wurden vom Computer als ITC (*intertrial crossing*) gemessen.

Darstellung und statistische Bearbeitung der Verhaltensdaten

Die Auswertung der Versuche erfolgte mittels des StatView 5.0.1 (Abacus) Programms. Es wurden folgende Werte herangezogen: Diskriminierungsleistung (D; Differenz aus CR+ und

CR-), CR+, CR-, ITC und SA. Für die statistische Auswertung wurde mit einer ANOVA (Varianzanalyse) gearbeitet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ diente als Kriterium für statistisch signifikante Unterschiede. Konnten signifikante Unterschiede detektiert werden, so wurden zusätzlich weitere parametrische Tests herangezogen: der t-Test für unabhängige Stichproben, um die Behandlungsgruppen an einzelnen Trainingstagen miteinander zu vergleichen, und der t-Test für abhängige Stichproben, um Unterschiede zwischen verschiedenen Trainingstagen innerhalb der Behandlungsgruppen zu testen.

2.1.3. Intrakortikale Injektionen

2.1.3.1. Operative Eingriffe

Die Operation, um den Zugang zum AC zu ermöglichen, erfolgte generell einen Tag vor der Injektion. Bereits in vorhergehenden Arbeiten wurden die Prozedur für die Operation und die sich anschließenden intrakortikalen Substanzapplikationen beschrieben (Richter *et al.*, 1999; Budinger *et al.*, 2000b). Die Tiere wurden dafür tief anästhesiert (0,3 ml/100 g Körpermasse des Gerbils) mit einer Mischung aus 2 % Rhompun (Bayer) und 50 mg/ml Ketanest (Parke-Davis) im Verhältnis 1:4. Dann erfolgte die Rasur der Kopfhaut und die Desinfektion. Die Kopfhaut wurde anschließend zwischen Auge und Ohr eingeschnitten. Der dort befindliche Temporalmuskel konnte dann entfernt und der Knochen gesäubert werden. Drei Löcher mit ca. 1 mm Durchmesser wurden bilateral oder unilateral oberhalb der auditorischen Felder AI, AAF bzw. DP/VP gebohrt. Für die Platzierung der Bohrungen konnte man sich sehr genau am durch den Schädelknochen sichtbaren kortikalen Gefäßmuster des Gerbils orientieren (Hess und Scheich, 1996; Sugimoto *et al.*, 1997) (siehe Abb. 2.1). Zur exakten Platzierung der Löcher wurden stereotaktische Koordinaten aus früheren Arbeiten verwendet (Scheich *et al.*, 1993a; Thomas *et al.*, 1993). Die Wundränder wurden anschließend mit Volon A Salbe (Sqibb) behandelt.

2.1.3.2. Substanzapplikationen

Die Tiere wurden für die Injektionen mit 4 % Halothan (Eurim-Pharm) initial tief anästhesiert. Im weiteren Verlauf des Experiments wurde die Konzentration am Verdampfer (Halothan Vapor 19.3; Dräger) auf 1,5 - 2 % eingestellt. Die Injektionen erfolgten mit Hilfe eines Nanoliter-Injektionssystems (WPI) und einer dort befestigten Glaspipette (Durchmesser 20 μm), die mit einem *Micropipette Puller* (Sutter Instrument) auf einer Seite künstlich verengt worden war. Über diese Pipette wurde die entsprechende Substanz oder die zu dessen Lösung verwendete

Flüssigkeit in den AC appliziert. Die Mikropipette wurde ca. 1 mm tief in dorsoventraler Richtung und tangential zur Kortexoberfläche eingestochen. Es wurde jeweils 1 µl Lösung pro Bohrung mit einer Geschwindigkeit von 23 nl pro 5 s appliziert. Die Injektionsgebiete sind schematisch in Abb. 2.1c dargestellt. Insgesamt waren ca. 20 min für eine bilaterale Injektion nötig. Die Gerbils erwachten ca. 5 min nach Beendigung der Injektionen.

Folgende Substanzen wurden für Injektionen in den AC zu verschiedenen Zeitpunkten vor oder nach dem FM Diskriminierungslernen verwendet:

- Anisomycin (ANI):** 5 mg Anisomycin (Sigma) wurde in 1 M HCl gelöst und mit 1 M NaOH auf pH 7 titriert. Dann erfolgte die Einstellung der gewünschten Konzentration (66 mM und 113 mM) mit steriler isotonischer Kochsalzlösung (0,9 %, B. Braun).
- Emetin (EME):** Es wurden 5 mg Emetin (Sigma) in steriler isotonischer Kochsalzlösung gelöst. Die Titrierung des pH-Wertes erfolgte mittels 1 M NaOH auf pH 7 und dann wurde mit 0,9 % NaCl auf die Konzentration von 15 mM (8,3 µg/µl) eingestellt.
- Rapamycin:** 100 µg Rapamycin (Calbiochem) wurden in 50 µl Ethanol gelöst. Durch Verdünnung mit 0,9 % NaCl wurden Injektionslösungen einer Konzentration von 60 nM Rapamycin in 0,03 ‰ Ethanol/NaCl hergestellt.
- FK506:** Für die Applikationen von FK 506 (Calbiochem) wurde ebenfalls eine Stammlösung mit einer Konzentration von 20 µg/µl in Ethanol hergestellt. Eine Verdünnung erfolgte in 0,9 % isotonischer Kochsalzlösung zu einer Konzentration von 6,0 ng/µl = 7,3 mM FK506 in 0,03 ‰ Ethanol/NaCl.

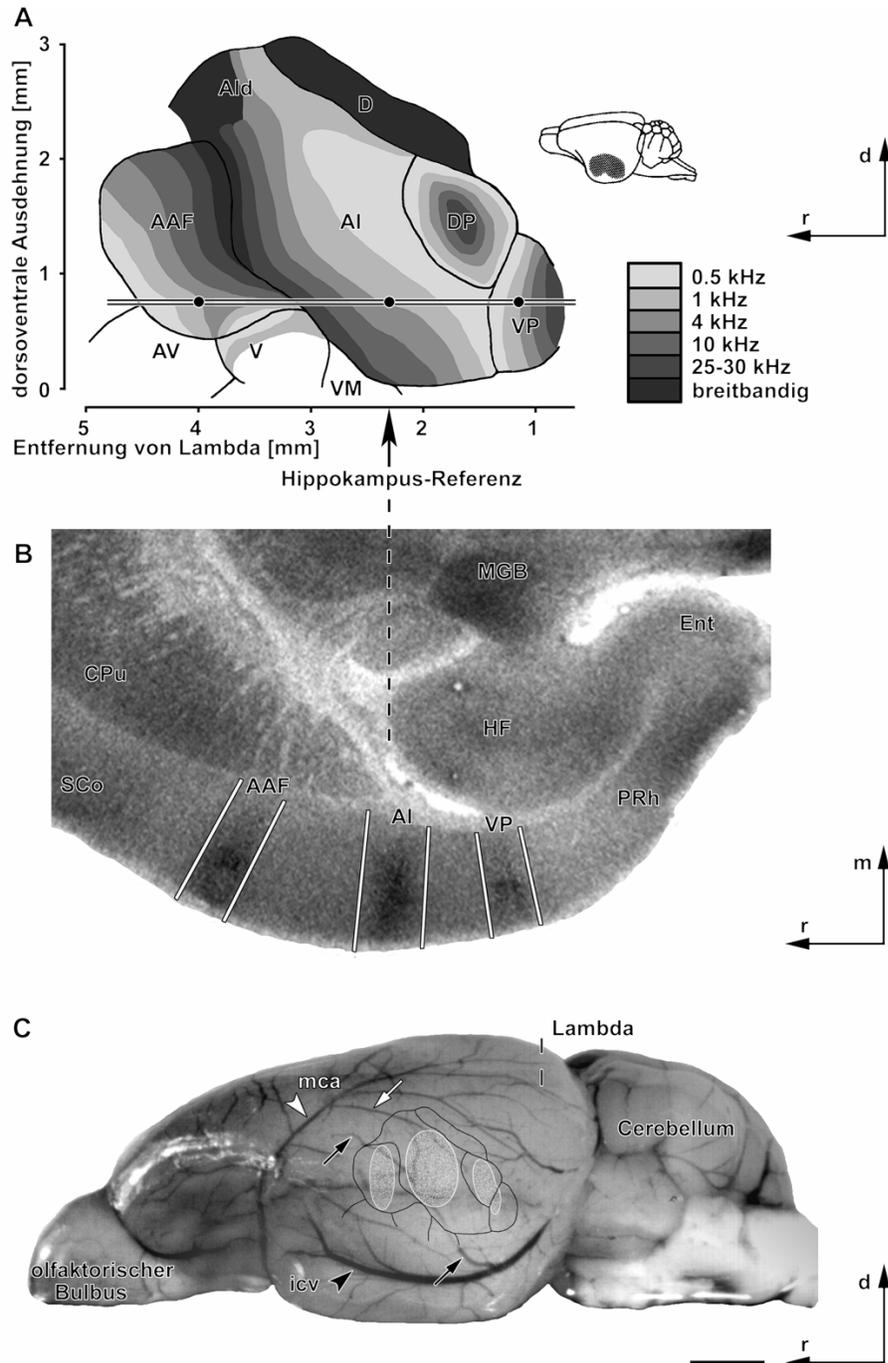


Abb. 2.1 Übersichtsbild des auditorischen Kortex des Gerbils (entnommen aus Budinger *et al.*, 2000a). **A** Elektrophysiologische Karte (nach Thomas *et al.*, 1993), in der die Frequenzrepräsentation innerhalb der Felder (Legende) schematisch dargestellt ist. **B** Autoradiogramm eines horizontalen 2DG-Schnittes. Die radialen Kolumnen erhöhter 2DG-Akkumulation (durch weiße Balken für AI, AAF und VP hervorgehoben) entstanden durch akustische Stimulation mit Tönen um ca. 1,5 kHz. Die Isofrequenzlinien aus A stimmen mit den erhöhten 2DG-Akkumulationen in B hinsichtlich ihrer Lage zur Hippokampus-Referenz überein. **C** Die Injektionsgebiete in AI, AAF, DP/VP (weiß schattierte Areale) wurden entsprechend stereotaktischer Koordinaten relativ zu Lambda und anhand eindeutiger Merkmale des kortikalen Gefäßmusters platziert. Das überlagerte Schema der funktionellen Organisation des AC des Gerbils entspricht der funktionellen Karte in A. Skalierung = 2,5 mm. m medial; r rostral; d dorsal; icv untere Cerebralarterie; mca mittlere Cerebralarterie

2.2. Analysen zur Veränderung der Genexpression nach FM-Diskriminierungstraining

Nach Abschluss der Studien mit verschiedenen Proteinsyntheseinhibitoren sollte die Frage geklärt werden, ob es zu einem späten Zeitpunkt (5 h) nach dem FM-Diskriminierungstraining zu Veränderungen in der Genexpression im AC kommt. Um mRNAs zu finden, deren Expressionsniveau nach Stimulation verändert sind, ist die Methode der *suppression subtractive hybridisation* (SSH) geeignet. Zur weiteren Verifizierung, ob sich die Expression der mRNAs der mittels SSH erhaltenen cDNAs änderte, wurde Northern-Blot-Hybridisierung und nicht-radioaktive *in situ*-Hybridisierung (ISH) angewendet. Die Northern-Blot-Hybridisierung wurde durchgeführt mit 1.) Blots von mRNA aus dem AC von trainiert und untrainierten Gerbils und 2.) zur weiteren Charakterisierung mit Blots von mRNA aus Kortex und Hippokampus von Kainat- oder NaCl-behandelten Tieren.

2.2.1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien (Qualität: zur Analyse) wurden von den Firmen Boehringer/Roche, Fluka, Gibco Life Technologies, Merck, Roth, Serva und Sigma-Aldrich bezogen. Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Lösungen mit sterilem, deionisiertem Wasser angesetzt.

2.2.2. Kits und Enzyme

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Calf Intestine Phosphatase (CIP)	Boehringer Roche
First-Strand cDNA Synthesis Kit	Amersham Pharmacia Biotech
DIG RNA Labelling Kit	Roche
Deoxynucleoside Triphosphate Set (dNTP-Mix)	Boehringer/Roche
1kb DNA Ladder	Eurogentec, MBI Fermentas
Megaprime™ DNA labelling System	Amersham
NucleoTrap PCR Kits	Clontech
PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit	Clontech
Primer	Gibco Life Technologies
QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Purification Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Restriktionsenzyme	NEB, Gibco
SMART™ PCR cDNA Synthesis	Clontech
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen
T4-DNA-Ligase	Boehringer/Roche

2.2.3. Vektoren

<u>Vektor</u>	<u>System</u>	<u>Hersteller</u>
pCR [®] 2.1-TOPO	TOPO [™] TA Cloning Kit	Invitrogen
pBluescript SK (+/-)		Stratagen

2.2.4. Bakterienstamm

Es wurde für alle Transformationen und zur Aufreinigung der Plasmide der E.coli XL-1 Blue MR Stamm verwendet.

2.2.5. Allgemeine Lösungen

LB Medium:	5 g Hefe Extrakt, 10 g Bacto-Trypton, 5 g NaCl, 100 µg/ml Ampicillin, ad 1000 ml H ₂ O
LB Platten:	1000 ml LB Medium, 15 g Agar,
10 x TBE:	0,89 M Tris-Base, 0,89 M Borsäure, 0,02 M EDTA
20x SSC Puffer:	3 M NaCl, 300 mM Trinatriumzitat pH 7,4

2.2.6. Krampfauslösende Stimulation mit Kainat

Die Tiere bekamen intraperitoneal entweder Kainat (Sigma) in einer Dosis von 12 mg/kg, gelöst in steriler isotonischer Kochsalzlösung (0,9 %, B.Braun), oder die adäquate Menge an steriler Kochsalzlösung injiziert. Die Dauer des Experimentes betrug 6 h. Über diesen Zeitraum wurden die Tiere beobachtet und die einzelnen Krampfstadien aufgezeichnet. Als Orientierung diente hierbei eine für die Ratte erstellte Skala für Krampfstadien von 1 bis 6 (Zhang *et al.*, 1997). Danach erfolgte die Präparation der Hippokampi und der Kortizes.

2.2.7. Präparation verschiedener Hirnregionen des Gerbils

Gerbils, die intraperitoneal Injektionen von Kainat bzw. Kochsalz erhalten hatten, wurden 6 h später dekapitiert. Hippokampi sowie Kortizes wurden auf einer eisgekühlten Petrischale präpariert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Es wurden ausschließlich Gehirne von solchen Kainat-behandelten Gerbils verwendet, bei denen während der 6 h eindeutig die Krampfstadien 5 oder 6 beobachtet wurden.

Gerbils, die, wie unter 2.1.2 beschrieben, trainiert worden waren, wurden 5 h nach Beendigung des Trainings dekapitiert. Als Kontrollen dienten untrainierte Gerbils, die den gleichen Zeitraum unbeeinflusst in ihrem Heimatkäfig verbrachten. Die Gehirne wurde entnommen und die Kortizes vorsichtig abgetrennt. Anhand des Gefäßmusters (Abb. 2.1) wurden der rechte und linke AC auf einer eisgekühlten Petrischale unter dem Binokular herauspräpariert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Bis zur weiteren Aufarbeitung erfolgte die Aufbewahrung aller Gewebeproben bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.8. Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Minimierung von Kontaminationen durch Ribonukleasen und der damit verbundenen Gefahr der Degradation der RNA wurden die im folgenden beschriebenen Maßnahmen angewandt:

- Bei allen Arbeitsschritten wurden OP-Handschuhe getragen.
- Alle verwendeten Glas- und Plastmaterialien wurden über Nacht mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Glasmaterialien wurden dann 4 h bei $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt, Plastmaterialien 20 min bei $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ autoklaviert und mehrere Stunden bei $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet.
- Sämtliche Lösungen, mit Ausnahme Tris- oder SDS-haltiger Lösungen, wurden mit 0,1 % (v/v) DEPC behandelt, 2 - 4 h auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt und anschließend autoklaviert. Trishaltige Lösungen wurden steril in DEPC-Wasser (DEPC-Wasser = H_2O deionisiert, 30 min mit 0,1 % (v/v) DEPC behandelt und autoklaviert) angesetzt und autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen, wie SDS, wurden mit DEPC- H_2O angesetzt und steril filtriert.
- Elektrophoresekammern und deren Zubehör wurden mit Detergenz gewaschen und mit DEPC-Wasser sowie Ethanol gespült. Nach Behandlung mit 3 % (v/v) H_2O_2 für 10 min bei Raumtemperatur, erfolgte eine abschließende Spülung mit DEPC behandeltem Wasser.

Für die Präparation der Gesamt-RNA wurde TRIzol Reagenz (Life Technologies-BRL) verwendet. TRIzol ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Isothiozyanat und stellt eine Modifizierung der von Chomczynski und Sacchi (1987) entwickelten Methode dar. Die unten angegebenen Mengen sind für die Isolation von Gesamt-RNA aus 50 - 100 mg Gewebe geeignet. Bei davon abweichenden Gewebemengen wurde darauf geachtet, dass der Gewebeanteil im Homogenat 10 % (w/v) nicht übersteigt. Das noch gefrorene Gewebe wurde in 1 ml TRIzol mit Hilfe eines Ultra Turaxx T5 FU (IKA) ca. 1 min homogenisiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit 200 μl Chlorform vermischt und 2 - 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation wurde die wässrige von der organischen Phase getrennt und zur Präzipitation der RNA mit 0,5 ml Isopropanol versetzt und zentrifugiert. Das RNA-Präzipitat wurde in 50 μl DEPC-Wasser 10 min bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelöst. Durch die Messung der Adsorption bei 260 nm und 280 nm konnte die Konzentration und

die Reinheit der RNA wie folgt ermittelt werden: 1 OD₂₆₀ (Optische Dichte bzw. Absorption bei 260 nm) entspricht 40 µg RNA pro ml, der Quotient aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ lag zwischen 1,8 und 2,0, was für eine hohe Reinheit der RNA spricht (Sambrook *et al.*, 1989). Bis zur Verwendung wurde die RNA bei -70 °C aufbewahrt.

2.2.9. Subtraktive Hybridisierung

Die hier verwendete, abgewandelte Methode der subtraktiven Hybridisierung, die SSH, ist geeignet, um zwei verschiedene mRNA-Populationen miteinander zu vergleichen (Diatchenko *et al.*, 1996; Gurskaya *et al.*, 1996). Die Methode basiert auf der Möglichkeit, sogenannte Adaptoren an cDNA-Fragmente anzuheften, um selektiv die Amplifikation von nicht differentiell exprimierten Transkripten in PCR-Reaktionen zu unterdrücken. Durch die SSH werden vorzugsweise solche Gene erfasst, die in einem von zwei zu vergleichenden Zell- oder Gewebetypen eine veränderte Expression aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit, wurde für die SSH der PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech) genutzt. Dazu wurde RNA aus dem AC von 5 untrainierten und 5 trainierten (5 h nach FM-Diskriminierungslernen, siehe 2.2.8) Gerbils isoliert. Es erfolgte eine Änderung des vom Hersteller empfohlenen Protokolls dahingehend, dass für die ersten Schritte, das Umschreiben der RNA in cDNA mittels RT-PCR, der SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit genutzt wurde. Dieses System bietet die Möglichkeit, cDNA über die gesamte Länge der mRNA-Moleküle herzustellen. Somit stand auch genügend Ausgangsmaterial für die SSH zur Verfügung. Die cDNA von trainierten Gerbils wird im folgenden als *tester*-cDNA und die cDNA von naiven Kontrolltieren als *driver*-cDNA bezeichnet (Übernahme dieser Termini aus dem Handbuch des Kits).

2.2.9.1. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit dem SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech) entsprechend der Empfehlung des Herstellers durchgeführt, der Ablauf ist in Abb. 2.2 schematisch dargestellt. Die RT-PCR startet mit der Bindung eines oligo (dT)-Primer (CDS Primer) am polyA⁺ Ende einer mRNA. Wenn die Reverse Transkriptase das 5'-Ende der mRNA erreicht, synthetisiert sie durch ihre Terminale-Transferase-Aktivität zusätzlich einige Nukleotide, vorrangig Deoxycytidin (dC), an die cDNA. An diesen Oligo-dC-Überhang bindet nun das SMART™-Oligonukleotid, welches eine oligo (dG)-Sequenz an seinem 3'-Ende besitzt

und bildet so eine verlängerte Vorlage für die Reverse Transkriptase. Für die Zweitstrangsynthese konnten dann die Sequenzen des SMART™-Oligonukleotides und des Primer genutzt werden.

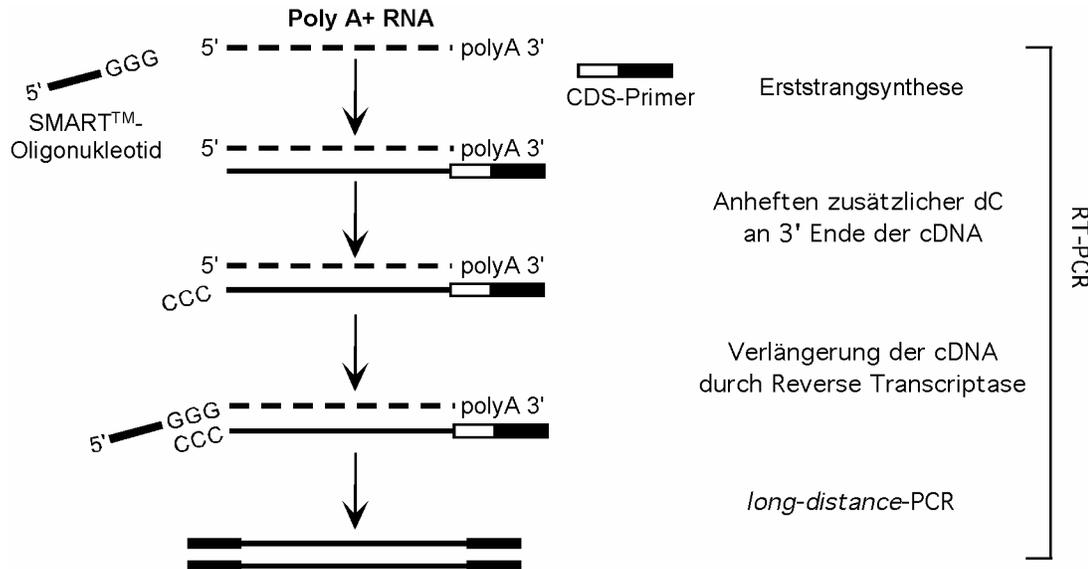


Abb. 2.2 Schematische Darstellung der cDNA Synthese mit dem SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (modifiziert nach dem Handbuch des SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech))

Erststrang-cDNA-Synthese

1 µg Gesamt-RNA aus dem AC von trainierten und untrainierten Tieren sowie einer Kontroll-RNA aus dem Kit (1 µg/µl) wurden für die Erststrangsynthese verwendet. Die Kontroll-RNA war menschliche Plazenta-RNA, die zur Überprüfung der cDNA-Synthese bis zum *RsaI*-Verdau nach Empfehlung des Herstellers mitgeführt wurde. Für die Synthese wurden dann je 1 µl CDS-Primer und SMART™-Oligonukleotid zu der Gesamt- oder Kontroll-RNA gegeben und auf 5 µl aufgefüllt. Nach kurzer Hitzedenaturierung wurden noch folgende Substanzen hinzugefügt: 2 µl 5 x Erststrangpuffer, 1 µl 20 mM DTT, 1 µl dNTP und 1 µl MMLV Reverse Transkriptase. Die Synthese erfolgt für eine Stunde bei 42 °C. Danach wurde die Reaktion abgestoppt und sofort mit der *long-distance* (LD)-PCR begonnen.

cDNA-Amplifikation durch LD-PCR

Für die PCR verwendete man die Sequenzen des CDS-Primers und des SMART™-Oligonukleotides. Pro Probe und Kontrolle wurden jeweils drei PCR-Ansätze hergestellt, zwei davon anschließend weiter genutzt. Zu 1 µl cDNA aus der Erststrangsynthese wurden 10 µl 10 x

cDNA-PCR-Puffer, 2 µl dNTP, 2 µl 10µM PCR-Primer und 2 µl 50 x Advantage cDNA-Polymerase-Mix pipettiert. Das Gesamtvolumen einer Reaktion betrug 100 µl.

Die PCR-Bedingungen wurden für den im Labor vorhandenen Triblock (Biometra) optimiert.

95 °C	1 min
gesamt: 1 Zyklus	
95 °C	1 min
65 °C	30 s
68 °C	6 min
gesamt: 24 Zyklen	

Die PCR wurde abgestoppt, zwei Ansätze vereint und dann über Säulenchromatographie gereinigt.

2.2.9.2. Subtraktive Hybridisierung

Nach der Aufreinigung der cDNA wurden in den nächsten Arbeitsschritten die Komponenten des PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit verwendet. Die *tester*- und *driver*-cDNA wurde für den *RsaI* Verdau noch nach dem SMART-Protokoll behandelt (Empfehlung des Herstellers). Der schematische Ablauf der subtraktiven Hybridisierung ist in Abb. 2.3 dargestellt.

RsaI Verdau

Die gereinigte cDNA wurde mit einem Restriktionsenzym, *RsaI*, geschnitten, so dass die entstehenden Stücke glatte Enden besaßen. Das *RsaI* erkennt die Basensequenz 5'-GTAC-3'. Zu den gereinigten cDNAs wurden je 36 µl 10 x *RsaI*-Restriktionspuffer sowie 1,5 µl *RsaI* pipettiert. Die Ansätze inkubierten dann für 3 h bei 37 °C. Mit Hilfe des NucleoTrap PCR Kits (Clontech) erfolgte die chromatographische Aufreinigung der geschnittenen cDNA-Ansätze.

Adaptorligation

Nach der Behandlung mit *RsaI*, wurden die Reaktionsansätze geteilt und an diese je einer von zwei verschiedenen Adaptoren ligiert. Die Adaptoren besitzen an ihren Enden keine Phosphatgruppe und können so an das 5'-Ende der *tester*-cDNA binden. Ab der Adaptorligation wurde nach dem Protokoll des PCR-Select™ cDNA Subtraction Kits gearbeitet. Zur Überprüfung der SSH fand eine mRNA aus dem Skelettmuskel des Menschen (Empfehlung des Herstellers, dem PCR-Select™ Kit beigelegt) Verwendung und nicht mehr die menschliche Plazenta-RNA. Für die cDNA-Synthese bis zum *RsaI* Restriktionsansatz dieser Kontroll-RNA wurden dem Protokoll des PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit gefolgt. Nach Angaben des Herstellers wurde

1 μl Skelettmuskel-cDNA mit 2 μl einer 1:20 verdünnten ϕX174 DNA, *HaeIII*-geschnitten, gemischt. Dieses Gemisch diente als Kontroll-*tester*- und die reine Skelettmuskel-cDNA als Kontroll-*driver*-cDNA. Die Adaptoren wurden nur an die *tester*-cDNA und die Kontroll-*tester*-cDNA ligiert. Für die Reaktion wurden 5,5 μl der cDNA 1:1 mit H_2O verdünnt, wovon man jeweils 2 μl für die 2 Ansätze verwendete. Es wurde parallel ein Mastermix hergestellt, der pro Ansatz 3 μl H_2O , 2 μl Ligationspuffer und 1 μl T4-DNA-Ligase (400 U/ μl) enthielt. Zu je einem der zwei Ligationsansätze wurde entweder 2 μl des Adaptors 1 oder Adaptors 2R pipettiert. Die Inkubation der Reaktion erfolgte über Nacht bei 16 $^\circ\text{C}$.

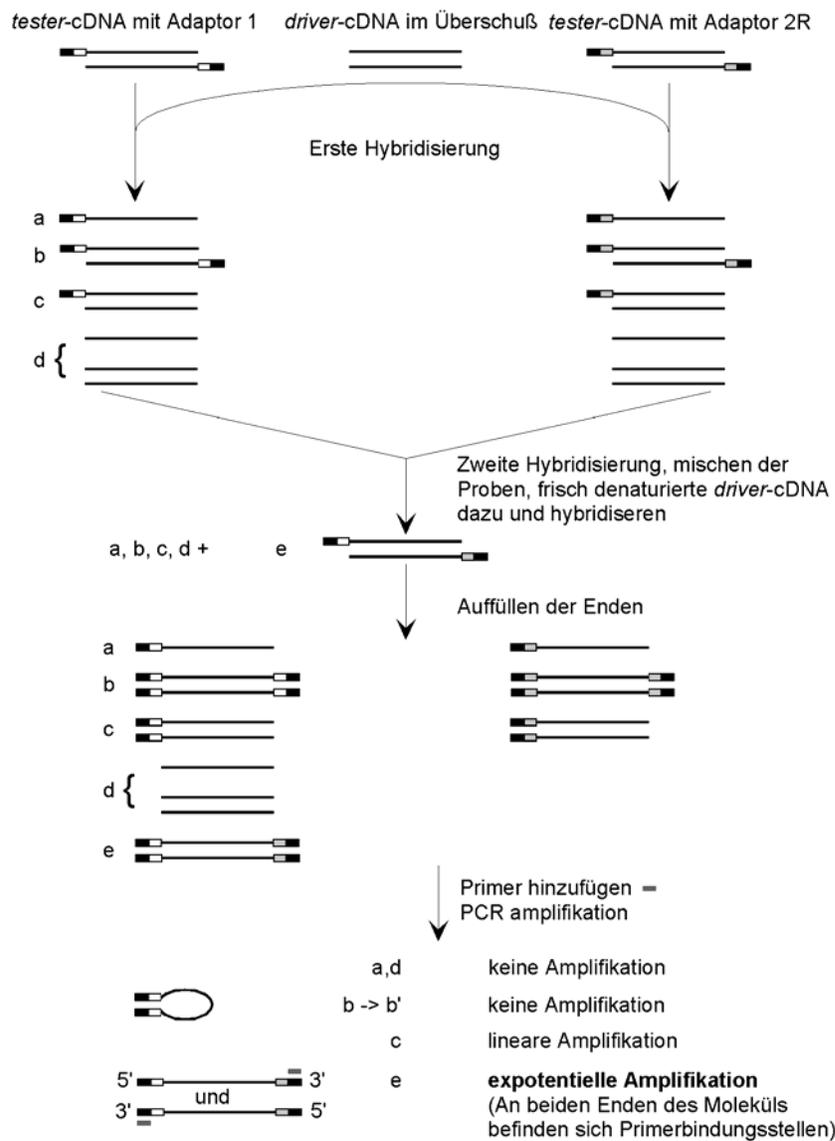


Abb. 2.3 Schematisches Ablaufschema der SSH (modifiziert nach dem Handbuch des PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech))

Erste Hybridisierung

Nach der Ligation der Adaptoren erfolgte die Hybridisierung der *driver*- und der *tester*-cDNA bzw. der Kontroll-*driver*- und der Kontroll-*tester*-cDNA in zwei einzelnen Schritten. Hierbei wurden zunächst in zwei getrennten Ansätzen ein Überschuss an *driver*-cDNA zu dem jeweiligen Ansatz der Ligation gegeben. Die Konzentrationen von häufig und weniger häufig vorkommenden cDNAs gleichen sich aufgrund der Reaktionskinetik 2. Ordnung aus. Genprodukte, welche nach Stimulation verändert sind, reichern sich als Einzelstränge an. In der ersten Hybridisierung wurde zu je 1,5 µl Ansatz der mit Adaptor 1 oder -2R ligierten *tester*-cDNA 1,5 µl der *RsaI*-verdauten *driver*-cDNA sowie 1 µl 4 x Hybridisierungspuffer gegeben. Nach kurzer Hitzedenaturierung wurden die Ansätze 8 h bei 68 °C inkubiert.

Zweite Hybridisierung

Für die zweite Hybridisierung wurden die zwei Ansätze der ersten Hybridisierung gemischt und noch mal mit frischer *driver*-cDNA versetzt. Der Ansatz wurde aber nicht mehr erhitzt, um eine Denaturierung bereits gebildeter Hybride zu verhindern. Nur einzelsträngige subtrahierte *tester*-cDNA konnte in diesem Abschnitt binden und so Hybride bilden, von denen jeweils ein Strang den Adaptor 1 und der andere Strang den Adaptor 2R trägt. Für die zweite Hybridisierung wurden zunächst 1 µl frische *driver*-cDNA gemixt mit 1 µl 4 x Hybridisierungspuffer sowie 2 µl H₂O, dann denaturiert. Dieses und die beiden Reaktionen der ersten Hybridisierung wurden miteinander vermischt. Die Inkubation der Ansätze erfolgte über Nacht bei 68 °C, danach wurden sie mit 200 µl Puffer verdünnt und für 7 min bei 68 °C erhitzt.

Erste Amplifikation mittels PCR

Während der zwei nun folgenden PCR-Reaktionen erfolgte die exponentielle Amplifikation der Hybride, welche den Adaptor 1 und 2R tragen. Im Gegensatz dazu war für Moleküle mit nur einem Adaptor nur eine lineare Vervielfältigung möglich. An Moleküle ohne Adaptor können die Primer nicht binden, es fand somit keine Amplifikation statt. Die 5'-Sequenz der Adaptoren ist komplementär zu dem PCR-Primer der ersten PCR-Reaktion. Zu Beginn wurden aber die komplementären Enden der Adaptoren 1 und 2R durch DNA-Polymerase aufgefüllt. Dazu wurden 1 µl des Hybridisierungsansatzes zu 19,5 µl sterilem H₂O, 2,5 µl 10 x PCR-Reaktionspuffer, 0,5 µl 10 mM dNTP-Mix, 1 µl 10 µM PCR-Primer 1 und 0,5 µl 50 x Advantage cDNA-Polymerase-Mix pipettiert.

Die Reaktion wurde bei 75 °C für 5 min inkubiert und anschließend erfolgte die erste PCR unter folgenden Bedingungen in einem Triblock (Biometra):

95 °C	5 min
gesamt: 1 Zyklus	
94 °C	30 s
66 °C	30 s
72 °C	1,5 min
gesamt: 30 Zyklen	

Zweite Amplifikation mittels PCR

Der 3'-terminale Teil der Adaptoren diente nun zum Anheften der PCR-Primer 1 und 2R. Die PCR-Bedingungen entsprachen denen der vorausgegangenen PCR mit Ausnahme der Hybridisierungstemperatur, welche von 66 °C auf 68 °C erhöht wurde. Die Anzahl der Zyklen betrug 15. Die PCR-Produkte aus der 1. PCR-Reaktion wurden 1:10 verdünnt und davon 1 µl mit 18,5 µl sterilem H₂O, 2,5 µl 10 x PCR-Reaktionspuffer, 1 µl 10 mM Nested PCR-Primer 1, 1 µl 10 mM Nested PCR-Primer 2R, 0,5 µl 10 mM dNTP-Mix und 50 x Advantage cDNA-Polymerase-Mix vermischt.

Ein Aliquot aus der 2. PCR, der unsubtrahierten *tester*-cDNA sowie der subtrahierten cDNA der Kontrolle (Skelettmuskel der Menschen) wurden abschließend gelelektrophoretisch getestet, um den Erfolg der subtraktiven Hybridisierung zu überprüfen.

2.2.10. Charakterisierung der erhaltenen Klone

2 µl des PCR-Produktes wurden in den pCR[®] 2.1-TOPO-Vektor mit Hilfe des TOPO[™] TA Cloning Kits inkloniert und anschließend transformiert. Jede positive Kolonie wurde auf eine LB-Masterplatte übertragen und parallel in 3 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C angezogen. Die Isolierung der Plasmide erfolgte mittels alkalischer Lyse (Birnboim und Doly, 1979; Sambrook *et al.*, 1989). Der pCR[®] 2.1-TOPO-Vektor besitzt um die Einklonierungsstelle der Fragmente zwei *EcoRI*-Schnittstellen. Daher konnte jedes Plasmid mit einem *EcoRI*-Restriktionsverdau auf ein Insert überprüft werden. Einige der Klone wurden sequenziert, um repetitive Sequenzen auszuschließen.

2.2.10.1. Transformation von Bakterien

Es wurden zur Transformation von Vektoren elektrisch kompetente Bakterien eingesetzt. Ein 60 µl Aliquot wurde auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Plasmidvektor versetzt und in eine vorgekühlte Küvette (Biorad) pipettiert. Die Elektroporation erfolgte im Gene Pulser (Biorad) bei 2500 V, 400 Ω und 25 µF. Danach wurde der Ansatz sofort in LB-Medium überführt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein kurze Zentrifugation, das Pellet wurde in 100 µl LB-Medium aufgenommen und auf einer LB-Platte ausplattiert. Diese wurde dann über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.10.2. Plasmid-Präparation (Mini-, Midipräparation)

P1-Puffer (Resuspensions-Puffer): 50 mM Tris, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase
P2-Puffer (Lyse-Puffer): 200 mM NaOH, 1 % SDS
P3-Puffer (Neutralisations-Puffer): 3 M Kalziumacetat

Die Plasmid-Mini-Präparation erfolgte mittels alkalischer Lyse nach Birnboim und Doly (1979) und Sambrook *et al.* (1989). Eine 3 ml Übernacht-Kultur wurde zentrifugiert und in 200 µl P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl P2-Puffer wurde die Bakterien vorsichtig gemischt und 1 - 5 min inkubiert. Das Lysat wurde mit 200 µl eisgekühltem P3-Puffer versetzt, danach maximal 5 min auf Eis stehen gelassen und abschließend 5 min zentrifugiert. 510 µl des Überstandes wurden mit 350 µl Isopropanol versetzt, 5 min inkubiert und wiederum zentrifugiert (5 min). Das entstandene Pellet wurde einmal mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O eluiert. Wenn die Plasmide sequenziert werden sollten oder für die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurden 3 bzw. 100 ml Übernachtkultur mit Hilfe des Plasmid Purification Kit (für Mini- oder Midipräparation, Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.10.3. Restriktion von DNA

Um DNA-Fragmente zu schneiden, wurden verschiedene Restriktionsenzyme nach Angaben der Hersteller mit einer Aktivität von 10 U pro Ansatz verwendet.

2.2.10.4. Agarose-Gelelektrophorese und Elution von DNA

Agarose:	Ultra Pure, Gibco
Ethidiumbromidlösung:	10 mg/ml in 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
5 x DNA-Probenpuffer:	0,25 % (w/v) Xylolecyanol, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 30% (v/v) Glycerin

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde je nach Größe ein 0,8 - 1,2%iges (präparatives Gel = 1,2 %) in 1 x TBE hergestellt und zu diesem 0,5 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung gegeben. Alle Proben und der Fragmentlängenstandard (siehe 2.2.2) wurden vor der Auftragung mit 5 x DNA-Probenpuffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer horizontalen Elektrophoreskammer (Biorad) mit 1 x TBE-Puffer bei einer Stromstärke von 10 V/cm. Wenn DNA-Fragmente aus dem Gel isoliert wurden, dann erfolgte dies unter UV-Licht mittels eines Skalpell. Die Eluierung der Fragmente erfolgte nach Angaben des Herstellers (Qiagen) mit dem QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit.

2.2.10.5. Sequenzierung und Sequenzanalyse der Klone

Die Sequenzierung erfolgte mit dem ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) in Kombination mit einem automatischen Sequenzierer (373 DNA Sequencer stretch, Applied Biosystems) unter Verwendung vom M13-Reverse-Primer und M13-Forward-Primer (siehe 2.2.11.1). Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mittels GCG Sequenzanalyse-Programm (Genetics Computer Group Inc. Madison, Wisconsin) analysiert und mit Sequenzen aus Datenbanken verglichen.

2.2.11. Dot-Blot-Hybridisierung

Ziel der Dot-Blot-Hybridisierung war es, mitochondriale cDNA zu identifizieren. Nach Klonierung der Klone aus dem SSH, wurden einige sequenziert. Dies diente zur Überprüfung, ob repetitive Sequenzen erhalten worden waren. Es stellte sich heraus, dass die ermittelten Sequenzen größtenteils mitochondrialer mRNA zugeordnet werden konnten. Da diese für die weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden sollten, wurde mittels Dot-Blot-Hybridisierung weitere mitochondriale cDNA identifiziert. Die in den pCR[®] 2.1-TOPO-Vektor inklonierten cDNAs aus der SSH wurden verwendet. Der pCR[®] 2.1-TOPO-Vektor besitzt Bindungsstellen für M13-reverse- und forward-Primer, mit deren Hilfe die inklonierten Produkte mittels PCR amplifiziert wurden. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden auf einer Membran immobilisiert und mit cDNA aus dem AC von trainierten oder untrainierten Tieren hybridisiert.

2.2.11.1. Amplifikation der Klone

Für jeden Klon wurde eine PCR-Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt.

Plasmid	100 ng
10 x PCR-Puffer	10 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
M13-Reverse-Primer	4 µl
M13-Forward-Primer	4 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	1 µl

M13-Reverse-Primer	5' - CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3'
M13-Forward-Primer	5' - GTA AAA CGA CGG CCA G - 3'

Nach einer Hitzdenaturierung (96 °C, 3 min) wurde die PCR-Reaktion in einem Triblock (Biometra) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

96 °C	30 s
50 °C	15 s
72 °C	3 min
gesamt: 35 Zyklen	

Ein Aliquot jeder Reaktion wurde anschließend einer 0,8 – 1 %iges Agarose-Gelelektrophorese unterzogen, um den Erfolg der Amplifikation zu überprüfen oder diese gegebenenfalls zu wiederholen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch mit dem GeneQuant (Pharmacia) bei einer Wellenlänge von 260 nm (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2.11.2. Immobilisierung der PCR-Fragmente

Methylenblau-Lösung: 0,5 M Natriumazetat-Trihydrat pH 5,2, 0,04% (w/v) Methylenblau

Für die Immobilisierung wurden die PCR-Fragmente auf eine Membran (Hybond-N, Amersham) aufgebracht. Die Membran wurde dafür in Sektoren unterteilt und jeweils ca. 250 ng eines PCR-Produktes pro Sektor aufgetragen. Die Membranen wurden danach 7 min in 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH denaturiert, anschließend zweimal 7 min in 0,2 M Tris/HCl, 2 x SSC neutralisiert und zum Schluss zweimal mit 2 x SSC gewaschen. Nach 30 min trocknen bei 80 °C erfolgte die irreversible Bindung der cDNA an die Membran (0,12 J/cm²). Die Immobilisierung der PCR-Produkte wurde durch eine Methylenblau-Färbung überprüft. Dazu wurden der Blots 15 min in 5 % (v/v) Essigsäure gebracht, dann 15 min in Methylenblau-Lösung inkubiert und abschließend durch mehrmaliges Spülen mit deionisiertem Wasser entfärbt.

2.2.11.3. Radioaktive Markierung der Sonden

Als Sonden dienten die bereits als mitochondrial identifizierten cDNAs. Die in den pCR[®] 2.1-TOPO-Vektor inklonierte cDNA wurde mittels *EcoRI*-Verdau geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und dann aus dem Agarose-Gel eluiert. Die erhaltenen cDNA-Fragmente wurden vereint und die Konzentration photometrisch bestimmt. Die Reaktion wurde mit dem Megaprime[™] DNA labelling System nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983) durchgeführt. Dabei wurden 25 ng der cDNA mit 5 µl Hexanukleotid-Primer (Nonamer) gemischt, dann 5 min hitzedenaturiert und abschließend 5 min auf Eis gestellt.

Zu diesem Ansatz wurde folgende Komponenten dazugegeben:

je 4 µl	dCTP, dGTP, dTTP
5 µl	Reaktionspuffer
2 µl	Klenow-Fragment (1 U/µl)
5 µl	(α - ³² P) dATP (6000 Ci/mmol, Amersham)

Die Markierungsreaktion wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Trennung der markierten Sonden vom Reaktionsgemisch erfolgte chromatographisch mittels MicroSpin-G50-Säulchen (AP Biotech). Die im Beckman Szintillationsmessgerät LS 6000 LL gemessene spezifische Aktivität der Sonden betrug etwa 8×10^5 cpm/µl. Für die Hybridisierung wurde die gesamten 50 µl der gereinigten Sonde eingesetzt.

2.2.11.4. Dot-Blot-Hybridisierung

Die Blots wurden als erstes in Rapid-Hyb-Puffer (Amersham) für 2 h bei 65 °C prähybridisiert. Anschließend wurde zu dem Puffer die radioaktiv markierte, frisch denaturierte Sonde gegeben. Die Hybridisierung erfolgte für 2 h bei 65 °C. Die Membranen wurden nach Entfernen der Sonde wie folgt gewaschen:

1 x 20 min	bei Raumtemperatur in 5 x SSC; 0,1 % (w/v) SDS
2 x 20 min	bei 65 °C in 1 x SSC; 0,1 % (w/v) SDS
2 x 20 min	bei 65 °C in 0,1 x SSC; 0,1 % (w/v) SDS

Die Waschschrte wurden mittels Geiger-Müller-Zählrohr überprüft. Die Autoradiographie der hybridisierten Blots erfolgte entweder auf Kodak X-Omat[™] AR Röntgenfilmen oder auf Phospho-Imager Platten BAS III (für Fujix BAS1000 Bioimager, Fuji). Die Filme wurden mit dem Röntgenentwicklungsautomaten Curix 60 (Agfa) entwickelt.

2.2.12. Klonierung von BDNF-, Activin- β A- und GAPDH-cDNA

Zur Klonierung dieser drei cDNAs wurde Gesamt-RNA vom AC eines naiven Gerbils isoliert (siehe 2.2.8). Die RT-PCR erfolgte unter Verwendung des First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia). Hierzu wurden zu 1 μ g total RNA 11 μ l Bulk First Strand Reaction Mix, 1 μ l pd-(N)₆-Primer, 1 μ l 200 mM DTT bis zu einem Endvolumen von 33 μ l gegeben und die Reaktion 1 h bei 37 °C inkubiert. Für die PCR-Synthese von BDNF-, Activin- β A- und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)-cDNA wurden folgende Komponenten gemischt:

1 μ l	cDNA
10 μ l	10 x PCR-Puffer
20 μ l	5 x Q-Solution
1 μ l	25 mM MgCl ₂
2 μ l	10 μ M Reverse-Primer
2 μ l	10 μ M Forward-Primer
2 μ l	10 mM dNTP-Mix
0,5 μ l	5 U/ μ l <i>Taq</i> -DNA-Polymerase
	Wasser ad 100 μ l

Die Primer und die cDNA wurden erst während einer Hitzedenaturierung von 5 min bei 95 °C hinzugefügt.

PCR-Parameter:	95 °C	30 s
	62 °C	30 s
	72 °C	30 s
	gesamt: 5 Zyklen	
	95 °C	30 s
	72 °C	1 min
	gesamt: 30 Zyklen	

Tab. 2.1 Primersequenzen für die Amplifizierung von BDNF, Activin- β A und GAPDH, die Restriktionsschnittstellen wurden unterstrichen

BDNF-Reverse-Primer	5' – CGCG <u>AATTC</u> CTATCTTCCCCTTTTAATGGTC – 3'
BDNF-Forward-Primer	5' – TCTGGATCCCGTGTGTGACAGTATTAGCGA – 3'
Activin- β A-Reverse-Primer	5' – CGCG <u>AATTC</u> GGATGGTGACTTTGGTCCTG – 3'
Activin- β A-Forward-Primer	5' – TCTGGATCCTGAAGAAGAGACCCGATGTC – 3'
GAPDH-Reverse-Primer	5' – CGCG <u>AATTC</u> ACACGGAAGGCCATGCCAGT – 3'
GAPDH-Forward-Primer	5' – TCTAAGCTTCCAAGGTCATCCATGACAAC – 3'

Eine Kontrolle der PCR auf korrekte Größe erfolgte mittels elektrophoretischer Fraktionierung in 1,2%igen (w/v) Agarose-Gelen. Über Schnittstellen für *EcoRI* und *BamHI* bzw. *BamHI* und *HindIII* an den 5'-Enden der Primer (siehe Tab. 2.1) wurden die PCR-Fragmente in das pCR-Script Amp SK (+/-)-Plasmid ligiert. Für die Ligation wurde eine ATP-abhängige T4-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Das Verhältnis des zu klonierenden DNA-Fragmentes zum Vektor war 3:1. Der Ligationsansatz wurde 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C inkubiert.

2.2.13. Expressionsanalyse durch Northern-Blot-Hybridisierung

Zur Analyse der Expressionsänderungen ausgewählter Gene auf RNA-Ebene wurden je 15 µg Gesamt-RNA aus dem AC von untrainierten und trainierten (5 h nach initialem Training dekapitiert) Gerbils sowie Gesamt-RNA aus Kortex und Hippokampus von Kainat- und NaCl-behandelte Tiere verwendet.

2.2.13.1. Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese und Northern-Blot-Hybridisierung

10x MOPS:	200 mM MOPS, 50 mM Natriumazetat, 10 mM EDTA, pH 8,0
Glycerin/Bromphenolblau:	0,5 ml 10 % (w/v) SDS, 4 mg Bromphenolblau, 5 ml Glycerol, 0,5 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0, ad 10 ml DEPC-Wasser
RNA-Probenpuffer:	200 µl 37 % Formaldehyd, 100 µl 10 x MOPS, 500 µl Formamid, deionisiert, 200 µl Glycerin/Bromphenolblau, ad 1 ml DEPC-Wasser
Präparation des RNA-Gels:	2,5 g Agarose (Gibco BRL) in 150 ml DEPC-Wasser und 25 ml 10 x MOPS aufkochen, dann auf ca. 60 °C abkühlen, 45 ml 37 % Formaldehyd und 30 ml DEPC-Wasser zugeben

15 µg (in 5 µl DEPC-H₂O) Gesamt-RNA wurden gemischt mit 20 µl RNA-Probenpuffer, für 15 min bei 68 °C hitzedenaturiert und anschließend 5 min auf Eis gestellt. Die Proben wurden auf ein horizontales 1%iges (w/v) denaturierendes Agarose-Gel geladen. Die Elektrophorese fand in 1 x MOPS-Puffer bei einer Feldstärke von ungefähr 1 V/cm statt, wobei der Laufpuffer ständig zirkulierte. Nach kurzem Abspülen des Gels mit 20 x SSC, wurde die RNA durch Kapillarblotting über Nacht in 20 x SSC auf eine Nylonmembran (Hybon-N, Amersham) transferiert. Die Blots wurden anschließend 30 min bei 80 °C getrocknet und dann die RNA mittels UV-Licht (0,12 J/cm²) irreversibel an die Membran gebunden. Um die Effektivität des Transfers und die Qualität der RNA zu überprüfen wurde die Nylonfilter einer Methylenblau-Färbung unterzogen (siehe 2.2.11.2).

2.2.13.2. Herstellung der cDNA-Sonden

Die in den pCR-Script Amp SK (+/-)-Vektor klonierte cDNA der Transkripte für BDNF, Activin- β A sowie GAPDH wurden über die jeweiligen Restriktionsschnittstellen der Primer ausgeschnitten (siehe 2.2.12). Für die Klone aus der SSH wurden die *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen des PCR[®] 2.1-TOPO-Plasmids genutzt. Zur Aufreinigung der Sonden wurde der Restriktionsansatz auf ein präparatives 1 - 1,2%iges (w/v) Agarose-Gel aufgetragen. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde die entsprechenden Banden ausgeschnitten und die cDNA mit dem QIAEX II Gel Extraktionskit (Qiagen) eluiert. Die Konzentrationsabschätzung der DNA im Vergleich zu einem DNA-Standard geschah wiederum über eine Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.13.3. Radioaktive Markierung der Sonden

Die Markierungsreaktion erfolgte wie unter 2.2.11.3 beschrieben. Für jeden Ansatz wurden 25 ng der jeweiligen Sonde eingesetzt. Die spezifische Aktivität der markierten Sonden betrug ca. $6 - 9 \times 10^5$ cpm/ μ l. Zu jedem Hybridisierungsansatz wurden die gesamten 50 μ l der gereinigten Sonde gegeben.

2.2.13.4. Northern-Blot-Hybridisierung

50 x Denhardt's Lösung: 1 % (w/v) Ficoll 400, 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon, 1 % (w/v) BSA Fraktion V (Sigma)
Hybridisierungslösung: 1 % (w/v) SDS, 5 x Denhardt's Lösung, 5 x SSC, 50 % (v/v) Formamid, deionisiert (Roth)

Die Hybridisierung erfolgte in Glasflaschen (Biometra) in einem Hybridisierungssofen (Biometra). Zu Beginn wurden die Blots 2 h bei 65 °C im Hybridisierungspuffer mit frisch denaturierter Heringssperma-DNA (10 mg/ml, Serva) prähybridisiert. Dann konnte die frisch denaturierte Sonde in den Puffer dazu gegeben werden. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C. Anschließend wurden die Membranen 1 x 20 min bei Raumtemperatur mit 2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS, 2 x 15 min bei 65 °C mit 1 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS und 2 x 15 min bei 65 °C mit 0,1 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS gewaschen. Die Effektivität des Waschvorganges wurde mit einem Geiger-Müller-Zählrohr überwacht.

2.2.13.5. Autoradiographie und Auswertung der Autoradiogramme

Northern-Blots wurden in noch feuchtem Zustand in SeranTM Folie eingewickelt. Zur Detektion wurden die Membranen auf Phospho-Imager-Platten exponiert und für jede Sonde verschiedene Zeiten der Exposition ausgetestet. Die Auswertung der Platten erfolgte mit einem BAS Reader 1000 (Fuji). Um mögliche Unterschiede in der Beladung einzelner Bahnen, d. h., Differenzen im RNA-Gehalt, feststellen zu können, wurden die hybridisierten Membranen jeweils einer Nachhybridisierung mit GAPDH unterzogen (siehe 2.2.12). Die erhaltenen Bilder wurden mit dem TINA 2.0 Programm (Raytest) aufgearbeitet.

2.2.14. Nicht-radioaktive *in situ*-Hybridisierung

Die Methode der *in situ*-Hybridisierung (ISH) dient dem Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen (RNA, DNA) in Zellen, Geweben oder Chromosomen. Damit lässt sich eine Nukleinsäure direkt im biologischen Präparat = *in situ*, also vor Ort, lokalisieren, was somit zur Aufklärung der räumlichen und zeitlichen Expression von Genen oder RNAs beiträgt. Als Sonden dienen Abschnitte einzelsträngiger DNA oder RNA, die den entsprechenden Abschnitten der gesuchten mRNA komplementär sind (*antisense*). Als Kontrolle für die Spezifität einer *antisense*-Sonde diente eine *sense*-Kontrolle, d.h., die Sequenz ist identisch zu der nachzuweisenden RNA bzw. DNA und kann somit nicht hybridisieren. Die Sonden werden entweder radioaktiv markiert oder über eine Enzymreaktion sichtbar gemacht. In der vorliegenden Arbeit wurde die letztgenannte Methode zur Detektion von Genexpressionsänderungen im AC nach FM-Diskriminierungstraining angewendet. Die Technik der ISH wurde erstmals von Pardue und Gall (1969) sowie John *et al.* (1969) unabhängig voneinander beschrieben. Die hier angewendete Methode der nicht-radioaktiven ISH wurde von Montag-Sallaz *et al.* (1999) publiziert. Für jede ISH fanden jeweils die Gehirne von trainierten (5 h nach dem 1. Training dekapitiert) und untrainierten Tieren Verwendung.

2.2.14.1. Präparation des Gewebes

Für diese Experimente wurden Gerbils trainiert (siehe 2.1.2). Fünf Stunden nach Trainingsbeginn wurden die Tiere dekapitiert, das Gehirn entnommen und sofort in ca. -55 °C kaltem 2-Methylbutan (Roth) eingefroren. Parallel dazu erfolgte die Präparation von Gehirnen untrainierter Gerbils. Das Gewebe wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C aufbewahrt.

Präparation der Objektträger

Die Objektträger wurden für 2 h mit Detergenz gewaschen, dann in deionisiertem Wasser und 98 % (v/v) Ethanol abgespült. Anschließend erfolgte eine Sterilisierung bei 160 °C. Nach dem Abkühlen wurden die Objektträger in einem Azeton/6 % (v/v) 3-Aminopropyltriethoxysilan-Gemisch (Sigma) beschichtet, zweimal in Azeton und zweimal in deionisiertem Wasser gespült, bevor sie über Nacht bei 55 °C trockneten. Diese Prozedur wurden am darauf folgenden Tag wiederholt und die Objektträger anschließend steril verpackt gelagert.

Herstellung von Gefrierschnitten

Die Hirne wurden in einem Kryostaten (Microm HM 500 OM) geschnitten und vor Beginn mindestens 1 h an die Temperatur im Kryostatinnenraum adaptiert. Die Gehirne wurden in einer horizontalen Ebene in 20 µm Dicke geschnitten. Die Temperatur im Kryostatinnenraum wurde auf -20 °C und die des Messers auf -12 °C eingestellt. Die Schnitte wurden auf die beschichteten Objektträger aufgezogen und dann 2 min an der Luft getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die luftgetrockneten Hirnschnitte bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.14.2. Herstellung der Sonden

Zur Sondenherstellung wurden die in Vektoren einklonierten DNA-Fragmente durch *in vitro*-Transkription in einzelsträngige RNA (cRNA) umgeschrieben und gleichzeitig mit Digoxigenin (DIG)-UTP markiert. Für die *in vitro*-Transkription wurden die T3- und T7-Promotoren der Plasmide genutzt. Es erfolgte für jede Sonde die Synthese von cRNA sowohl in *sense*- als auch *antisense*-Richtung.

Plasmidlinearisierung

Für die Linearisierung der Plasmide wurden die Klone, welche in das pCR[®] 2.1-TOPO-Plasmid subkloniert waren (siehe 2.2.11.1), in den pCR-Script Amp SK (+/-)-Vektor umkloniert. Für die

Umklonierung der DNA-Fragmente wurden entweder interne Schnittstellen (diese wurden dann auch zur Linearisierung genutzt) oder, falls dies nicht möglich war, die *EcoRI*-Schnittstelle des pCR[®] 2.1-TOPO-Vektors verwendet. Erfolgte die Umklonierung über die *EcoRI*-Schnittstelle, wurde der Plasmidvektor nach der Linearisierung und vor der Ligation noch einer CIP-Reaktion unterzogen. Die dabei verwendete alkalische Phosphatase (*Calf Intestine Phosphatase*, Boehringer) entfernt die 5'-Phosphatgruppen und dadurch kann der Vektor nicht religieren. Dazu wurden ca. 5 µg des linearisierten Vektors mit 1 U CIP für 30 min bei 37 °C inkubiert. Für das Abstoppen und Aufreinen der Reaktion wurde der QIAquick PCR Purification Kit verwendet. Anschließend erfolgte die Ligation (siehe 2.2.12) der DNA-Fragmente in den Vektor und die Transformation (2.2.10.1). Die erhaltenen Kolonien wurden in 100 ml LB-Ampicillin-Medium über Nacht bei 37 °C kultiviert und anschließend wurden die Plasmide mit dem Plasmid Purification Kit (Qiagen) isoliert. 30 – 40 µl der Plasmidpräparation wurden zusammen mit 5 µl Restriktionsenzym, 10 µl 10 x Restriktionsenzympuffer und, falls notwendig, 10 µl 10 x BSA (Herstellerangabe) in einem Gesamtvolumen von 100 µl gemischt. Der Ansatz wurde mindestens 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde anhand eines Aliquots des Reaktionsgemischs die Vollständigkeit der Reaktion gelelektrophoretisch überprüft. Bei unvollständiger Linearisierung wurde die Reaktion fortgesetzt. Die Extraktion der linearisierten Plasmide erfolgte mittels Phenol-Chloroform. Nach einer Präzipitation mittels Ethanol wurde die DNA in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen und die Konzentration der DNA photometrisch ermittelt.

in vitro-Transkription

Das Umschreiben der DNA in cRNA erfolgte mit dem DIG RNA Labelling Kit (Roche). Zu 1 µg der linearisierten DNA wurden 2 µl 10 x Transkriptionspuffer, 5 µl 40 mM DTT, 1 µl (20 U/µl) RNase Inhibitor, 2 µl 10 x DIG-Mix (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM DIG-11-UTP, pH 7,5) und 1,5 µl T7- oder T3-RNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 20 µl gegeben. Die *in vitro*-Transkriptionsreaktion inkubierte für 3 h bei 37 °C, danach wurde nochmals 1 µl der jeweiligen RNA-Polymerase dazu pipettiert und der Ansatz über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde 1 µl (10 U/µl) RNase-freie DNase I hinzugefügt und nochmals für 15 - 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde diese Reaktion mit 2,4 µl 4 M LiCl, 2 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 und 65 µl absolutem Ethanol bei -70 °C mindestens 1 h präzipitiert. Nach Zentrifugation wurde das Präzipitat mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in 100 µl DEPC-Wasser resuspendiert.

alkalische Hydrolyse

Um Sonden von einer Länge ≤ 300 bp zu erhalten, wurden längere cRNAs einer alkalischen Hydrolyse unterzogen. Dazu wurden die gesamte in 100 μ l DEPC-H₂O gelöste cRNA zusammen mit 100 μ l Hydrolyselösung (40 mM NaHCO₃, 60 mM Na₂CO₃) bei 65 °C für eine vorher berechnete, aus der Länge des Transkriptes hervorgehende, Zeit inkubiert. Unmittelbar danach erfolgte die Neutralisierung mit 100 μ l 0,1 M HCl. Die Sonden wurden aliquotiert und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Berechnung:

$(\text{Länge des Transkriptes} - 0,3) / (\text{Länge} \times 0,3 \times 0,11) = \text{Inkubationszeit in min}$

2.2.14.3. *in situ*-Hybridisierung

10 x PBS, pH 7,4	1,5 mM NaCl, 83 mM Na ₂ HPO ₄ , 17 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
Prähybridisierungspuffer:	100 mM Tris/HCl, pH 7,6, 40 mM NaCl, 50 mM EDTA, 5 x Denhardt's Solution (Sigma), 25 mg tRNA (Yeast tRNA, Roche), fertige Lösung 1:1 verdünnen mit 100 % deionisiertem Formamid (Roth)
10 x Hybridisierungspuffer: (HB)	100 mM Tris/HC, pH 7,5; 10 mM EDTA, 10 x Denhardt's Solution, 50 mg tRNA, 10 mg poly-A-RNA (Sigma)
Hybridisierungspuffer:	50 % deionisiertes Formamid, 10 % Dextransulfat, 10 % 10 x HB, 333 mM NaCl, 100 mM DTT
P1Dig:	100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5
P3Dig	100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O, pH 9,5
P4Dig:	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
MBM:	1 % Blocking Reagent (Roche), 0,5 % BSA (<i>Fraction V</i>) in P1Dig
Entwicklungslösung:	35 μ l NBT (100 mg/ml Stammlösung, Roche), 35 μ l BCIP (50 mg/ml Stammlösung, Roche), 10 μ l Levamisole (250 μ g/ μ l, Sigma) auf 10 ml P3Dig

Zu Beginn erfolgte eine Fixierung der Gefrierschnitte für 30 min in 4 % (w/v) Paraformaldehyd. Nach drei Waschschrritten in 1 x PBS wurden die Schnitte für 5 min in 70 % (v/v) Ethanol und dann zweimal mit DEPC-H₂O gespült. Anschließend wurden sie 5 min mit 0,1 M HCl behandelt, dreimal mit 1 x PBS gewaschen sowie 20 min in 0,1 M Triethanolamin/0,25 % Essigsäureanhydrid inkubiert. Im Anschluss an diese Behandlung folgten wieder drei Waschschrritte mit 1 x PBS sowie das Entwässern der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Anschließend wurden sie für die Prähybridisierung mit je 700 μ l Prähybridisierungspuffer überschichtet und 3 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte anschließend die Hybridisierung der Schnitte über Nacht bei 55 °C mit 2,5 μ l oder 5 μ l cRNA-Sonde pro ml Hybridisierungspuffer. Nach verschiedenen Waschschrritten (2 x 30 min 0,2 x SSC bei 55°C, 3 x 90 min 0,1 x SSC/50 % Formamid bei 55 °C, 10 min 0,2 x SSC bei Raumtemperatur, 10 min P1Dig bei Raumtemperatur) wurden die Schnitte am darauf folgenden Tag 30 min in MBM

blockiert und anschließend über Nacht bei 4 °C mit einem 1:500 in MBM verdünnten Anit-DIG-Antikörper (Anti-DIG-AP Fab Fragment, Roche) inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden nochmals gewaschen (2 x 15 min P1Dig, 5 min P3Dig) und dann erfolgte die Entwicklung der Schnitte mit den Substraten für die Alkalische Phosphatase. Die Entwicklung der Farbreaktion erfolgte im Dunkeln, wurde aber zwischenzeitlich mit Hilfe eines Binokulars überprüft. Die Reaktion wurde mit P4Dig gestoppt, die Schnitte 5 min in DEPC-H₂O gewaschen, anschließend getrocknet und mit Flouromount (Serva) eingebettet.

2.2.14.4. Bestimmung der Neuronenzahl im AC

0,05 M Natriumazetatpuffer: 6,8 g Natriumazetat auf 1000 ml H₂O
Kresylechtviolett: 0,5 g Kresylviolett (Merck) auf 100 ml 0,05 M Natriumazetatpuffer

Zum Abschätzen der Gesamtanzahl von Neuronen im AC in einem 20 µm dicken Schnitt wurden Nissl-Färbungen von Hirnschnitten angefertigt (2.2.14.1). Für die Analyse wurden Hirnschnitte von 3 untrainierten Tieren herangezogen. Das Gewebe wurde 30 min in 4 % (w/v) Paraformaldehyd fixiert. Anschließend erfolgte das Ansäuern für 5 min in 0,05 M Natriumazetatpuffer, pH 4,1, die Färbung mit 0,5 % Kresylechtviolett für 5 min und die Differenzierung für 3 min ebenfalls in 0,05 M Natriumazetatpuffer, pH 4,1. Dann wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 % und 96 % (v/v) Ethanol, je 2 min) entwässert und in Isopropanol/96 % (v/v) Ethanol (2 x 5 min) sowie Roticlear (3 x 5 min) gewaschen. Das Eindeckeln der Objekte erfolgte mittels Merckoglas (MERCK).

2.2.14.5. Auswertung der ISH und die Bestimmung der Neuronenzahl

Die Schnitte wurden mit einem Axioskop (Zeiss) mit einer 10fachen Vergrößerung über eine 3CCD-Kamera (HV-C2OH, Hitachi) aufgenommen. Das Neurolucida-Programm (MicroBright Field Inc.) wurde zur Quantifizierung der Zellen genutzt. Zur Definierung des AC wurde als Orientierung die rostrale Spitze des Hippokampus genutzt (1 kHz Referenzlinie, siehe Abb. 2.1) und ein Areal umrahmt, welches von dort einen Abstand von je 2 mm in kaudaler sowie rostraler Richtung hatte. Es wurden alle positiv gefärbten Zellen sowohl des linken als auch des rechten AC ausgezählt. Wenn Expressionsänderungen im AC nachweisbar waren, wurde zusätzlich ein 0,5 mm breiter Teil des direkt benachbarten somatosensorischen Kortex ausgewertet. Dies sollte als Hinweis dienen, ob detektierte Veränderungen auf den AC beschränkt waren. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem StatView Programm.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss von Proteinsyntheseinhibitoren auf das FM-Diskriminierungsverhalten

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde mittels verhaltenspharmakologischer Methoden die Rolle zerebraler Proteinsynthese des Gerbils für das Erlernen der FM-Diskriminierungsreaktion untersucht. Dazu wurden Gerbils an mehreren aufeinander folgenden Tagen in einer Shuttle-Box trainiert. Zur Vermeidung elektrischer Fußreize hatten die Versuchstiere dabei zu lernen, auf das Ertönen aufwärts und abwärts modulierter Töne mit Ausübung bzw. Unterlassung von Kompartimentwechseln zu reagieren. Als Maß für die Diskriminierungsleistung wurde der Wert D , d. h., die Differenz aus der Anzahl der CR+ (Kompartimentwechsel nach bekräftigtem Tonstimulus) und der Anzahl der CR- (Kompartimentwechsel nach unbekräftigtem Tonstimulus), ermittelt. Zur Abschätzung des Aktivitätsstatus der Tiere sowie der Sensitivität sensomotorischer Systeme wurden weitere Verhaltensparameter, wie die Explorationsaktivität (Startaktivität, SA, Anzahl der Seitenwechsel während der Habituationszeit) und die Anzahl der Seitenwechsel zwischen den Trainingsläufen (ITC, *intertrial crossing*) aufgezeichnet.

Die Applikation der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pharmaka erfolgte stets in die drei Hauptfelder AI, AAF und DP/VP des AC. Da hierfür operative Eingriffe und der Einsatz von Narkotika erforderlich waren, wird in einem ersten Kapitel der Einfluss dieser für die intrakortikale Applikation notwendigen Manipulationen auf das Diskriminierungsverhalten der Versuchstiere dargestellt. Frühere Studien an Mongolischen Gerbils haben gezeigt, dass sowohl eine bilaterale als auch eine unilateral-rechtsseitige mechanische Läsion des AC die FM-Diskriminierungsreaktion beeinträchtigten. Unilateral-linksseitige Läsionen waren dagegen diesbezüglich ohne Wirkung (Wetzel *et al.*, 1998a; Ohl *et al.*, 1999). Die Möglichkeit, sich für weitere Untersuchungen der für FM-Diskriminierungslernen erforderlichen Mechanismen auf eine Hemisphäre beschränken zu können, würde gegenüber bilateralen Untersuchungen die Belastung der Versuchstiere und den experimentellen Aufwand insgesamt deutlich senken. Gleichzeitig würde sich die Möglichkeit eröffnen, die kontralaterale Hemisphäre als Referenz für pharmakologische und biochemisch-molekularbiologische Untersuchungen zu nutzen. Daher wurde zunächst die Wirkung von unilateral-rechtsseitig verabreichtem ANI auf das Erlernen der Diskriminierungsreaktion untersucht.

In den sich anschließenden Abschnitten wird die Wirkung von bilateral in den AC verabreichten Proteinsyntheseinhibitoren auf die in nachfolgenden Trainingssitzungen zu beobachtende Diskriminierungsleistung beschrieben. Die so ermittelten Werte wurden mit den Verhaltensdaten

von Kontrolltieren, denen lediglich die als Vehikel dienende Lösung intrakortikal appliziert worden war, verglichen.

Zur Suppression der zerebralen Proteinsynthese kamen drei verschiedene Pharmaka zum Einsatz, die an unterschiedliche Schritte der Translation angreifen: Während ANI und EME die Elongation der Translation eukaryotischer mRNAs unterdrücken, interferiert RAPA vornehmlich mit der Initiation der Translation bestimmter Subgruppen zellulärer mRNAs. Die verwendeten Dosierungen wurden von Literaturdaten abgeleitet, die einerseits belegen, dass sowohl ANI als auch EME in der Lage sind, die Proteinsynthese in verschiedenen Spezies und Hirnstrukturen zu unterdrücken (siehe Einleitung), und andererseits darauf hinweisen, dass 80 % Proteinsynthesehemmung ein kritischer Wert für die Störung von Mechanismen der Gedächtnisbildung zu sein scheinen (Flood *et al.*, 1973; Flood *et al.*, 1975; Davis und Squire, 1984). Die höchste Dosierung von ANI (113 mM) basiert auf Untersuchungen am Rattenhirn, die zeigen, dass die topische Injektion von 100 µg ANI pro Hemisphäre sowohl zu >80 % Proteinsynthesehemmung in kortikalen und hippokampalen Strukturen als auch zu amnestischen Effekten führt (Grecksch und Matthies, 1980; Rosenblum *et al.*, 1993; Meiri und Rosenblum, 1998). Während des Verlaufs der Studien wurden jedoch Daten publiziert, denen zufolge wesentlich niedrigere Dosen von ANI für eine 80 %ige Hemmung der Proteinsynthese in Nagerhirn hinreichend sind (Barea-Rodriguez *et al.*, 2000). In einigen Experimenten wurde deshalb, wie angegeben, die Dosierung von ANI auf 66 mM gesenkt. Die Dosierung von EME geht auf Studien am Kükenhirn zurück, in denen eine lokal begrenzte Hemmung der Proteinsynthese nach topischer Injektion dieses Inhibitors nachgewiesen wurde (Patterson *et al.*, 1986). Zur Wirkung intrazerebral verabreichten RAPAs konnte zu Beginn der Untersuchungen nicht auf publizierte Daten anderer Labore zurückgegriffen werden. Die eingesetzte Dosierung orientierte sich daher an Konzentrationen, die in *in vitro*-Kultursystemen Verwendung fanden (Jefferies *et al.*, 1994; Casadio *et al.*, 1999).

Mit den Proteinsyntheseinhibitoren ANI und EME wurden drei Serien von Experimenten durchgeführt. In einer ersten Serie wurde ANI nach Beendigung der initialen Trainingssitzung verabreicht. In einer zweiten Serie wurden die Gerbils wiederholt trainiert, sodass die FM-Diskriminierungsreaktion entweder teilweise oder vollständig etabliert war, bevor die Injektionen von ANI oder EME erfolgten. In einer letzten Serie wurden die Hemmstoffe mehrere Tage vor Beginn der ersten Trainingssitzung appliziert. Die Immunsuppressiva RAPA und FK506 wurden lediglich nach der initialen Trainingssitzung verabreicht. In Tab. 3.1 sind alle durchgeführten Trainingsexperimente aufgelistet. Für jedes Experiment wurde eine eigene Kontrollgruppe

mitgeführt. In den folgenden Ausführungen zu den einzelnen Experimenten sind die Mittelwerte der Diskriminierungsleistung (D) mit den dazugehörigen Standardfehlern des Mittelwertes graphisch dargestellt. Die jeweiligen Gruppengrößen sind aus der Legende zu den Grafiken ersichtlich. Ergebnisse der ANOVA, Unterschiede zwischen den Substanzgruppen an einzelnen Tagen (t-Test für unabhängige Stichproben) sowie der Vergleich verschiedener Trainingstage innerhalb einer Gruppe (t-Test für abhängige Stichproben) werden, soweit notwendig, im Text erwähnt. Für alle weiteren erfassten Verhaltensparameter (CR+, CR-, ITC, SA) wurde eine tabellarische Darstellung der Mittelwerte mit Standardfehler sowie den dazugehörigen Resultaten der ANOVA gewählt. Der Übersichtlichkeit wegen wurden für jede Substanz alle Verhaltensparameter nur einmal tabellarisch dargestellt. Weitere Ergebnisse für diese Parameter, welche mittels t-Test (für unabhängige oder abhängige Stichproben) ermittelt wurden, sind ebenfalls im Text beschrieben.

Tab. 3.1 Intrakortikale Substanzapplikationen und ihre zeitliche Relation zum Lernexperiment

Substanz	Konzentration	Zeitpunkt des Beginns der Injektion
ANI	113 mM (30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1) 5 min und 2 h nach 1.Training 2) 4 h und 6 h nach 1.Training 3) 5 min und 2 h nach dem 10. Training 4) 48 h und 46 h vor 1.Training
ANI	66 mM (17,5 μg)	1) 5 min und 2 nach dem 6. Training
EME	15 mM (8,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1) 5 min und 2 h nach dem 3. Training 2) 72 h und 70 h vor 1. Training
FK 506 + RAPA	7 μM + 66 nM	1) 5 min (FK 506) + 30 min und 2 h (RAPA) nach dem 1.Training

3.1.1. Methodische Vorarbeiten für die pharmakologischen Studien

3.1.1.1. FM-Diskriminierungslernen bei unbehandelten Gerbils

Unbehandelte Gerbils wurden an aufeinander folgenden Tagen trainiert und die Diskriminierungsleistung sowie alle weiteren Verhaltensparameter ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.1 und Tab. 3.2 dargestellt. Über mehrere Tage war eine signifikante Steigerung der Diskriminierungsleistung der Gerbils mittels ANOVA nachweisbar ($F_{(3,11)} = 21,79$; $p < 0,001$). Die Anzahl der CR+ nimmt signifikant zu, aber nicht die der CR-. Im Vergleich zum initialen Training kann eine Abnahme der SA sowie der ITC während der folgenden Trainingssitzungen beobachten werden. Der Anstieg der CR+ und die Abnahme der SA deuten auf eine Gewöhnung der Tiere an die Shuttle-Box und an die allgemeine Prozedur hin. Die Gerbils sind also in der Lage, sich an die experimentelle Situation zu erinnern.

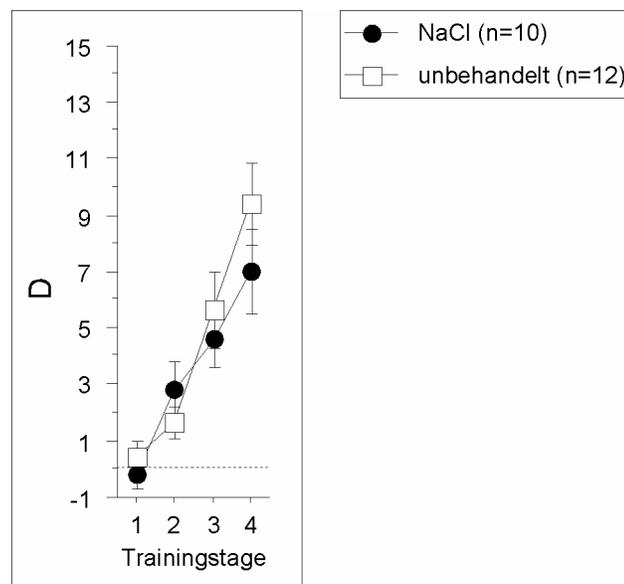


Abb. 3.1 Diskriminierungsleistung (D) von unbehandelten Gerbils und von Gerbils, die einer Operation unterzogen worden waren und denen sterile Kochsalzlösung (NaCl) bilateral 5 min und 2 h nach dem initialen Training appliziert wurde.

Tab. 3.2 Über 4 Trainingstage erfasste Verhaltensparameter von unbehandelten Gerbils

Sitzung	Substanz	CR+	CR-	ITC	SA
1.Tag	unbehandelt	3,83 ± 0,85	3,42 ± 0,76	4,00 ± 0,48	9,83 ± 1,16
2.Tag	unbehandelt	6,00 ± 1,16	4,33 ± 0,88	2,80 ± 0,68	3,92 ± 0,74
3.Tag	unbehandelt	10,33 ± 1,94	4,67 ± 0,85	1,40 ± 0,43	2,67 ± 0,61
4.Tag	unbehandelt	14,08 ± 1,99	4,67 ± 0,82	2,00 ± 0,84	2,00 ± 0,58
ANOVA Tag 1 - 4	Effekt des Trainings	F(3,33) = 12,72 p < 0,001	F < 1	F(3,33) = 11,81 p < 0,001	F(3,33) = 19,03 p < 0,001

3.1.1.2. Einfluss von Operation und Narkose auf die Diskriminierungsleistung

Mit diesem Versuch wurde untersucht, ob Operation, Narkose und Injektionsprozedur nach dem initialen Training die Diskriminierungsleistung beeinträchtigen. Dazu erfolgte der Vergleich von Gerbils, welchen bilateral 5 min und 2 h nach dem initialen Training NaCl in den AC injiziert wurde mit den Tieren aus dem vorhergehenden Abschnitt (3.1.1.1), an denen weder operative Eingriffe noch Injektionen vorgenommen worden waren. Die Operation erfolgte 24 h vor der Injektion.

Es konnte im Anschluss an zweifache Injektionen von Kochsalz nach dem Training kein Effekt auf die Diskriminierungsleistung ($F < 1$) und ebenfalls keine Interaktion zwischen Behandlung und Training festgestellt werden ($F_{(3,60)} = 1,13$). Wie in Abb. 3.1 dargestellt, zeigten beide Gruppen eine signifikante Verbesserung ihrer Diskriminierungsleistung über alle 4 Trainingstage ($F_{(3,60)} = 26,17$; $p < 0,001$). Für die Anzahl der CR+ wie auch die der CR- war ebenfalls kein Einfluss der Behandlung nachweisbar (Tab. 3.3).

Für die ITC wurde eine signifikante Interaktion zwischen Behandlung und Training ermittelt. Die nachfolgende Anwendung des t-Tests für die einzelnen Trainingstage erbrachte eine signifikant niedrigere Anzahl der ITCs der behandelten Tiere im Vergleich zu unbehandelten Gerbils im initialen Training ($t_{(20)} = 2,5$; $p < 0,025$). Die SA änderte sich nicht.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Operation zu einer in der Tendenz niedrigeren Gesamtaktivität der im Vergleich zu den unbehandelten Tieren am 1. Trainingstag führte, was aber nicht mit der Diskriminierungsleistung korrelierte. Die Verhaltensparameter der NaCl-behandelten Tiere unterschieden sich an den Tagen nach der Injektion nicht von denen unbehandelter Gerbils. Die Operation 24 h vor dem Training sowie die Narkose und die Injektion der Substanz unmittelbar nach dem initialen Training führten also nicht zu einer Beeinträchtigung der

Diskriminierungsleistung der Tiere im Vergleich zu unbehandelten Gerbils in den nachfolgenden Trainingssitzungen.

Tab. 3.3 Über 4 Trainingstage erfasste Verhaltensparameter von unbehandelten Gerbils und von Gerbils, die einer Operation unterzogen worden waren und denen 5 min und 2 h nach dem initialen Training Kochsalzlösung (NaCl) bilateral in den AC injiziert wurde.

Sitzung	Substanz	CR+	CR-	ITC	SA
1.Tag	NaCl unbehandelt	1,50 ± 0,52	1,70 ± 0,47	2,10 ± 0,60	8,30 ± 1,54
		3,83 ± 0,85	3,42 ± 0,76	4,00 ± 0,48	9,83 ± 1,16
2.Tag	NaCl unbehandelt	7,10 ± 1,63	4,30 ± 0,79	1,95 ± 0,40	4,33 ± 1,12
		6,00 ± 1,16	4,33 ± 0,88	2,80 ± 0,68	3,92 ± 0,74
3.Tag	NaCl unbehandelt	8,30 ± 1,32	3,70 ± 0,79	1,25 ± 0,39	3,00 ± 0,75
		10,33 ± 1,94	4,67 ± 0,85	1,40 ± 0,43	2,67 ± 0,61
4.Tag	NaCl unbehandelt	11,80 ± 1,28	4,80 ± 0,70	1,33 ± 0,41	1,70 ± 0,37
		14,08 ± 1,99	4,67 ± 0,82	2,00 ± 0,84	2,00 ± 0,58
ANOVA Tag 1 - 4	Behandlungseffekt	F(1,20) = 1,07	F < 1	F < 1	F < 1
	Effekt des Trainings	F(3,60) = 22,95 p < 0,001	F(3,60) = 3,77 p < 0,025	F(3,60) = 3,69 p < 0,025	F(3,57) = 28,46 p < 0,001
	Training X Behandlung	F < 1	F < 1	F(3,60) = 3,74 p < 0,025	F < 1

3.1.1.3. Sensitivität der Diskriminierungsreaktion gegenüber unilateral rechts verabreichtem ANI

Das im folgenden aufgeführte Experiment sollte Aufschluss darüber geben, ob unilaterale Injektionen von ANI in den rechten AC nach dem initialen Training, die Konsolidierung der Diskriminierungsreaktion, gemessen an der Diskriminierungsleistung 24, 48 und 72 h später, beeinträchtigen.

113 mM ANI oder NaCl wurden unilateral 5 min und 2 h nach dem initialen Training in den rechten AC injiziert. Die Diskriminierungsleistung beider Gruppen ist in Abb. 3.2 dargestellt. Mittels ANOVA war kein signifikanter Einfluss der Behandlung ($F < 1$), ein signifikanter Effekt des Trainingstages ($F_{(3,66)} = 23,33$; $p < 0,001$) und keine Interaktion zwischen beiden ($F_{(3,66)} = 1,75$) nachweisbar. Beide Gruppen verbesserten signifikant ihre Diskriminierungsleistung. Verglichen mit Kontrollinjektionen haben unilaterale Injektionen von 113 mM ANI in den rechten AC unmittelbar und 2 h nach dem initialen Training also keinen Einfluss auf die Diskriminierungsleistung an den nachfolgenden Trainingstagen. Aufgrund dieses Resultats erfolgten die Injektionen in allen nachfolgenden Experimenten bilateral nach dem Training.

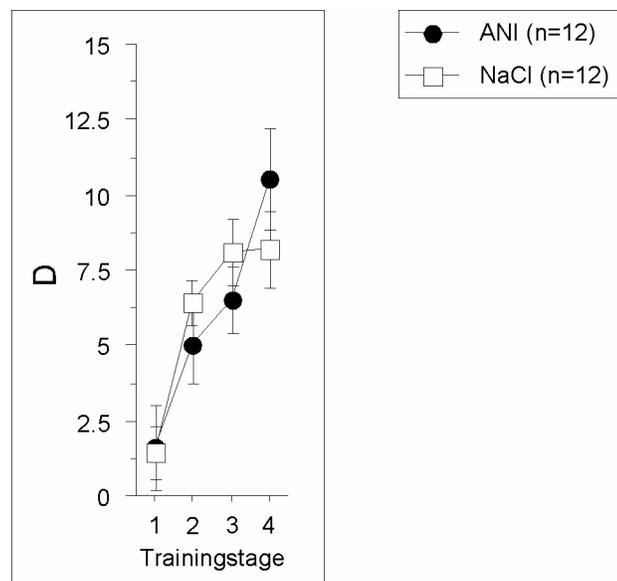


Abb. 3.2 Diskriminierungsleistung (D) von Gerbils, denen 5 min und 2 h nach dem initialen Training 113 mM ANI oder Kochsalzlösung (NaCl) unilateral in den rechten AC injiziert wurde.

3.1.2. Injektion von ANI oder EME in den AC des Gerbils

3.1.2.1. Injektion von ANI 5 min und 2 h nach dem initialen Training

ANI oder NaCl wurden bilateral 5 min und 2 h nach dem initialen Training in den AC injiziert. Die Tiere wurden an weiteren 3 Tagen trainiert.

Die Diskriminierungsleistung ANI-behandelter Gerbils im Vergleich zu Kontrolltieren ist in Abb. 3.3a dargestellt. Die ANOVA für die Diskriminierungsleistung über alle Trainingstage erbrachte einen signifikanten Effekt der Behandlung ($F_{(1,19)} = 5,81$; $p < 0,05$) und einen signifikanten Einfluss des Trainingstages ($F_{(3,57)} = 8,51$; $p < 0,001$) aber keine Interaktion der beiden Parameter ($F_{(3,57)} = 1,49$). Beide Gruppen verbesserten also ihre Diskriminierungsleistung, aber die ANI-behandelten Gerbils zeigten, verglichen mit den Kontrolltieren, über alle Tage eine verminderte Trainingsleistung.

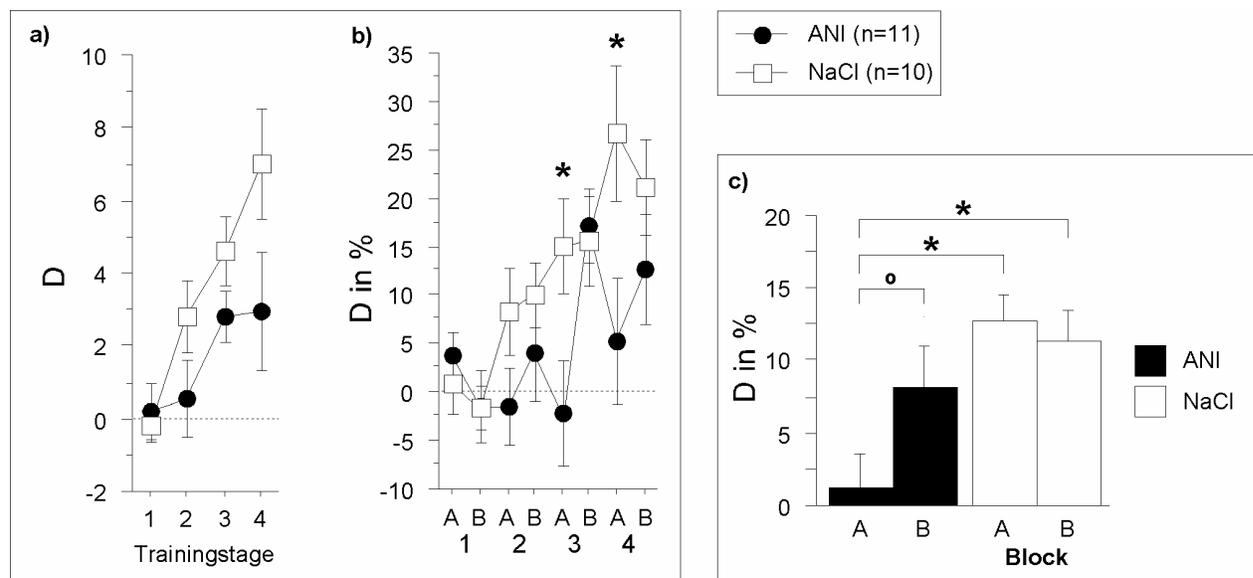


Abb. 3.3 Diskriminierungsleistung (D) von Tieren, denen 5 min und 2 h nach dem initialen Training 113 mM ANI oder Kochsalzlösung (NaCl) bilateral in den AC appliziert wurde. **a)** Diskriminierungsleistung über alle 4 Trainingssitzungen; **b)** die vier Trainingstage in Block A und B unterteilt; **c)** über Block A und B Mittelwerte der Trainingsläufe der Tage 2 bis 4.

*- signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (t-Test; $p < 0,05$)

°- signifikanter Unterschied zwischen den Blöcken (t-Test; $p < 0,05$)

Um dieses Ergebnis weiter zu analysieren, wurde jede Trainingssitzung in zwei Blöcke unterteilt. Block A beinhaltet die Werte der ersten 24 Trainingsläufe und Block B die der letzten 36 (Abb. 3.3b). ANOVA über die Trainingstage nach der Injektion wies einen signifikanten Effekt der Behandlung ($F_{(1,19)} = 11,36$; $p < 0,005$) aber keinen der Blöcke ($F_{(1,19)} = 2,64$) nach. Die

Interaktion zwischen beiden erreichte annähernd die Signifikanzschwelle ($F_{(1,19)} = 4,00$; $p = 0,06$). Das könnte darauf hinweisen, dass sich die pharmakologische Behandlung ungleichmäßig auf die in Block A und Block B der nachfolgenden Trainingssitzungen gemessene Diskriminierungsleistung auswirkte. Diese unterschiedliche Diskriminierungsleistung ist in Abb. 3.3b dargestellt. Die ANI-behandelten Gerbils steigerten ihre Diskriminierungsleistung innerhalb eines Trainings, zeigten aber eine sehr geringe Diskriminierungsleistung zu Beginn einer jeden Trainingssitzung. Für die Kontrolltiere konnte dieses Muster nicht festgestellt werden. Am 3. und 4. Trainingstag unterschieden sich die beiden Behandlungsgruppen signifikant in Block A nicht jedoch in Block B. Ein ähnliches Resultat wurde erhalten, wenn die Mittelwerte der Blöcke über die Trainingstage nach der Injektion gebildet wurden, wie in Abb. 3.3c dargestellt.

Für die ANI-behandelten Tiere war eine signifikant schlechtere Diskriminierungsleistung in Block A im Vergleich zu Block B und eine signifikant schlechtere Diskriminierungsleistung im Vergleich zu den Kontrolltieren in Block A und B nachweisbar. Im Gegensatz dazu konnten keine Unterschiede von Block B der ANI-behandelten Gerbils zu Block A und B der NaCl-behandelten Gerbils ermittelt werden. Bei den NaCl-behandelten Tieren war kein Unterschied zwischen Block A und B festzustellen. Im Gegensatz zu den ANI-behandelten Gerbils verbesserten die Kontrolltiere ihre Leistung zwischen den einzelnen Trainingstagen.

Um Nebenwirkungen von bilateral appliziertem ANI auf sensorische und motorische Systeme zu untersuchen, die mit der Diskriminierungsleistung interferieren könnten, wurden weitere Verhaltensparameter für die beiden Behandlungsgruppen überprüft (Tab. 3.4).

Tab. 3.4 Über 4 Trainingstage erfasste Verhaltensparameter von Gerbils, denen 5 min und 2 h nach dem initialen Training 113 mM ANI oder Kochsalzlösung (NaCl) bilateral in den AC injiziert wurde.

Sitzung	Substanz	CR+	CR-	ITC	SA
1.Tag	ANI	2,18 ± 0,48	2,00 ± 0,69	2,45 ± 0,74	9,30 ± 0,97
	NaCl	1,50 ± 0,52	1,70 ± 0,47	2,10 ± 0,60	8,30 ± 1,54
2.Tag	ANI	4,09 ± 1,11	3,55 ± 1,00	2,55 ± 0,67	4,36 ± 0,69
	NaCl	7,10 ± 1,63	4,30 ± 0,79	2,80 ± 0,68	4,33 ± 1,12
3.Tag	ANI	7,09 ± 1,30	4,27 ± 0,83	1,36 ± 0,47	2,00 ± 0,45
	NaCl	8,30 ± 1,32	3,70 ± 0,79	1,40 ± 0,43	3,00 ± 0,75
4.Tag	ANI	8,09 ± 2,11	5,18 ± 0,95	2,45 ± 0,68	2,27 ± 0,45
	NaCl	11,80 ± 1,28	4,80 ± 0,70	2,00 ± 0,84	1,70 ± 0,37
ANOVA Tag 1 - 4	Behandlungseffekt	$F(1,19) = 2,92$	$F < 1$	$F < 1$	$F < 1$
	Effekt des Trainings	$F(3,57) = 14,79$ $p < 0,001$	$F(3,57) = 6,39$ $p < 0,001$	$F(3,57) = 1,32$	$F(3,51) = 32,43$ $p < 0,001$
	Training X Behandlung	$F(3,57) = 1,21$	$F < 1$	$F < 1$	$F < 1$

Für keinen der Parameter war ein signifikanter Einfluss der Behandlung sowie eine Interaktion zwischen Behandlung und Training über alle 4 Trainingstage nachweisbar. Sowohl für die ANI- als auch die NaCl-behandelten Tiere konnte eine signifikante Steigerung der CR+ und CR- über alle Trainingssitzungen ermittelt werden. Die ITC und die SA veränderten sich nicht behandlungsbedingt. Da ein Einfluss von ANI auf die Diskriminierungsleistung vornehmlich in der ersten Hälfte der Trainingssitzungen festzustellen war, hat der Befund, dass für die SA kein Behandlungseffekt nachweisbar war, einen besonderen Stellenwert. Er zeigt, dass sich die Aktivität der ANI-behandelten Gerbils unmittelbar vor Beginn einer Trainingssitzung nicht von der von Kontrolltieren unterscheidet. Ferner war im Vergleich zum initialen Training sowohl bei ANI-behandelten Gerbils als auch bei Kontrolltieren eine über die Trainingstage sinkende SA festzustellen. Zusammen mit der steigenden Anzahl der bedingten Reaktionen, könnte dies auf eine Gewöhnung der Tiere an die Trainingskammer und an die experimentelle Prozedur hinweisen. Die Gerbils scheinen also unabhängig von der Behandlung in der Lage zu sein, sich an die experimentelle Situation und die Trainingsprozedur zu erinnern.

Die hier gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die bilaterale Injektion von 113 mM ANI 5 min und 2 h nach dem initialen Training im Vergleich zu Kontrolltieren zu einer geringeren Zunahme der Diskriminierungsleistung in den darauf folgenden Trainingssitzungen führte. Die Inhibierung der Proteinsynthese nach dem initialen FM-Diskriminierungstraining hatte dabei einen unerwartet lang anhaltenden Effekt auf die Diskriminierungsleistung. Die ANI-behandelten Tiere steigerten zwar ihre Diskriminierungsrate innerhalb einer Trainingssitzung, fingen aber jeden Tag wieder auf einem niedrigen Niveau an. Im Gegensatz dazu verbesserten die Kontrolltiere ihre Diskriminierungsrate zwischen den einzelnen Trainingssitzungen. Die weiteren Parameter sprechen dafür, dass ANI die sensorischen und motorischen Systeme sowie den Aktivitätsstatus der Tiere nicht beeinträchtigte.

3.1.2.2. Injektion von ANI 4 h und 6 h nach dem initialen Training

In verschiedenen Spezies und Lernparadigmen konnte gezeigt werden, dass zur Konsolidierung eines Langzeitgedächtnisses eine zweite Phase intakter Proteinsynthese erforderlich sein kann, die mehrere Stunden nach dem Training beginnt (Übersicht siehe Stork und Welzl, 1999). In Anlehnung an Versuche von Grecksch und Matthies (1980) wurde im nachfolgenden Experiment 4 und 6 h nach Beendigung des initialen Trainings 113 mM ANI oder NaCl bilateral in den AC appliziert. Die Gerbils wurden 3 weitere Tage trainiert. Für die Diskriminierungsleistung (Abb. 3.4) war ein signifikanter Einfluss der Behandlung ($F_{(1,18)} = 25,28$; $p < 0,001$), des Trainingstages ($F_{(3,54)} = 16,51$; $p < 0,001$) und eine Interaktion zwischen beiden ($F_{(3,54)} = 3,78$; $p < 0,025$) nachweisbar. Beide Gruppen zeigten also eine Verbesserung der Diskriminierungsleistung über alle Tage, die jedoch in der ANI-behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe verzögert war.

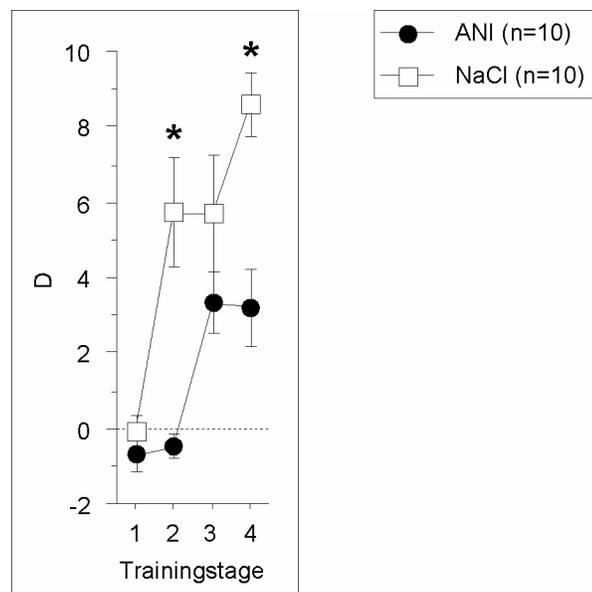


Abb. 3.4 Diskriminierungsleistung (D) von Tieren, denen 4 h und 6 h nach dem initialen Training 113 mM ANI oder Kochsalzlösung (NaCl) bilateral in den AC appliziert wurde.

*- signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (t-Test; $p < 0,05$)

3.1.2.3. Einfluss von ANI auf eine vollständig etablierte FM-Diskriminierungsreaktion

Um mögliche Effekte von ANI auf Prozesse, die in Retention, Abrufung und Rekonsolidierung einer bereits vor der Injektion etablierten FM-Diskriminierungsreaktion involviert sind, zu untersuchen, wurden Gerbils täglich trainiert, bis sie ein asymptotisches Niveau in ihrer Diskriminierungsleistung erreicht hatten. Die Operation erfolgte nach dem 9. Training und NaCl oder 113 mM ANI wurden 5 min und 2 h nach der 10. Trainingssitzung injiziert. In Abb. 3.5 ist die Diskriminierungsleistung beider Behandlungsgruppen vom 8. bis zum 13. Training dargestellt. Die ANOVA der Diskriminierungsleistung erbrachte keinen signifikanten Einfluss der Behandlung ($F < 1$), des Trainingstages ($F_{(5,20)} = 1,14$) und keine signifikante Interaktion ($F < 1$) zwischen beiden Parametern. Die höheren Schwankungen der Diskriminierungsleistung beider Gruppen in der 10. Trainingssitzung ist wahrscheinlich auf Einflüsse der Operation am Vortag zurückzuführen.

Die Befunde sprechen dafür, dass ANI per se sowie eine Hemmung der zerebralen Proteinsynthese weder Systeme beeinträchtigt, die für die Ausführung der Diskriminierungsreaktion notwendig sind, noch mit Mechanismen interferieren, die in die Retention, Abrufung und Rekonsolidierung einer bereits vor der Injektion etablierten FM-Diskriminierungsreaktion involviert sind.

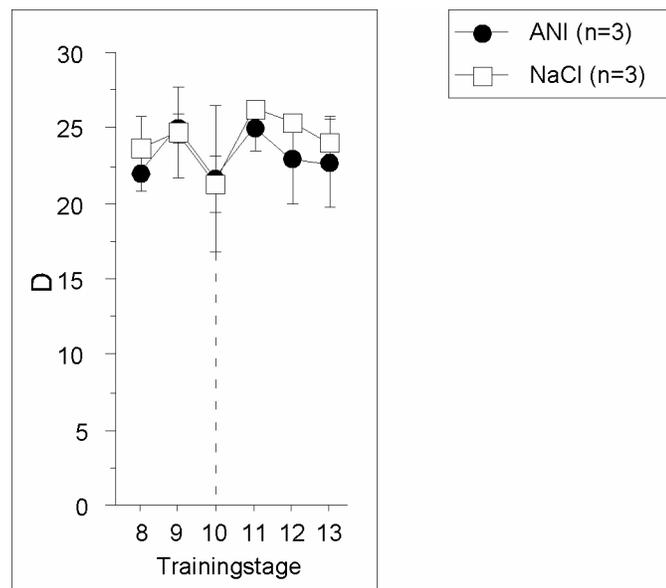


Abb. 3.5 Diskriminierungsleistung (D) von Tieren, denen 5 min und 2 h nach dem 10. Training 113 mM ANI oder Kochsalzlösung (NaCl) bilateral in den AC appliziert wurde.

3.1.2.4. Einfluss von ANI auf eine partiell etablierte FM-Diskriminierungsreaktion

In dem im folgenden beschriebenen Versuch wurde der Einfluss von ANI auf Prozesse, die am Hinzufügen neuer Information zu einer bereits teilweise etablierten Reaktion beteiligt sind, untersucht. Dazu wurden Gerbils in täglichen Sitzungen trainiert, bis sie im Mittel ca. 30 % der möglichen Diskriminierungsleistung erreicht hatten. Die Operation erfolgte nach der 6. Trainingssitzung. Am folgenden Tag, also 5 min und 2 h nach dem 7. Training, erfolgte die Injektion von 66 mM ANI bzw. von NaCl.

Die Diskriminierungsleistung der ANI-behandelten Gerbils und der Kontrolltiere vom 6. bis zum 11. Trainingstag ist in Abb. 3.6 dargestellt. Mittels ANOVA über die 7. bis 11. Trainingssitzung konnte ein signifikanter Einfluss der Behandlung ($F_{(1,10)} = 6,66$; $p < 0,05$) sowie des Trainingstages ($F_{(4,40)} = 3,94$; $p < 0,01$), aber keine signifikante Interaktion zwischen beiden ($F_{(4,40)} = 1,24$) festgestellt werden.

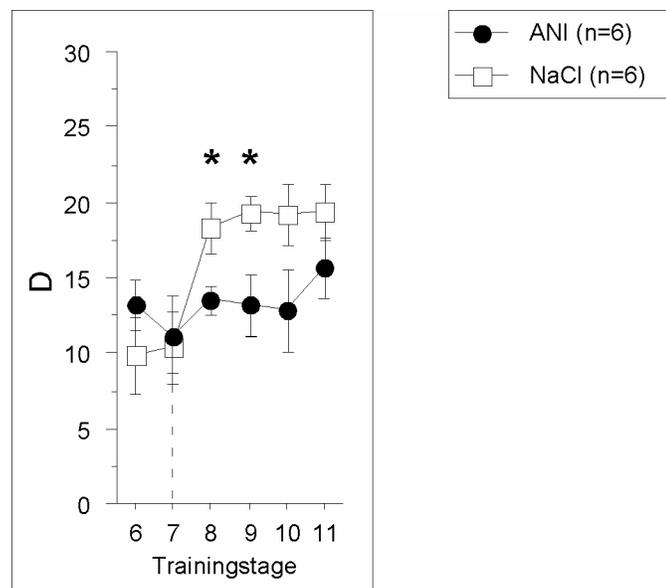


Abb. 3.6 Einfluss von ANI auf eine partiell etablierte FM-Diskriminierungsreaktion. Den Tieren wurde 5 min und 2 h nach dem 7. Training 66 mM ANI oder Kochsalzlösung (NaCl) bilateral in den AC appliziert.

*- signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (t-Test; $p < 0,05$)

Gemessen über mehrere Trainingstage waren die ANI-behandelten Gerbils wie auch die Kontrollen also in der Lage, ihre Diskriminierungsleistung zu verbessern. Die Steigerung der ANI-behandelten Tiere war jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe verzögert. Eine Analyse der einzelnen Trainingstage mittels t-Test erbrachte eine signifikant schlechtere

Diskriminierungsleistung der ANI-behandelten Gerbils im Vergleich zur Kontrollgruppe in der 8. und der 9. Trainingssitzung, aber nicht mehr am 10. Trainingstag. Am 11. Tag war die Diskriminierungsleistung der ANI-behandelten Gerbils ähnlich dem Niveau der Kontrolltiere.

Es kann somit zusammenfassend gesagt werden, dass ANI die Ausübung der etablierten Reaktion nicht beeinträchtigte, wohl aber das Dazulernen, die weitere Verbesserung der Diskriminierungsreaktion verzögerte.

3.1.2.5. Einfluss von EME auf eine partiell etablierte FM-Diskriminierungsreaktion

Um zu erhärten, dass der Einfluss von ANI auf die Diskriminierungsleistung auf eine Inhibition der Proteinsynthese zurückzuführen ist, erfolgte die Applikation eines weiteren Inhibitors der Translation, EME. Wie im vorhergehenden Versuch wurden die Gerbils solange trainiert, bis sie im Mittel ca. 30 % der maximal erreichbaren Diskriminierungsrate zeigten. Die Operation erfolgte nach der 3. Trainingssitzung. Am nächsten Tag wurden 15 mM EME oder NaCl 5 min und 2 h nach dem Training bilateral in den AC appliziert.

Die Diskriminierungsleistung der beiden Behandlungsgruppen ist in Abb. 3.7 dargestellt. Die ANOVA für die Diskriminierungsleistung über die Tage 4 bis 7 erbrachte keinen signifikanten Einfluss der Behandlung ($F < 1$) aber einen signifikanten Effekt des Trainingstages ($F_{(3,42)} = 2,96$; $p < 0,05$) sowie eine signifikante Interaktion zwischen beiden ($F_{(3,42)} = 3,04$; $p < 0,05$).

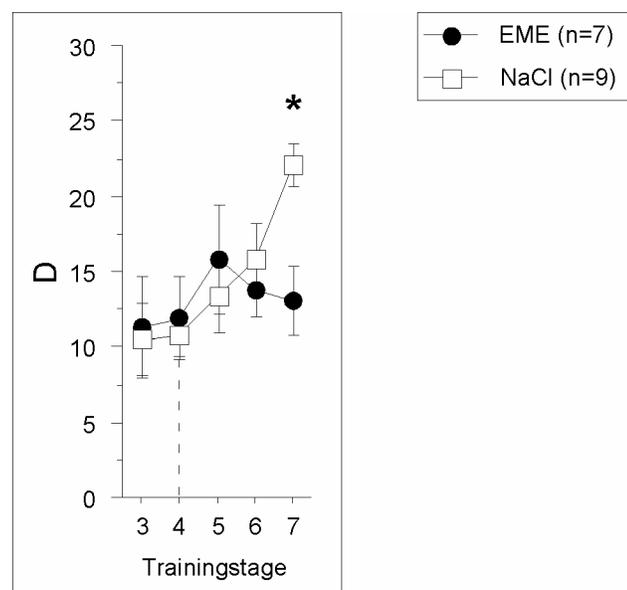


Abb. 3.7 Einfluss von EME auf eine partiell etablierte FM-Diskriminierungsreaktion. Den Tieren wurde 5 min und 2 h nach dem 4. Training 15 mM EME oder Kochsalzlösung (NaCl) bilateral in den AC appliziert.

*- signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (t-Test; $p < 0,05$)

Die Interaktion könnte darauf hinweisen, dass sich die Behandlungen unterschiedlich auf die in den nachfolgenden Trainingssitzungen gemessene Verbesserung der Diskriminierungsleistung auswirkten. Tatsächlich waren die Kontrolltiere ($F_{(3,24)} = 5,24$; $p < 0,01$), nicht aber die EME-behandelten Gerbils ($F < 1$), in der Lage, ihre Diskriminierungsleistung zu verbessern. Keine der Gruppen wies jedoch im Vergleich zum vor der Behandlung gezeigten Diskriminierungsniveau eine Verschlechterung auf.

Die über Trainingstage 4 – 7 erfassten Verhaltensparameter beider Gruppen sind in Tab. 3.5 dargestellt. Daraus wird deutlich, dass die unterschiedlichen Diskriminierungsleistungen der Behandlungsgruppen im wesentlichen auf unterschiedliche CR⁻-Raten zurückzuführen sind. Die Behandlung mit EME übte auf keinen der weiteren gemessenen Verhaltensparameter einen signifikanten Einfluss aus.

Zusammengenommen zeigen die Befunde, dass zwei unterschiedliche Proteinsynthesehemmstoffe, ANI und EME, in gleichsinniger Weise die Verbesserung einer partiell etablierten FM-Diskriminierungsreaktion beeinträchtigen. Die bereits vor der Behandlung erreichte Diskriminierungsleistung blieb dabei erhalten.

Tab. 3.5 Über 5 Trainingstage erfasste Verhaltensparameter von Gerbils, denen 5 min und 2 h nach dem 4. Training 15 mM EME oder Kochsalzlösung bilateral in den AC injiziert wurde.

Sitzung	Substanz	CR+	CR-	ITC	SA
3.Tag	EME	14,50 ± 2,81	3,70 ± 1,45	1,44 ± 0,47	3,30 ± 0,79
	NaCl	14,09 ± 2,31	4,09 ± 1,19	2,88 ± 1,09	4,56 ± 1,14
4.Tag	EME	13,70 ± 1,99	2,00 ± 0,65	0,80 ± 0,33	0,70 ± 0,26
	NaCl	12,45 ± 2,10	1,36 ± 0,45	1,36 ± 0,34	1,00 ± 0,38
5.Tag	EME	20,60 ± 2,10	5,00 ± 0,63	4,30 ± 1,45	3,30 ± 0,62
	NaCl	17,36 ± 2,26	2,36 ± 0,47	3,27 ± 0,94	1,82 ± 0,50
6.Tag	EME	18,40 ± 1,48	4,50 ± 0,85	4,80 ± 2,66	4,70 ± 1,54
	NaCl	19,18 ± 2,12	2,18 ± 0,42	3,36 ± 0,77	2,45 ± 0,69
7.Tag	EME	19,90 ± 1,07	6,00 ± 1,02	4,00 ± 1,06	5,00 ± 1,06
	NaCl	23,27 ± 1,80	2,73 ± 0,49	3,82 ± 0,64	3,55 ± 0,86
ANOVA Tag 4 - 7	Behandlungseffekt	F < 1	F(1,14) = 7,18 P < 0,025	F < 1	F(1,1) = 1,65
	Effekt des Trainings	F(3,42) = 5,75 p < 0,0025	F(3,42) = 5,75 p < 0,0025	F(3,42) = 2,51	F(3,42) = 5,9 p < 0,0025
	Training X Behandlung	F(3,42) = 2,28	F(3,42) = 2,11	F < 1	F(3,42) = 1,54

3.1.2.6. Injektion von ANI oder EME mehrere Tage vor dem initialen Training

In den vorhergehenden Experimenten konnte ein lang anhaltender Effekt der Inhibitoren der Proteinsynthese ANI oder EME über mehrere Trainingstage beobachtet werden. Dies könnte auf unspezifische oder toxische Nebenwirkungen der Substanzen hindeuten, die mit dem FM-Diskriminierungslernen interferieren. Um dies auszuschließen, wurden die Inhibitoren 2 oder 3 Tage vor dem initialen Training bilateral in den AC der Gerbils appliziert.

Bilaterale Injektionen von 113 mM ANI oder NaCl erfolgten 48 h und 46 h vor dem initialen Training. Es folgten 2 weitere Trainingssitzungen. Wie in Abb. 3.8a dargestellt, war die Diskriminierungsleistung der ANI-behandelten Gerbils im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht beeinträchtigt. Die ANOVA für die Diskriminierungsleistung erbrachte keinen signifikanten Einfluss der Behandlung ($F < 1$), einen signifikanten Effekt des Trainingstages ($F_{(2,18)} = 6,27$; $p < 0,01$) und keine Interaktion zwischen beiden ($F < 1$).

Ähnliche Ergebnisse waren zu verzeichnen, wenn 15 mM EME oder NaCl 72 h und 70 h vor dem initialen Training appliziert wurden. Die Diskriminierungsleistung der Gerbils ist in Abb. 3.8b dargestellt. Die ANOVA über beide Trainingssitzungen erbrachte keinen Einfluss der Behandlung ($F < 1$), einen Effekt des Trainingstages ($F_{(1,6)} = 6,92$; $p < 0,025$) und keine Interaktion beider Parameter ($F < 1$).

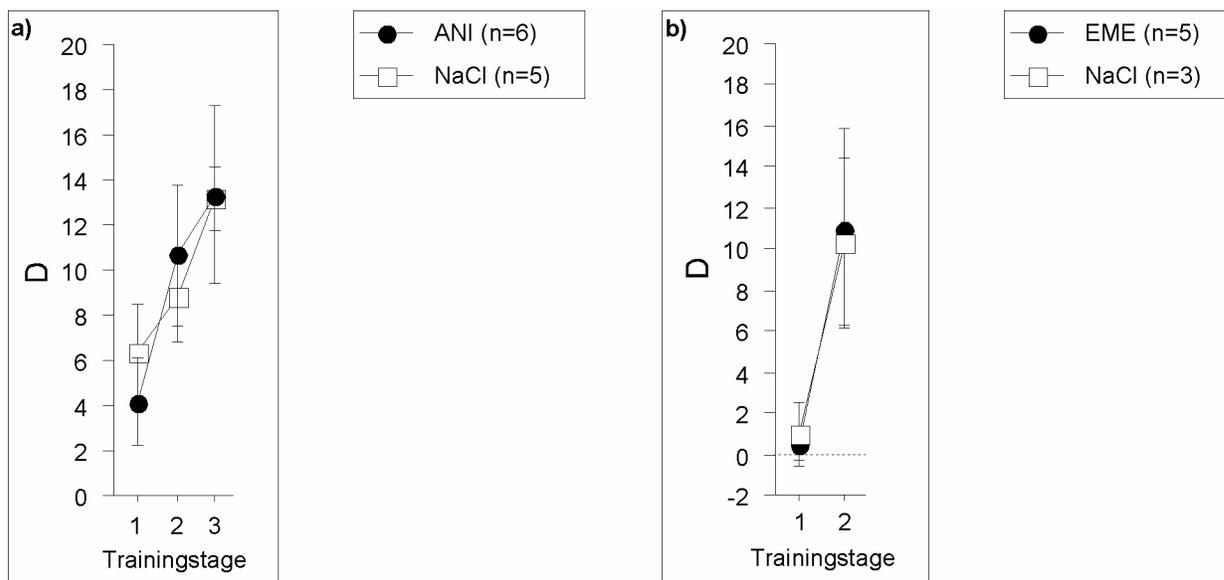


Abb. 3.8 Diskriminierungsleistung (D) von Tieren denen **a)** 48 und 46 h vor dem ersten Training 113 mM ANI oder Kochsalzlösung (NaCl) oder **b)** 72 und 70 h vor dem initialen Training 15 mM EME oder Kochsalzlösung (NaCl) bilateral in den AC appliziert wurde.

Weder die Hemmstoffe selbst noch die Inhibierung der zerebralen Proteinsynthese verursachen also einen lang anhaltenden toxischen Effekt, der als Ursache für die schlechtere Diskriminierungsleistung der Tiere in Betracht zu ziehen wäre, die bei der Applikation der Hemmstoffe nach einem Akquisitionstraining zu beobachten war.

3.1.2.7. Zusammenfassung der Wirkung von bilateral in den AC applizierten Proteinsyntheseinhibitoren

Mittels verhaltenspharmakologischer Methoden wurde die funktionelle Bedeutung zerebraler Proteinsynthese für das Erlernen einer FM-Diskriminierungsreaktion an Mongolischen Gerbils untersucht. Im Vergleich zu Kochsalz-behandelten Kontrolltieren konnte gezeigt werden, dass Gerbils, denen der Proteinsyntheseinhibitor ANI zu verschiedenen Zeitpunkten nach einem Training zum Erwerb der Diskriminierungsreaktion bilateral in den AC verabreicht worden war, an nachfolgenden Trainingstagen Defizite in der Diskriminierungsleistung aufwiesen. Diese Gerbils waren in der Lage, ihre Diskriminierungsleistung innerhalb einer Trainingssitzung deutlich zu verbessern. Im Gegensatz zu Kontrolltieren begannen sie jedoch jede neue Trainingssitzung wieder auf niedrigem Niveau. Wurde ANI an bereits mehrfach trainierte Gerbils verabreicht, so blieb die vor der Injektion erreichte Diskriminierungsleistung erhalten, während eine Verbesserung der Reaktion, wie sie in Kontrolltieren nachgewiesen werden konnte, über mehrere Trainingstage hinweg gestört war.

Die Applikation eines zweiten Proteinsyntheseinhibitors, EME, zeigte eine ähnliche Wirkung. Keiner der Hemmstoffe beeinträchtigte das FM-Diskriminierungslernen, wenn er einige Tage vor dem initialen Training appliziert wurde.

Die Befunde sprechen dafür, dass Proteinsyntheseinhibitoren, die in zeitlicher Nähe zum Lernexperiment in den Hörkortex des Gerbils verabreicht werden, mit Aspekten der FM-Verarbeitung interferieren, die in die Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses für die Diskriminierungsreaktion involviert sind. Daraus resultierende Defizite in der Diskriminierungsleistung sind über einen Zeitraum von mehreren Trainingstagen nachweisbar. Prozesse der Kurzzeitgedächtnisbildung scheinen dagegen von dieser Behandlung nicht beeinträchtigt zu werden.

3.1.3. Injektion von RAPA und FK506 in den AC des Gerbils

Die gezeigte Abhängigkeit der Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses für die FM-Diskriminierungsreaktion von intakter zerebraler Proteinsynthese berechnete einerseits zu weiterführenden Untersuchungen der Genexpression auf Ebene der Transkription im AC, wie sie im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit beschrieben werden. Andererseits führte die unerwartet lange über mehrere Tage nachweisbare Beeinträchtigung des Langzeitgedächtnisses nach einmaliger Hemmung der kortikalen Proteinsynthese zu der Vermutung, dass der Langzeitgedächtnisbildung im verwendeten Paradigma verschiedene Proteinsynthese-abhängige Prozesse zugrunde liegen könnten.

In vitro-Studien an Neuronen von *Aplysia* ließen eine funktionelle Bedeutung RAPA-sensitiver, lokaler Proteinsynthese für eine den Zeitraum von 2 Tagen überschreitende Aufrechterhaltung plastischer Veränderungen von Synapsen vermuten (Casadio *et al.*, 1999). Es stellte sich daher die Frage, ob für eine lang anhaltende Stabilisierung der FM-Diskriminierungsreaktion ähnliche, RAPA-sensitive Mechanismen im AC des Gerbils erforderlich sind, wie sie für *Aplysia* beschrieben wurden.

Zur Untersuchung dieser Frage wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Horst Schicknick eine weitere verhaltenspharmakologische Studie unter Verwendung des bakteriellen Makrolids RAPA durchgeführt. Um zu prüfen, ob etwaige amnestische Wirkungen des RAPA über den vermuteten Signalweg unter Beteiligung von FKBP12 und mTOR vermittelt werden, kam ein zweites bakterielles Makrolid, FK506, zum Einsatz. FK506 konkurriert mit RAPA um die Bindung an FKBP12. Wird es im Überschuss noch vor der Applikation von RAPA verabreicht, so sollte also FK506 solche Wirkungen von RAPA, die auf einer Beeinträchtigung der Proteinsynthese beruhen, unterdrücken können.

In dem nachfolgend beschriebenen Experiment wurden die Pharmaka nach der initialen Trainingssitzung zum Erwerb einer FM-Diskriminierungsreaktion bilateral in den AC verabreicht.

Gerbils ($n = 7$), die während dieser ersten Sitzung mehr CR- als CR+ absolvierten, wurden als Nichtlerner klassifiziert und nicht weiter verwendet. Die verbleibenden Versuchstiere erhielten je 3 Injektionen in unterschiedlicher zeitlicher Relation zum Training (Tab. 3.6). Unmittelbar nach Beendigung des Trainings wurden entweder Vehikel (NaCl + 0,03 % Ethanol) oder FK506 verabreicht; 30 min und 2 h später erhielten dieselben Versuchstiere entweder Vehikel oder RAPA. Das Experiment setzte sich also aus 4 Versuchsgruppen zusammen, die entweder nur Kontrollinjektionen erhielten oder die Wirkstoffe FK506 und RAPA alleine oder in Kombination.

Die FM-Diskriminierungsleistung der Versuchstiere wurde an drei aufeinander folgenden Tagen nach der Injektion ermittelt.

Tab. 3.6 Darstellung der Behandlungsgruppen und der Zeitpunkte der Injektion der Substanzen in den AC der Gerbils nach dem initialen Training; FK FK506; R RAPA; N NaCl

Bezeichnung der Behandlungsgruppen	1. Injektion 5 min nach Training	2. Injektion 30 min nach Training	3. Injektion 120 min nach Training
FK-R-R (n = 12)	6 μ M FK 506	60 nM RAPA	60 nM RAPA
V-V-V (n = 5)	Vehikel	Vehikel	Vehikel
FK-V-V (n = 4)	6 μ M FK 506	Vehikel	Vehikel
V-R-R (n = 9)	Vehikel	60 nM RAPA	60 nM RAPA

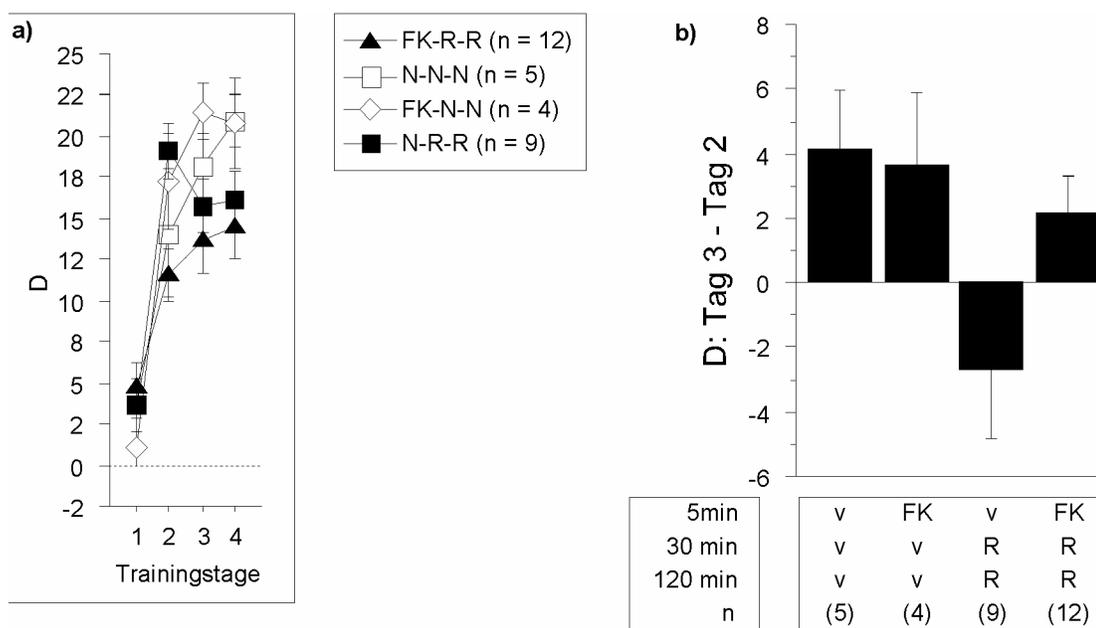


Abb. 3.9 In **a)** ist Diskriminierungsleistung (D) über 4 Trainingstage und in **b)** die Differenz zwischen der Diskriminierungsleistung des 3. Training und 2. Training dargestellt. Den Tieren wurde unmittelbar, 30 min und 2 h nach dem initialen Training 6 μ M FK506, 60 nM RAPA oder Vehikel (NaCl + 0,03% Ethanol) bilateral in den AC appliziert, wie nochmals in der Legende in Abb. b) gezeigt. FK FK506; N NaCl; R RAPA

ANOVA der Diskriminierungsleistung der pharmakologisch unterschiedlich behandelten Gruppen über alle Trainingstage ließ keinen signifikanten Einfluss der Behandlung ($F_{(3,26)} = 1,56$), aber einen signifikanten Effekt des Trainingstages ($F_{(3,78)} = 63,16$; $p < 0,001$) und eine signifikante Interaktion zwischen beiden ($F_{(9,78)} = 3,01$; $p < 0,005$) erkennen. Die signifikante Interaktion zwischen Behandlung und Trainingstag lässt Unterschiede in den Lernkurven der einzelnen Behandlungsgruppen vermuten. Tatsächlich weist der in Abb. 3.9a dargestellte Interaktionsplot solche Unterschiede auf. Am augenscheinlichsten ist die Diskrepanz zwischen

der von Tag 2 nach Tag 3 abfallenden Diskriminierungsleistung der Gruppe, die nur RAPA erhalten hat, und der im selben Zeitraum ansteigenden Diskriminierungsleistung der anderen Behandlungsgruppen.

In Tab. 3.7 ist zu sehen, dass für die CR+ ebenfalls kein signifikanter Einfluss der Behandlung aber ein signifikanter Effekt des Trainingstages und eine Interaktion zwischen beiden nachweisbar war. Für alle weiteren Verhaltensparameter konnte kein signifikanter Effekt der Behandlung oder eine Interaktion zwischen Training und Behandlung ermittelt werden.

Um das für die Diskriminierungsleistung beschriebene Phänomen näher zu untersuchen, wurden die Daten des 2. und 3. Trainingstags gesondert analysiert. Mittels ANOVA über diese Tage konnten keine Effekte der Behandlung ($F_{(3,26)} = 2,42$) und des Trainingstages ($F_{(1,26)} = 2,66$), aber wiederum eine signifikante Interaktion zwischen beiden ($F_{(3,26)} = 3,04$; $p < 0,05$) nachgewiesen werden. In Abb. 3.9b sind die zwischen Trainingstag 2 und 3 registrierten Veränderungen der Diskriminierungsleistung zusammengefasst. Es wird deutlich, dass die RAPA-behandelten Tiere im Gegensatz zu allen anderen Behandlungsgruppen eine im Mittel negative Veränderung aufweisen. Ein post-hoc-Vergleich der Gruppen mittels Fisher's PLSD-Test zeigte, dass die Gruppe, die nach dem initialen Training ausschließlich mit RAPA behandelt wurde, sich signifikant ($p < 0,05$) von allen anderen Behandlungsgruppen unterschied.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass ausschließlich die Tiere, welche nur RAPA erhalten hatten, eine Verschlechterung in ihrer Diskriminierungsleistung von 2. zum 3. Trainingstag zeigten. Im Gegensatz zur Wirkung von ANI war eine amnestische Wirkung des RAPA nicht bereits nach 24 h, sondern erst nach 48 h nachweisbar. Wenn FK506 vor der Applikation von RAPA in den AC des Gerbils verabreicht wurde, konnte der Effekt des RAPA auf die Diskriminierungsleistung 48 h nach der Injektion unterdrückt werden. Wenn FK506 alleine gegeben wurde, war kein Einfluss auf die Diskriminierungsleistung detektierbar.

Tab. 3.7 Darstellung aller weiteren Parameter zum Wettbewerbsversuch von FK506 und 60 mM Rapamycin. In der Tabelle sind in die Werte sowie die ANOVA aller Behandlungsgruppen zusammengefasst. . FK FK506; N NaCl; R RAPA

Sitzung	Substanz	CR+	CR-	ITC	SA
1.Tag	FK-R-R	6,67 ± 1,43	1,83 ± 0,41	3,83 ± 1,09	10,00 ± 1,18
	V-V-V	6,00 ± 1,14	2,40 ± 1,12	6,20 ± 2,63	5,80 ± 1,80
	FK-V-V	2,00 ± 0,71	1,00 ± 0,41	1,50 ± 0,50	6,75 ± 2,46
	V-R-R	5,89 ± 1,34	2,22 ± 0,68	4,11 ± 1,59	9,22 ± 1,89
2.Tag	FK-R-R	17,08 ± 2,20	5,50 ± 0,90	4,75 ± 0,93	5,50 ± 0,60
	V-V-V	19,80 ± 3,34	5,80 ± 1,69	4,60 ± 1,12	5,80 ± 1,50
	FK-V-V	21,75 ± 2,69	4,50 ± 0,87	3,00 ± 1,08	2,50 ± 0,29
	V-R-R	24,33 ± 1,60	5,22 ± 1,14	5,78 ± 1,71	7,33 ± 1,96
3.Tag	FK-R-R	16,83 ± 2,22	3,17 ± 0,67	2,50 ± 0,57	4,33 ± 1,18
	V-V-V	20,40 ± 1,96	2,20 ± 0,86	1,20 ± 0,73	3,40 ± 1,03
	FK-V-V	24,50 ± 1,76	3,00 ± 0,71	2,00 ± 0,71	2,25 ± 0,63
	V-R-R	19,89 ± 1,48	4,11 ± 0,68	3,56 ± 0,44	4,00 ± 0,73
4.Tag	FK-R-R	17,67 ± 1,87	3,25 ± 0,58	1,83 ± 0,41	3,58 ± 0,67
	V-V-V	25,60 ± 1,44	4,60 ± 1,03	2,60 ± 1,54	2,60 ± 0,60
	FK-V-V	23,00 ± 2,83	2,25 ± 0,25	0,00 ± 0,00	2,00 ± 0,91
	V-R-R	20,56 ± 1,88	4,44 ± 1,09	2,44 ± 0,58	3,00 ± 0,96
ANOVA Tag1 - 4	Behandlungseffekt	F(3,26) = 1,38	F < 1	F(3,26) = 1,57	F(3,26) = 1,61
	Effekt des Trainings	F(3,78) = 82,89 p < 0.001	F(3,78) = 9,32 p < 0.001	F(3,78) = 5,14 p < 0,005	F(3,78) = 4,66 p < 0.005
	Training X Behandlung	F(9,78) = 2,89 p < 0.01	F < 1	F < 1	F < 1

3.1.4. Zusammenfassung der Effekte bilateraler Injektionen in den AC des Gerbils

Eine Zusammenfassung der Experimente ist in Tab. 3.8 dargestellt.

Tab. 3.8 Zusammenfassung der Effekte von bilateralen Injektion von ANI, EME und RAPA in den AC im Vergleich zu NaCl oder Vehikel. **1)** Veränderungen der Diskriminierungsleistung zwischen dem 1. und 2. Trainingstag; **2)** Veränderungen der Diskriminierungsleistung zwischen dem 2. und 3. Trainingstag; **0)** keine Veränderungen

Substanz	5 min und 2 h nach initialem Training	4 h und 6 h nach initialem Training	5 min und 2 h nach letztem Vortraining	24 h bis 72 h vor initialem Training
NaCl	↑ ¹	↑ ¹	↑	↑ ¹
ANI	0 ¹	0 ¹	0	↑ ¹
EME			0	↑ ¹
RAPA	↑ ¹ ↓ ²			

Die Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses für die FM-Diskriminierungsreaktion ist, wie gezeigt werden konnte, abhängig von intakter Proteinsynthese im Hörkortex des Gerbils. Für die zugrunde liegenden Mechanismen können Proteinsynthese-abhängige Prozesse mit verschiedenen Zeitcharakteristika angenommen werden, die sich in unterschiedlicher Weise pharmakologisch beeinflussen lassen. Wird ANI nach dem Training von Gerbils zum Erwerb einer FM-Diskriminierungsreaktion in den Hörkortex verabreicht, so ist die amnestische Wirkung dieses Inhibitors der Proteinsynthese, der die Translation der Gesamtheit der eukaryotischen mRNAs unterdrückt, an den folgenden Trainingstagen nachweisbar. Im Gegensatz dazu führte die Injektion von RAPA, das mit der Translationsaktivität bestimmter mRNA-Subgruppen interferieren kann, zu keinerlei Beeinträchtigung der nach 24 h im Vergleich zu Kontrolltieren gemessenen Diskriminierungsleistung. Am darauf folgenden Tag sind jedoch Diskriminierungsdefizite bei RAPA-behandelten Tieren nachweisbar. Das Konkurrenzexperiment mit FK506 lässt vermuten, dass die amnestische Wirkung des RAPA unter Einbeziehung der Kinase mTOR vermittelt wird. Werden ANI oder EME an bereits mehrfach trainierte Tiere verabreicht, so bleibt die vor der Applikation erreichte Diskriminierungsleistung erhalten. Eine Verbesserung der Reaktion, wie in Kontrolltieren zu beobachten, war jedoch über einen Zeitraum von Tagen gestört. Kontrollexperimente zeigten, dass die Verhaltenswirksamkeit der applizierten Pharmaka (ANI und EME) weder auf toxische Nebenwirkungen noch auf Beeinträchtigung von Mechanismen der Akquisition der Diskriminierungsreaktion und der Kurzzeitgedächtnisbildung zurückzuführen war.

Unsere Befunde lassen vermuten, dass in zeitlicher Nähe zum Lernexperiment die Translation unterschiedlicher Klassen von mRNAs erfolgen muss, deren Proteinprodukte offenbar für verschiedene Phasen der Langzeitgedächtnisbildung von Bedeutung sind. Der Erhalt einer Gedächtnisspur für die Dauer von 1 – 2 Tagen erfordert die Expression von Proteinen, deren Synthese nicht durch RAPA beeinträchtigt werden kann. Für eine über diesen Zeitraum hinausgehende Stabilisierung des Gedächtnisses wird dagegen zusätzlich RAPA-sensitive Proteinsynthese benötigt.

3.2. Analysen zur Veränderung der Genexpression nach FM-Diskriminierungstraining

Die bisher dargestellten Daten sprechen dafür, dass die Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses für die FM-Diskriminierungsreaktion Proteinsynthese-abhängige Prozesse im AC des Gerbils sowohl unmittelbar als auch zwischen ca. 4 - 8 h nach Akquisition erfordert. Dadurch wurde die Frage aufgeworfen, ob es in diesem Zeitraum auch zu Änderungen in der Genexpression auf der Ebene der Transkription im AC kommt. Die für die folgenden Untersuchungen erforderlichen Gewebeproben wurden 5 h nach Akquisition der FM-Diskriminierungsreaktion entnommen, also zu einem Zeitpunkt, an dem in anderen Lernparadigmen und Spezies erhöhte zerebrale Proteinsynthese nachgewiesen werden konnte (Übersicht siehe Stork und Welzl, 1999).

3.2.1. Analyse von Arc (Arg3.1)-mRNA mittels *in situ*-Hybridisierung

Um einen ersten Hinweis zu erhalten, ob es zu trainingsbedingten Änderungen der Genexpression im AC des Gerbils kommt, wurde die Expression eines bekannten Gens, für welches bereits in anderen Lernparadigmen in kortikalen Strukturen zu späten Zeitpunkten Änderungen in der Genexpression gezeigt wurden, untersucht. Für diese Voruntersuchung wurde das *activity-regulated, cytoskeleton-associated protein/activity-regulated gene* (Arc/Arg3.1) gewählt (Link *et al.*, 1995; Lyford *et al.*, 1995). Montag-Sallaz *et al.* (1999) konnten mittels nicht-radioaktiver ISH nachweisen, dass die Expression von Arc-mRNA 0,5 h und 4,5 h nach dem Kennenlernen eines neuen Geschmacks im parietalen und cingulären Kortex der Maus erhöht war. Zum Nachweis der Arc-mRNA wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls die nicht-radioaktive ISH verwendet. Diese Methode ermöglicht es die Anzahl der Zellen, welche die nachzuweisende mRNA exprimieren, zu bestimmen. Nach Beendigung der ISH wurden alle Arc-positiven Zellen des rechten und linken AC der Gerbils getrennt ausgezählt, um auch mögliche Unterschiede zwischen den Hemisphären zu erfassen.

Die Maus-spezifische Arc-Sonde für die ISH wurde freundlicherweise von PD Dr. Dirk Montag (IfN) zur Verfügung gestellt. In Vorversuchen, die dankenswerterweise von Frau Dr. Montag-Sallaz durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass die Sonde auch für den spezifischen Nachweis der Arc-mRNA im Gerbil geeignet ist.

In der Abb. 3.10A-G sind Beispiele für die ISH mit der *antisense*-Arc-cRNA-Sonde dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass Arc stark im Kortex exprimiert wird, besonders in den Schichten II – VI. In der Hippokampusformation war die stärkste Expression von Arc in CA1, etwas schwächer in CA2 und CA3 und die geringste Expression war im Gyrus dentatus nachweisbar.

Arc ist schwächer im Caudatoputamen und in der Körnerzellschicht sowie der Purkinjezellschicht des Cerebellums exprimiert. Eine ähnliche Verteilung der Arc-mRNA wurde für das Gehirn der Ratte und Maus beschrieben (Link *et al.*, 1995; Lyford *et al.*, 1995; Montag-Sallaz *et al.*, 1999).

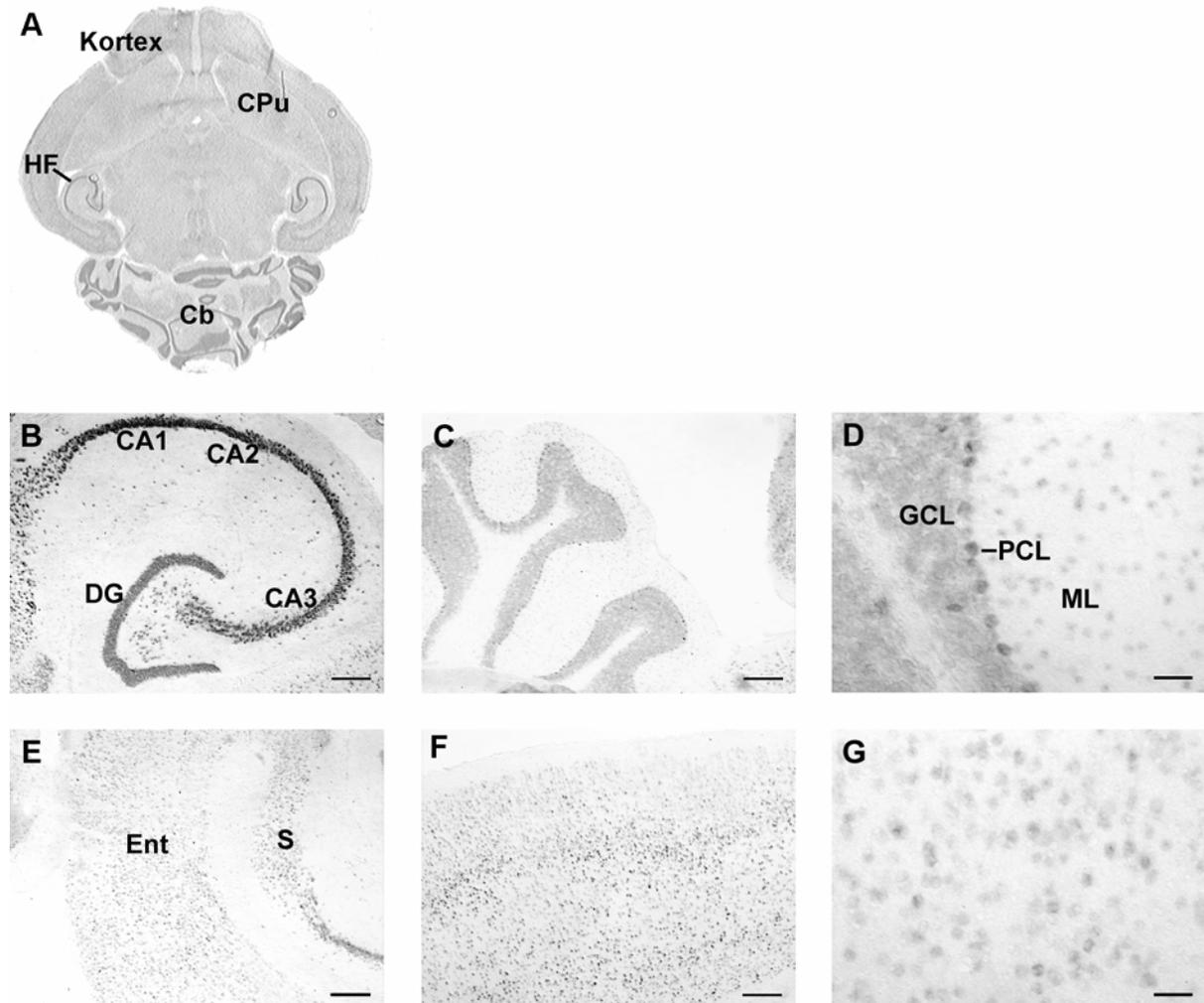


Abb. 3.10 *In situ*-Hybridisierung zur Detektion von Arc-mRNA am Horizontalschnitt des Gerbilhirns. **A** Gesamtansicht **B** Hippokampus, **C** Cerebellum, **D** vergrößerte Ansicht des Cerebellums, **E** entorhinaler Kortex, **F** auditorischer Kortex, **G** vergrößerte Ansicht des auditorischen Kortex. Cb Cerebellum; CPu Caudatoputamen; HF Hippokampusformation; CA1, CA2 und CA3 Hippokampusareale; DG Gyrus dentatus; Ent entorhinaler Kortex; S Subiculum; GCL Körnerzellschicht; PCL Purkinjezellschicht; ML Molekularschicht. Balken in C, D, F und G = 250 μ m, in E und H = 50 μ m.

Das Ergebnis der quantitativen Auswertung der Hirnschnitte trainierter und untrainierter Gerbils ist in Abb. 3.11 dargestellt. Bei Betrachtung beider Hemisphären war im Vergleich zu untrainierten Tieren eine Erhöhung der Zahl Arc-mRNA positiver Zellen 5 h nach Akquisition

der FM-Diskriminierungsreaktion im AC nachweisbar ($t_{(12)} = 2,49$; $p < 0,05$). Beim Vergleich innerhalb der Hemisphären des AC verfehlte der trainingsbedingte Unterschied in der Expression von Arc-mRNA die Signifikanzschwelle. Unterschiede zwischen dem rechten und linken AC waren weder bei trainierten Gerbils noch in der Kontrollgruppe nachweisbar. Im somatosensorischen Kortex (SCo) erreichte die in der Tendenz erkennbaren trainingsbedingten Unterschiede in der Zahl der Arc-mRNA-exprimierenden Zellen nicht das Niveau statistischer Signifikanz.

Im AC des Gerbils kommt es also 5 h nach FM-Diskriminierungstraining zu einer erhöhten Expression von Arc-mRNA.

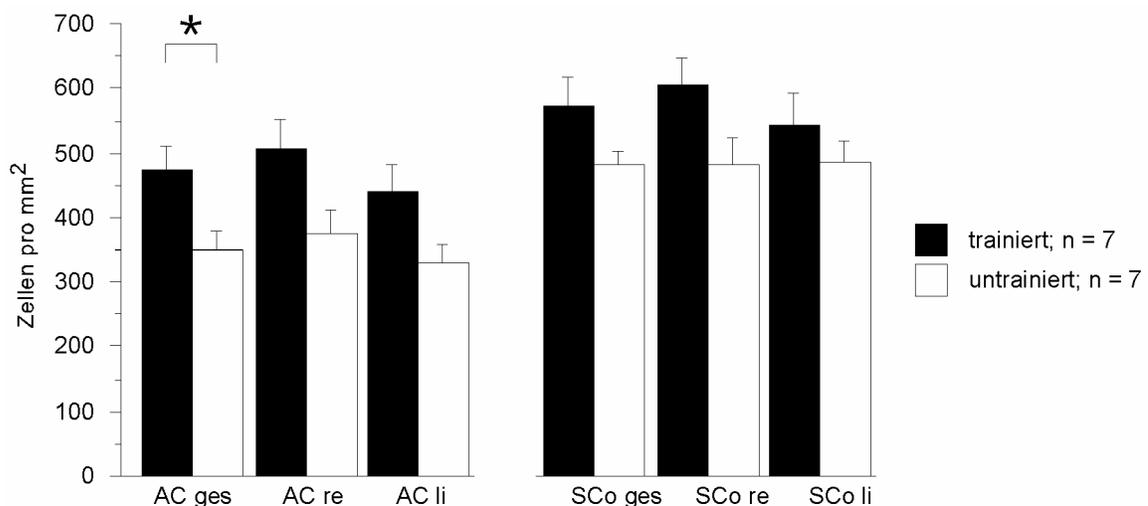


Abb. 3.11 Quantifizierung von Arc-mRNA-exprimierenden Zellen im AC und SCo von untrainierten Gerbils und von Gerbils, die 5 h vor Dekapitation einem FM-Diskriminierungstraining unterzogen worden waren. Es sind jeweils die Ergebnisse der rechten und linken Hemisphäre sowie die Mittelwerte aus beiden dargestellt.

* - signifikanter Unterschied zwischen trainierten und untrainierten Tieren (t-Test; $p < 0,05$)

3.2.2. Subtraktive Hybridisierung

Wie aus dem vorangegangenen Kapitel ersichtlich, kommt es 5 h FM-Diskriminierungstraining zu Veränderungen in der Genexpression im AC des Gerbils.

Um weitere mRNAs zu detektieren, deren Expression 5 h nach FM-Diskriminierungstraining verändert ist, wurde die Methode der SSH gewählt. Das Prinzip dieser Methode ist im Kapitel "Material und Methoden" näher erläutert.

Das Ergebnis der SSH ist in Abb. 3.12 dargestellt. Nach Beendigung der zweiten Amplifikation mittels PCR wurden die subtrahierte cDNA (Bahn 1), die subtrahierte Kontroll-cDNA

(Skelettmuskel des Menschen, Bahn 3) und eine unsubtrahierte *tester*-Kontrolle (Bahn 2) auf ein Gel aufgetragen. Für die subtrahierte Skelettmuskel-cDNA konnte das laut Angaben des Herstellers erwartete Bandenmuster zwischen 200 bp und 1,3 kb auf dem Gel identifiziert werden (Bahn 3). Bei dieser cDNA-Kontrolle wurde ein Gemisch aus Skelettmuskel-cDNA und DNA von Φ X174, *Hae*III-geschnitten, als *tester* von reiner Skelettmuskel-cDNA als *driver* subtrahiert. Die unsubtrahierte Kontrolle (Bahn 2) stellt cDNA dar, welche mit *Rsa*I behandelt wurde. Laut Herstellerangaben sollte für diese cDNA eine Auftrennung zwischen 0,1 kb und 2 kb nachweisbar sein. Dies konnte ebenfalls bestätigt werden. Für die subtrahierte cDNA (trainiert minus untrainiert) sollte eine breite Verteilung mit oder ohne distinkte Banden als Ergebnis der SSH zu erkennen sein. In Abb. 3.12 ist dies für die subtrahierte cDNA (trainiert minus untrainiert) eindeutig zu erkennen (Bahn 1). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die SSH fehlerfrei verlaufen ist.

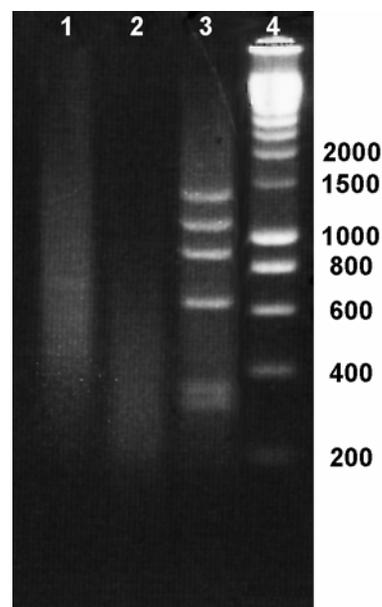


Abb. 3.12 Kontrolle der subtraktiven Hybridisierung nach der zweiten PCR

- 1) subtrahierte Gerbil-cDNA (*driver-tester*-cDNA)
- 2) unsubtrahierte *tester*-Kontrolle (Gerbil)
- 3) subtrahierte cDNA-Kontrolle (menschlicher Skelletmuskel)
- 4) DNA-Standard

3.2.3. Dot-Blot-Hybridisierung und Identifizierung nicht-mitochondrialer DNA

Nach Beendigung der SSH und der anschließenden Gelanalyse, wurden die PCR-Produkte in den pCR[®] 2.1-TOPO-Vektor inkloniert. Anschließend erfolgte die Sequenzierung einiger Klone. Es sollte zunächst geprüft werden, ob repetitive Sequenzen erhalten wurden. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit denen aus Datenbanken verglichen. Nach dieser ersten Sequenzierung der Klone konnten vor allem mitochondriale Gene identifiziert werden. Mitochondriale DNA

kodiert u. a. Komplexe aus der Atmungskette (Cytochrom-C-Oxidase, NADH-Dehydrogenase), ribosomale RNAs und transfer-RNAs. Da diese zunächst nicht weiter untersucht werden sollten, wurden diese Sequenzen mittels Dot-Blot-Hybridisierung von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Dot-Blot-Hybridisierung ermöglicht den Nachweis von spezifischen Nukleinsäuren, welche auf eine Membran punktförmig aufgebracht werden, mittels radioaktiv oder nicht-radioaktiv markierter DNA oder RNA. Die in den pCR[®] 2.1-TOPO-Vektor inklonierten Klone wurden mittels PCR amplifiziert und dann auf einer Nylonmembran immobilisiert. Als Sonde wurde die zuvor als mitochondrial identifizierte cDNA verwendet. Ein Beispiel für ein erhaltenes Ergebnis ist in Abb. 3.13 zu sehen. Die nicht positiven Klone wurden anschließend sequenziert.

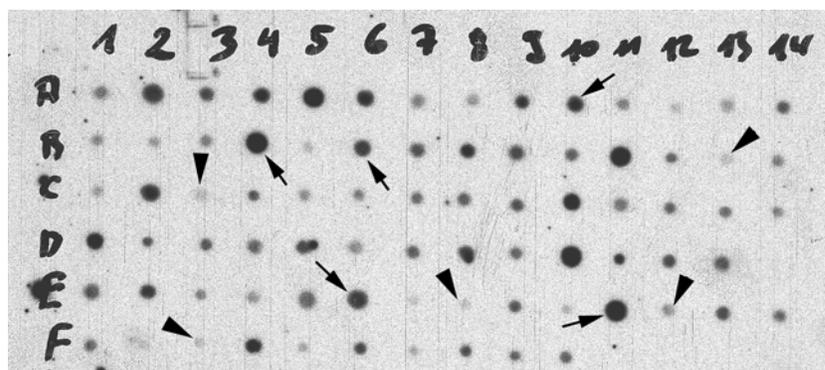


Abb. 3.13 Beispiel eines mit radioaktiv markierter mitochondrialer cDNA hybridisierten Dot-Blots. Mit Pfeilen sind Beispiele für positive Klone, also mitochondriale cDNA, gekennzeichnet, und mit Pfeilköpfen Beispiele für nicht-mitochondriale cDNA.

Eine Zusammenfassung aller identifizierten Klone, einschließlich der mitochondrialen cDNA, ist in Tab. 3.9 dargestellt. In dieser Tabelle ist aufgelistet, wie oft ein Klon identifiziert wurde. Des weiteren wird die Anzahl unabhängiger Klone angegeben, d.h. die Sequenzen dieser Klone sind zu unterschiedlichen Bereichen einer mRNA homolog.

Wie in Tab. 3.9 zu sehen, konnten sieben Klone der mRNA von M6a zugeordnet werden. Darin waren drei unabhängige Sequenzen enthalten. M6a ist ein Glykoprotein und gehört zur PLP/DM20 Familie. (Yan *et al.*, 1993). PLP/DM20 ist eines der Hauptbestandteile des Myelins im Zentralnervensystem. Der erste sequenzierte Klon von M6a zeigte Homologien zu einem Teil der kodierenden Region sowie dem Beginn der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der mRNA

von Ratte sowie Maus. Weitere Klone waren homolog zur 3'-UTR oder zur 5'-UTR und dem Beginn der kodierenden Region.

Zwei unabhängige Klone konnten aufgrund ihrer Homologie der für das extrazelluläre Matrixprotein SC1 kodierenden mRNA aus Ratte und Maus zugeordnet werden (Johnston *et al.*, 1990). SC1 ist ein Mitglied der Ig-Superfamilie.

Weiterhin wurden zwei identische Klone gefunden, welchen Teile der 5'-UTR sowie ein kurzes Stück der kodierenden Region der *visinin-like protein* (VILIP-1)-mRNA verschiedener Spezies zugeordnet werden konnte. VILIP-1 ist ein Ca^{2+} -bindendes, EF-Hand Protein. Es wurde erstmals beim Küken beschrieben (Lenz *et al.*, 1992) und gehört zur Familie der neuronalen Ca^{2+} -Sensor (NCS)-Proteine (Burgoyne und Weiss, 2001).

Eine cDNA zeigte Homologien zur 3'-UTR von Calmodulin aus Ratte oder Maus. Calmodulin ist ebenfalls ein EF-Hand Protein (Bandyopadhyay und Ghosh, 1990).

Des weiteren wurde ein Klon mit einer Sequenz gefunden, welche eine 89 %ige Homologie zur 3'-UTR sowie dem Beginn der kodierenden Region der N-Chimerin (α 1-Chimerin) kodierenden mRNA hat. Eine Spleißvariante der α 1-Chimerin-mRNA, die α 2-Chimerin kodiert, wird von diesem Fragment ebenfalls erkannt. α 1/ α 2-Chimerin sind in der Ratte identifizierte, neuronale GTPase aktivierende (GAP) Proteine für Rac1 und Cdc42 sowie Phorbolsterrezeptoren (Hall *et al.*, 1990) und könnten somit in Prozesse der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts involviert sein (Hall, 1998). α 1-Chimerin inhibiert die Adhäsion und Regulation des Zytoskeletts in Fibroblasten, kontrolliert die Formation von Lamellopodien/Filopodien in Neuroblastoma-Zellen und reguliert die Stabilität des Golgi während der Interphase (Kozma *et al.*, 1996; Kazanietz, 2002). Erste Untersuchungen zu α 2-Chimerin zeigten, dass es die Neuritogenese inhibiert und in Mechanismen der Entwicklung involviert ist (Hall *et al.*, 2001).

Translocation (Translin, Synonym: *testis-brain RNA-binding protein*, TB-RBP) wurde erstmals als ein RNA- als auch Einzelstrang-DNA-bindendes Protein beschrieben (Aoki *et al.*, 1995; Han *et al.*, 1995). Als RNA-bindendes Protein vermittelt es den inter- und intrazellulären Transport von mRNA (Morales *et al.*, 1998; Hecht, 2000). Mit seinem Interaktionspartner Translin-assoziiated Faktor X (Trax) ist Translin vermutlich an chromosomaler Translokation während der Meiose beteiligt (Chennathukuzhi *et al.*, 2001). Die vom Gerbil abgeleitete cDNA zeigte Homologien zu der kodierenden Region sowie der 3'-UTR der Ratten/Maus-mRNA.

Nur-related factor 1 (Nurr1) ist ein Orphan-Rezeptor und gehört zu einer Familie von Kernrezeptoren, die konstitutiv exprimierte TF darstellen (Law *et al.*, 1992). Nurr1 ist gleichzeitig ein IEG. Ein in der vorliegenden Arbeit sequenzierter Klon zeigt Homologien zur 3'-

UTR der mRNA von Nurr1 aus Ratte und Maus, aber auch zu Nurr2, einer C-terminal verkürzten Isoform von Nurr1 (Ohkura *et al.*, 1999).

Für einen weiteren Klon konnte Homologie zur 3'-UTR der mRNA aus Ratte/Maus festgestellt werden, die für das synaptosomal-assoziierte Protein SNAP-25 kodiert (Oyler *et al.*, 1989).

Drei weitere voneinander unabhängige PCR-Produkte konnten keinem bekannten Gen zugeordnet werden. Das Plasmid mit der Bezeichnung 2.1.47 zeigte 92% Identität zu einer Maus cDNA Sequenz (NM_025364). Für die Klone mit der Bezeichnung 2.1.46 sowie 2.2.69 konnten bisher keine Homologien zu Einträgen in Datenbanken gefunden werden.

Weiterhin wurden nach der Sequenzierung je einmal PCR-Produkte der mRNA der Aldolase sowie der Triosephosphat-Isomerase, beides Enzyme der Glykolyse, zugeordnet.

Die identifizierten mitochondrialen cDNAs sind Gene, die für Enzyme der Atmungskette, wie die Cytochrom-C-Oxidase und die NADH-Dehydrogenase, sowie für ribosomale RNA kodieren.

Tab. 3.9 Zusammenfassung aller identifizierten Klone. Unter der Spalte „Anzahl“ ist die Gesamtanzahl aller Klone, welche für dieses Gen identifiziert wurden und die Anzahl unabhängiger Klone angegeben.

Bezeichnung der cDNA	Anzahl	Sequenzbereich
M6a	7 / 3	5'-UTR/CDS, CDS/3'-UTR; 3'-UTR
VILIP-1	2	5'-UTR/CDS
NURR1/NURR2	1	3'-UTR
$\alpha 1/\alpha 2$ -Chimerin	1	CDS/3'-UTR
SC1	2 / 2	CDS
Translin (TB-RBP)	1	CDS/3'-UTR
Calmodulin	1	3'-UTR
SNAP 25	1	3'-UTR
Aldolase A	1	CDS/3'-UTR
Triosephosphat-Isomerase	1	CDS
NADH-Dehydrogenase Untereinheit 4	2	CDS
NADH-Dehydrogenase Untereinheit 2	8	CDS, 3'-UTR
Cytochrom-C-Oxidase Untereinheit 1	2	CDS
unbekannte Gene (2.1.47, 2.1.46, 2.2.69)	3 / 3	
mitochondriale DNA	4	16S RNA

3.2.4. Analyse durch Northern-Blot-Hybridisierung

Ziel der nachfolgend beschriebenen Experimente war es, mittels Northern-Blot-Hybridisierung die Expression einer Auswahl der in Tab. 3.9 aufgelisteten Gene im Gerbilhirn sowohl nach FM-Diskriminierungstraining als auch nach Krampfauslösung zu untersuchen.

Die Applikation von Kainat führt zu Krämpfen, welche den Temporallappenepilepsien des Menschen ähnlich sind (Fisher, 1989). Kainatkrampf wurde deshalb als zusätzliches Modell gewählt, weil Stimulation mit Kainat zu massiven Veränderungen in der zerebralen Genexpression (z.B. Hevroni *et al.*, 1998) und zum strukturellen Umbau an Synapsen führt sowie LTP-ähnliche Potenzierungen hervorruft (Ben-Ari und Represa, 1990). Die Verwendung dieses starken Stimulus sollte Aufschluss darüber geben, ob die identifizierten Gene möglicherweise in plastische Prozesse des Gehirns des Gerbils involviert sind. Da Gerbils bereits ohne Gabe von Kainat Epilepsien entwickeln können und als Tiermodell dafür bereits seit langem untersucht werden (Loskota *et al.*, 1974), musste die Frage geklärt werden, ob ähnliche Krampfstadien wie bei der Ratte nach Injektion von Kainat nachweisbar sind (Zhang *et al.*, 1997). Das nach Applikation von Kainat zu beobachtende Krampfverhalten wird bei Ratten in sechs Stadien unterteilt:

1. Unbeweglichkeit, Starre, Mund- und Gesichtszuckungen;
2. Schütteln wie ein nasser Hund (*wet dog shakes*);
3. Hyperaktivität, Krämpfe der Vorderpfoten, Kopfnicken;
4. Aufrichten, starke Krämpfe der Vorderpfoten;
5. Aufrichten und Hinfallen, Verlust des Gleichgewichtes;
6. Springen, Drehen im Kreis, starke Schüttelkrämpfe.

Den Gerbils wurden 12 mg/kg Kainat oder physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert. Das beobachtete Krampfverhalten sowie der Verlauf waren denen der Ratte ähnlich. Nach ca. 1 bis 1,5 h zeigten die mit Kainat behandelten Tiere erste Anzeichen eines Krampfeschehens, welche den Stadien 1 bis 3 entsprachen. Diese ließen sich nicht streng voneinander trennen. Sie traten bei den Gerbils, wie bei der Ratte, immer nur für einige Minuten auf. Darauf folgten oft Ruhephasen. Krampfstadien 4 - 6 konnten ab ungefähr 3 h nach Injektion beobachtet werden. Die zum Teil sehr starken klonischen Krämpfe dauerten ebenfalls maximal einige Minuten. Nach 6 h wurden nur solche Tiere der Kainat-Gruppe in die Untersuchung einbezogen, die mehrfach Krämpfe der Stärke 5 - 6 gezeigt hatten.

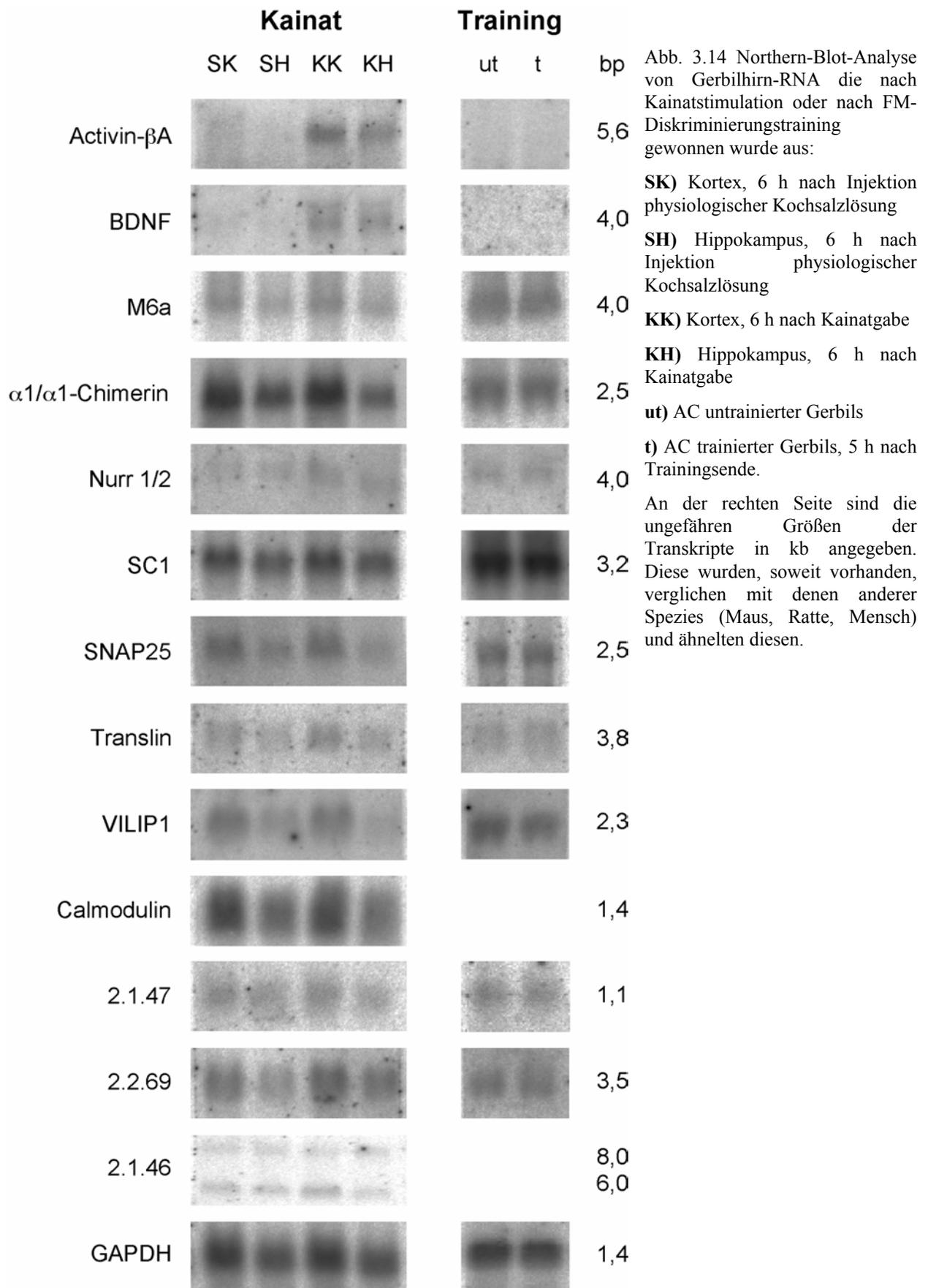
Für BDNF (Zafra *et al.*, 1990) und Activin- β A (Inokuchi *et al.*, 1996) wurde bereits im Rattenhirn gezeigt, dass 6 h nach Gabe von Kainat eine erhöhte Menge an mRNA vorlag.

Northern-Blot-Hybridisierungen mit radioaktiv markierter gerbilspezifischer BDNF- und Activin- β A-cDNA (siehe 2.2.12) sollten daher als Positivkontrolle dienen. Weiterhin wurden die radioaktiv markierten cDNAs der aus der SSH hervorgegangenen Klone als Sonden verwendet. Es wurde jeweils parallel in einem Ansatz ein Northern-Blot vom AC trainierter und untrainierter Gerbils sowie ein Blot von Kortex bzw. Hippokampus von Kainat-behandelten Tieren und Kochsalzkontrollen hybridisiert.

Die Ergebnisse sind in Abb. 3.14 zusammengefasst. Die Mengen der für BDNF und Activin- β A kodierenden mRNAs zeigten nach Stimulation mit Kainat eine massive Zunahme, wie es auch vorher bei der Ratte beschrieben worden war (Zafra *et al.*, 1990; Inokuchi *et al.*, 1996). In Gesamt-RNA Präparationen von Kontrolltieren waren diese Transkripte nicht nachweisbar. Eine Akkumulation nach Kainatbehandlung im Vergleich zu Kochsalz-behandelten Tieren konnte ebenfalls für Nurr1/2-mRNA beobachtet werden. Vergleichbare Ergebnisse wurden bereits für die Ratte beschrieben (Crispino *et al.*, 1998). Weiterhin war nach Behandlung mit Kainat eine Akkumulation im Kortex und Hippokampus im Vergleich zu den NaCl-behandelten Gerbils für Translin und den Klon mit der Nummer 2.2.69 nachweisbar. Alle anderen untersuchten mRNAs zeigten keine Expressionsänderungen nach der Kainatstimulation.

Für alle untersuchten mRNAs, mit Ausnahme von VILIP-1, waren keine eindeutigen Expressionsänderungen nach dem FM-Diskriminierungslernen im AC des Gerbils nachweisbar (Abb. 3.14). In 2 von 3 unabhängigen Blots, d. h., die aus dem AC isolierte mRNA stammte von verschiedenen Tieren, konnte eine leicht verringerte VILIP-1-mRNA Menge in den trainierten Tieren gefunden werden (Abb. 3.14). Die mRNA von BDNF und Activin- β A war weder auf den Blots von trainierten noch von untrainierten Gerbils detektierbar.

GAPDH wurde als Kontrolle verwendet, um die gleichmäßige Beladung der einzelnen Bahnen zu überprüfen.



3.2.5. Analyse durch nicht-radioaktive *in situ*-Hybridisierung

Da sich für den Gehalt an VILIP-1-mRNA im AC eine Erniedrigung nach FM-Diskriminierungslernen andeutete (siehe Abb. 3.14), wurde die Expression dieser mRNA mittels nicht-radioaktiver ISH näher analysiert. Mit der hier verwendeten Methode kann im Unterschied zur Northern-Blot-Hybridisierung, bei welcher das durchschnittliche Expressionsniveau pro Gehirnregion ermittelt wird, die Anzahl der Zellen, welche die nachzuweisende mRNA exprimieren, detektiert werden. Daher wurde auch die Expression weiterer mRNAs, wie die für *Nurr1/2*, *Translin* und $\alpha 1/\alpha 2$ -Chimerin kodierenden nochmals mit dieser Methode untersucht. Für *Nurr1* konnte nach räumlichem Lernen (Futtersuche in einem Lochbrett) eine erhöhte mRNA-Expression im Hippokampus der Ratte gefunden werden (Pena de Ortiz *et al.*, 2000). Für *Translin* zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine leicht gestiegene mRNA-Menge nach Kainatstimulation. Die mRNAs für $\alpha 1/\alpha 2$ -Chimerin wurden ausgewählt, da diese Proteine, wie die PKC-Isoenzyme, Phorbolsterrezeptor darstellen und Homologien zu der C1-Domäne von PKC aufweisen (Hall *et al.*, 1990).

Wie bereits unter 3.2.1 beschrieben, wurde anhand von Gefrierschnitten die Anzahl der positiven Zellen im AC als auch SCo von untrainierten und trainierten Gerbils bestimmt und auf mm^2 normiert. Die jeweilige *sense*-Sonde diente als Nachweis für die Spezifität des mit der *antisense*-Sonde erhaltenen Expressionsmusters. Da die Quantifizierung sowohl der *Translin*-mRNA-exprimierenden Zellen als auch der $\alpha 1/\alpha 1$ -Chimerin-mRNA-exprimierenden Zellen keine trainingsbedingten Unterschiede erbrachten, wurde auf eine detaillierte Darstellung dieser Ergebnisse verzichtet.

3.2.5.1. VILIP-1 *in situ*-Hybridisierung

In Abb. 3.15 sind repräsentative Beispiele für den Nachweis von VILIP-1-mRNA am Horizontalschnitt des Gerbilhirns mittels *in situ*-Hybridisierung dargestellt. VILIP-1-mRNA ist weit verbreitet und abundant in allen Gehirnarealen mit Ausnahme des Caudatoputamen. Auf subzellulärem Niveau war meist eine zytoplasmatische und selten eine nukleäre Verteilung der mRNA von VILIP-1 nachweisbar (Abb. 3.15H). Im Kortex (Abb. 3.15F und G) wird VILIP-1 in den Schichten II - VI, am stärksten in der Pyramidenzellschicht (V), exprimiert. Ein besonders hohes Expressionsniveau war für VILIP-1-mRNA im perirhinalen sowie entorhinalen Kortex detektierbar. Im Cerebellum zeigte sich, dass VILIP-1 nur in der Körnerzellschicht exprimiert wird, aber nicht in der Purkinjezellschicht oder Molekularschicht (Abb. 3.15D, E). Im Gegensatz

zur ISH an Hirnschnitten der Ratte (Paterlini *et al.*, 2000) und auch zu immunhistochemischen Untersuchungen am Gerbil (Lenz *et al.*, 1996) konnte das VILIP-1-Transkript im Gyrus dentatus nicht nachgewiesen werden. Analog zu Untersuchungen in der Ratte wurde VILIP-1-mRNA auch in den Pyramidenzellen der Regionen CA1 bis CA3 detektiert. Für die ISH mit der *sense*-Kontrolle war kein Signal nachweisbar (Abb. 3.15B). Insgesamt stimmen die Befunde für VILIP-1 gut mit den für die Ratte beschriebenen Expressionsmustern überein (Paterlini *et al.*, 2000).

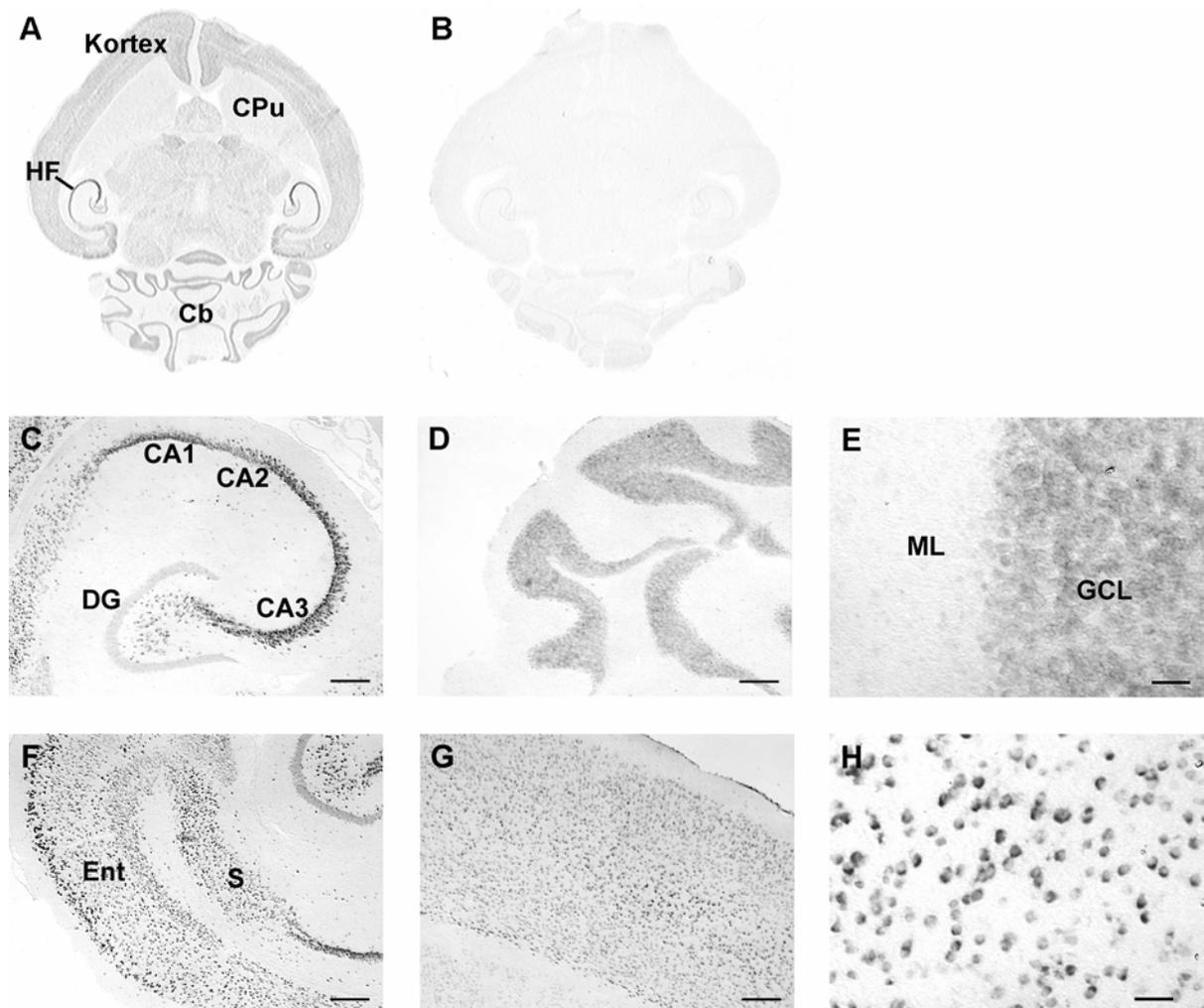


Abb. 3.15 *In situ*-Hybridisierung zur Detektion von VILIP-1-mRNA am Horizontalschnitt des Gerbilhirns. A,C – H ISH mit *antisense*-Sonde; B ISH mit *sense*-Sonde A, B Gesamtansicht, C Hippokampus, D Cerebellum, E vergrößerte Ansicht des Cerebellums, F entorhinaler Kortex, G auditorischer Kortex, H vergrößerte Ansicht des AC. Cb Cerebellum; CPu Caudatoputamen; HF Hippokampusformation; CA1, CA2 und CA3 Hippokampusareale; DG Gyrus dentatus; Ent entorhinaler Kortex; S Subiculum; GCL Körnerzellschicht; PCL Purkinjezellschicht; ML Molekularschicht. Balken in C, D, F und G = 250 μm , in E und H = 50 μm .

In Abb. 3.16 ist das Ergebnis der Quantifizierung VILIP-1-mRNA-exprimierender Zellen im AC sowie im SCo von trainierten und untrainierten Gerbils dargestellt. Im AC war 5 h nach dem Lernexperiment eine signifikant geringere Anzahl von VILIP-1-mRNA-positiven Zellen im Vergleich zu untrainierten Gerbils nachweisbar. Keine signifikanten Unterschiede konnten innerhalb der Gruppen zwischen der rechten und der linken Hemisphäre des AC gefunden werden. Im SCo waren keine trainingsbedingten Unterschiede nachweisbar.

Eine Senkung der VILIP-1-mRNA-Expression 5 h nach FM-Diskriminierungslernen konnte im AC von trainierten Gerbils im Vergleich zu untrainierten Tieren nachgewiesen werden. Keine Unterschiede waren zu ermitteln, wenn die Expression von VILIP-1-mRNA von trainierten und untrainierten Tieren im SCo verglichen wurde. Dies deutet darauf hin, dass die trainingsbedingte Senkung des Expressionsniveaus von VILIP-1-mRNA spezifisch für den AC war.

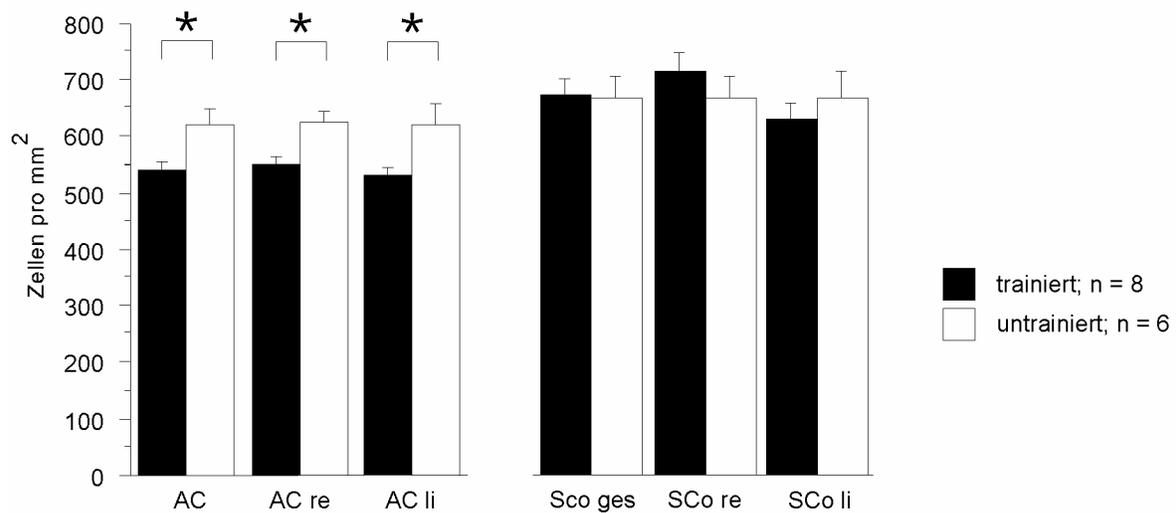


Abb. 3.16 Quantifizierung von VILIP-1-mRNA-exprimierenden Zellen im AC und SCo von untrainierten Gerbils und von Gerbils, die 5 h vor Dekapitation einem FM-Diskriminierungstraining unterzogen worden waren. Es sind jeweils die Ergebnisse der rechten und linken Hemisphäre sowie die Mittelwerte aus beiden dargestellt.

* - signifikanter Unterschied zwischen trainierten und untrainierten Tieren (t-Test; $p < 0,05$)

3.2.5.2. Nurr1/Nurr2 *in situ*-Hybridisierung

Nurr2 ist eine alternative Spleißvariante von Nurr1. Der aus der SSH erhaltene Klon konnte beiden Isoformen zugeordnet werden und daher detektiert die für die ISH verwendete Sonde ebenfalls Nurr1 und Nurr2. Das Transkript von Nurr1/2 wurde stark im Kortex, und dort besonders im perirhinalen und entorhinalen Kortex, exprimiert (Abb. 3.17). Bis auf Schicht I wurde eine Expression von Nurr1/2-mRNA in allen Schichten des Kortex detektiert. Eine vergleichbare Verteilung des Transkriptes von Nurr1 wurde bereits im Kortex von Ratte sowie Maus beschrieben (Saucedo-Cardenas und Conneely, 1996; Xiao *et al.*, 1996). Nurr1/2-mRNA war in der Pyramidenzellschicht der Regionen des Hippokampus sowie etwas stärker in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus im Gerbil nachweisbar. Dieses Ergebnis entsprach der Verteilung von Nurr1-mRNA in der Maus (Xiao *et al.*, 1996). In der Hippokampusformation der Ratte ist die Expression von Nurr1/2 stark in den Regionen CA1 – CA3 und eine sehr schwache Expression wurde für den Gyrus dentatus beschrieben (Saucedo-Cardenas und Conneely, 1996). Im Cerebellum des Gerbils konnte Nurr1/2-mRNA in der Körnerzellschicht und der Purkinjezellschicht detektiert werden. Das Transkript für Nurr1 wurde in der Maus in den gleichen Schichten des Cerebellums nachgewiesen (Xiao *et al.*, 1996). Für die Ratte ist nur die Expression von Nurr1-mRNA in der Körnerzellschicht beschrieben (Saucedo-Cardenas und Conneely, 1996). Sowohl für die mRNA als auch das Protein von Nurr2 wurden bisher keine Verteilungsstudien durchgeführt. Ohkura *et al.* (1999) zeigten mittels quantitativer PCR, dass die Verteilung von Nurr2-mRNA ähnlich ist zu der von Nurr1-mRNA aber im Vergleich zu Nurr1 zeigt Nurr2 eine wesentlich schwächere Expression. Zusammenfassend entsprach das im Gerbilhirn detektierte Expressionsmuster von Nurr1/2 den bereits beschriebenen in der Ratte bzw. Maus. Hirnschnitte, welche mit der *sense* Probe behandelt wurden, waren ohne Signal (Abb. 3.17B).

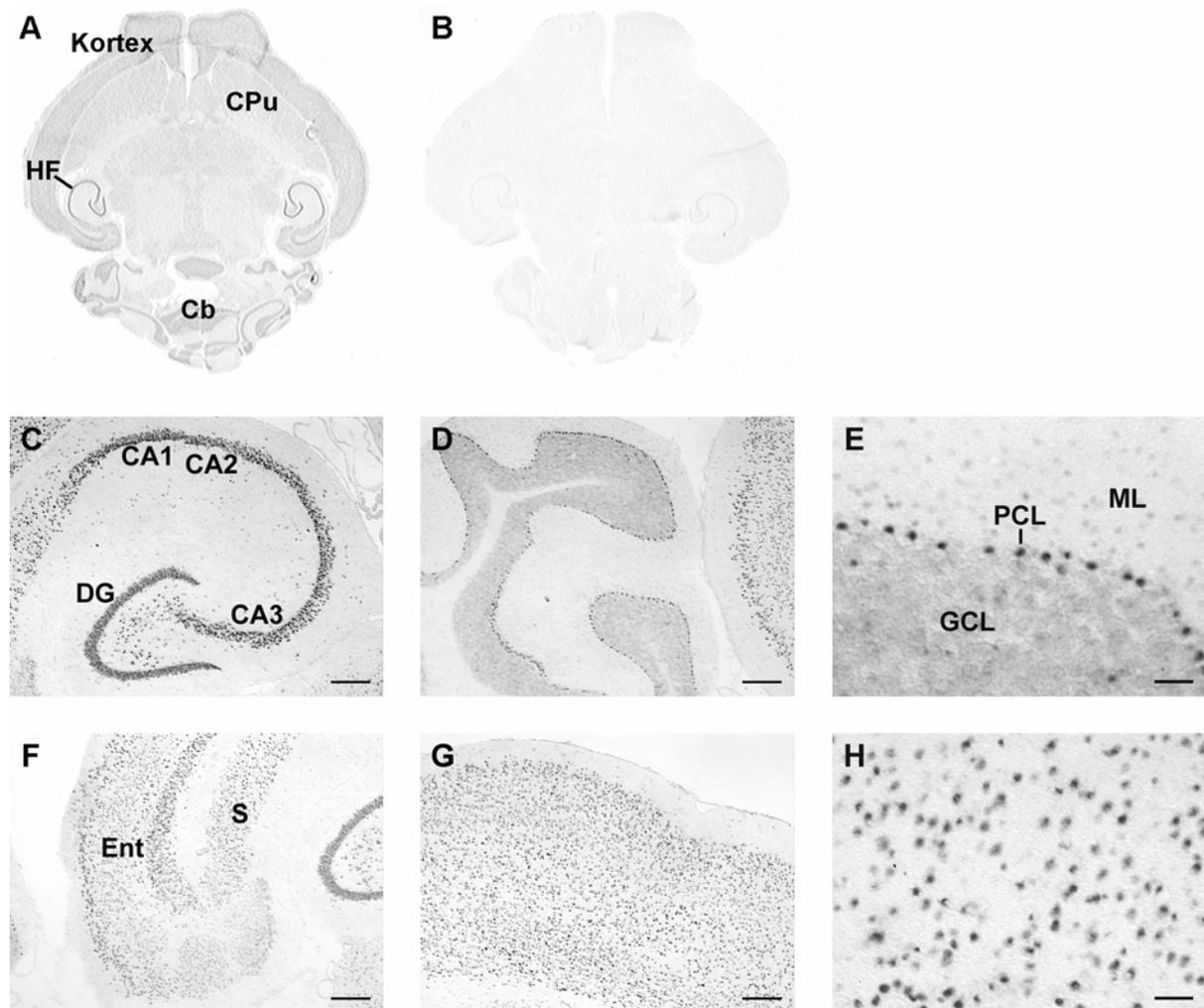


Abb. 3.17 *In situ*-Hybridisierung zur Detektion von Nurr1/2-mRNA am Horizontalschnitt des Gerbilhirns. A,C – H ISH mit *antisense*-Sonde; B ISH mit *sense*-Sonde A, B Gesamtansicht, C Hippokampus, D Cerebellum, E vergrößerte Ansicht des Cerebellums, F entorhinaler Kortex, G auditorischer Kortex, H vergrößerte Ansicht des AC. Cb Cerebellum; CPu Caudatoputamen; HF Hippokampusformation; CA1, CA2 und CA3 Hippokampusareale; DG Gyrus dentatus; Ent entorhinaler Kortex; S Subiculum; GCL Körnerzellschicht; PCL Purkinjezellschicht; ML Molekularschicht. Balken in C, D, F und G = 250 μ m, in E und H = 50 μ m.

Die quantitative Auswertung der Nurr1/2-mRNA-exprimierenden Zellen erbrachte weder im AC noch im SCo signifikante trainingsbedingte Unterschiede (Abb. 3.18). Beim Vergleich zwischen den Hemisphären zeigte sich jedoch die Tendenz einer rechtsseitig erhöhten Expression dieses Transkriptes, die im AC trainierter Gerbils und im SCo untrainierter Gerbils statistische Signifikanz erreichte.

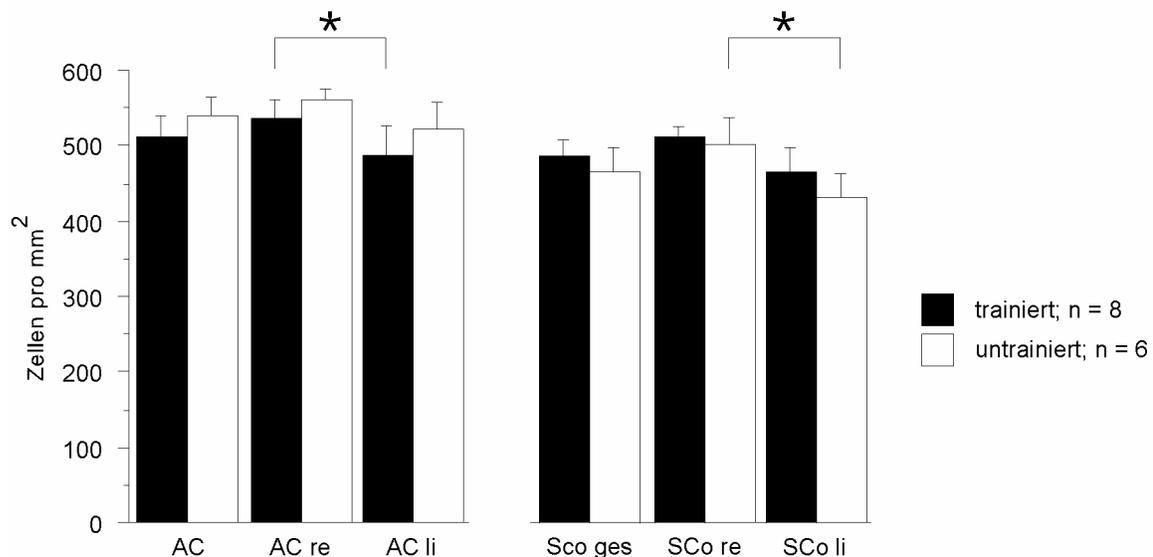


Abb. 3.18 Quantifizierung von Nurr1/2-mRNA-exprimierenden Zellen im AC und SCo von untrainierten Gerbils und von Gerbils, die 5 h vor Dekapitation einem FM-Diskriminierungstraining unterzogen worden waren. Es sind jeweils die Ergebnisse der rechten und linken Hemisphäre sowie die Mittelwerte aus beiden dargestellt.

* - signifikanter Unterschied innerhalb einer Gruppe (t-Test mit abhängigen Stichproben)

3.2.5.3. Ermittlung der Neuronendichte im AC des Gerbils

Da die untersuchten mRNAs sehr unterschiedliche Expressionsniveaus zeigten, stellte sich die Frage, ob einige dieser Transkripte in allen Neuronen des AC basal exprimiert werden und somit die Erfassung einer trainingsbedingten Zunahme der Anzahl von Zellen, welche die nachzuweisende mRNA exprimieren, nicht möglich ist. Daher wurde als Vergleich die Anzahl von Neuronen im AC des Gerbils in 20 μm dicken Nissl-gefärbten Schnitten bestimmt. Für diesen Versuch wurden Hirnschnitte von 3 naiven Gerbils genutzt. Die Auszählung der Zellen im AC erfolgte wie unter 2.2.14.5 beschrieben. Gliazellen wurden von Neuronen durch das Fehlen von sichtbarem Zytoplasma, einer dickeren nukleären Membran sowie durch eine heterogenere Verteilung von Chromatin unterschieden (Cajal, 1995; Rajkowska *et al.*, 2001). Für Nissl-gefärbte Schnitte konnte eine durchschnittliche Anzahl von 1050 ± 36 Neuronen pro mm^2 im AC

des Mongolischen Gerbils bestimmt werden. Ein Vergleich mit den in den verschiedenen ISH ermittelten Zellzahlen ist in Abb. 3.19 dargestellt. Die beiden IEG's, Arc und Nurr1/2, zeigten die geringsten Expressionslevel, gefolgt vom Ca^{2+} -bindenden Protein VILIP-1. Die höchste Expression im Vergleich zu den eben genannten mRNAs waren für $\alpha 1/\alpha 2$ -Chimerin und Translin nachweisbar. Insgesamt war die Anzahl der Zellen, welche Translin oder $\alpha 1/\alpha 2$ -Chimerin exprimierten, immer noch deutlich geringer als die durch Nissl-Färbung ermittelte Gesamtanzahl von Neuronen. Eine Steigerung der Zellzahlen, welche die nachgewiesenen Transkripte exprimieren, war somit noch möglich.

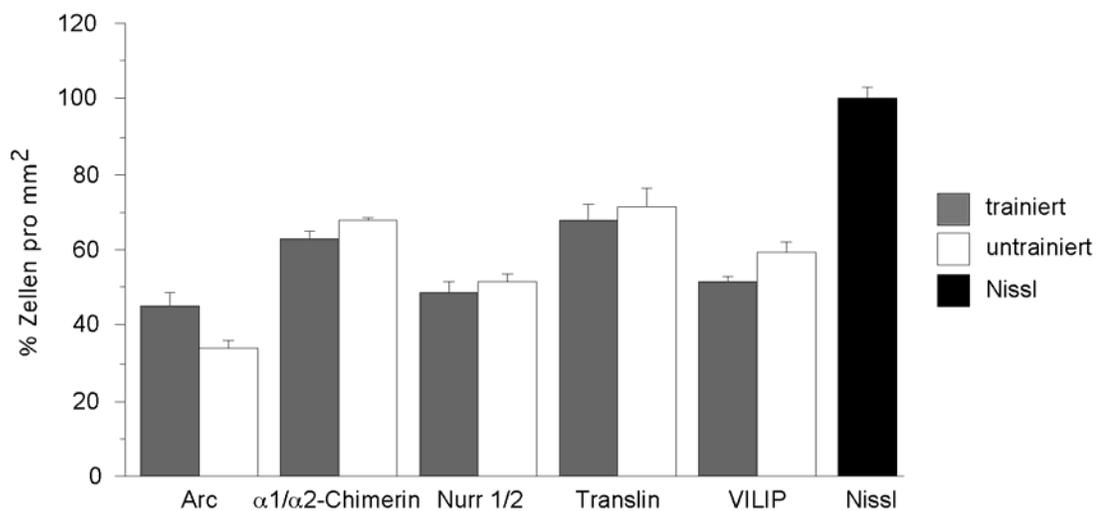


Abb. 3.19 Ermittelte Gesamtanzahl von Neuronen im AC des Gerbils in Nissl-gefärbten Schnitten im Vergleich zu den verschiedenen Ergebnissen nach Quantifizierungen der *in situ*-Hybridisierungen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an positiven Zellen pro mm^2 im AC im Vergleich zu der mittels Nissl-Färbung bestimmten Anzahl von Neuronen im AC.

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung des AC des Mongolischen Gerbils für FM-Diskriminierungslernen zu untersuchen. Hierzu wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Um die Frage nach der funktionellen Relevanz von Proteinsynthese im AC des Gerbils für Akquisition, Konsolidierung, Retention und Abrufung der FM-Diskriminierungsreaktion nachzuprüfen, wurde eine pharmakologische Herangehensweise gewählt. In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob es zu Veränderungen in der Genexpression auf Ebene der Transkription im AC der Mongolischen Wüstenrennmaus nach der Akquisition einer FM-Diskriminierungsreaktion kommt.

Da für die Applikation der Pharmaka operative Eingriffe und der Einsatz von Anästhetika notwendig waren, wurde in einem ersten Versuchsansatz der Einfluss dieser Manipulationen auf das Diskriminierungsverhalten der Versuchstiere geprüft.

4.1. Pharmakologische Untersuchungen zu Proteinsynthese-abhängigen Prozessen im auditorischen Kortex der Mongolischen Wüstenrennmaus im Zusammenhang mit FM-Diskriminierungslernen

4.1.1. Einfluss von Operation, Narkose und Injektionsprozedur auf die Diskriminierungsleistung

Als Voraussetzung für die geplanten Studien wurde der Einfluss der Operation, der Narkose sowie der intrazerebralen Injektion auf die Diskriminierungsleistung der Tiere überprüft. Die Operation erfolgte einen Tag vor, die Injektion von Kochsalzlösung erfolgte 5 min und 2 h nach dem initialen Training. Während des initialen Trainings war eine erhöhte Gesamtaktivität der operierten Tiere im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen nachweisbar, welche vermutlich auf die Operation einen Tag zuvor zurückzuführen war. Die Diskriminierungsleistung der behandelten Gerbils unterschied sich aber weder im initialen Training noch in den in nachfolgenden Trainingssitzungen signifikant von der unbehandelten Tiere. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Behandlungsschritte, welche für die Substanzapplikation notwendig waren, keine Beeinträchtigung des Erlernens und der Durchführung der FM-Diskriminierungsreaktion verursachen. Das Ergebnis steht im Einklang mit Studien, die zeigen konnten, dass eine Halothannarkose bei Nagern keine retrograde Amnesie auslöst und eine

anterograde Amnesie nur erfolgen kann, wenn die Narkose innerhalb von 2 h vor einem Lernexperiment verabreicht wird (Rosman *et al.*, 1992).

Weiterhin war es notwendig, die korrekte Positionierung der Injektionspipetten zu überprüfen. Entsprechende Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Frank Ohl (IfN) durchgeführt, der dafür die 2DG Methode verwendete. Gehirne von Gerbils, die Injektionen in den AC erhalten hatten, wurden horizontal geschnitten (40 μ m) und für die autoradiographische Analyse exponiert (Ohl *et al.*, 1999). Die Auswertung dieser Hirnschnitte ergab, dass die Injektionspipetten korrekt im primären (AI), dem anterioren (AAF) und den posterioren (DP/VP) Feldern des AC des Gerbils platziert waren.

Frühere Studien an Mongolischen Gerbils zeigten, dass sowohl die bilaterale als auch die unilateral-rechtsseitige irreversible Läsion des AC mittels Thermokoagulation zu einer massiven Beeinträchtigung des FM-Diskriminierungsverhaltens führte. Dagegen waren Läsionen des linken AC diesbezüglich ohne Wirkung (Wetzel *et al.*, 1998a; Ohl *et al.*, 1999). Wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, führte die unilateral rechtshemisphärische Applikation von ANI 5 min und 2 h nach FM-Diskriminierungstraining von Gerbils zu keiner messbaren Beeinträchtigung der Diskriminierungsleistung an den nachfolgenden Trainingstagen. Die Befunde sprechen dafür, dass die funktionelle Integrität dieser Hirnstruktur durch die Behandlung nicht zerstört wurde.

4.1.2. Injektionen von Anisomycin und Emetin

Nachdem die Notwendigkeit beidseitiger Applikationen gezeigt worden war, wurden die Inhibitoren der Elongation der Translation ANI und EME (Grollman, 1967; Goodman Gilman *et al.*, 1985) bilateral in drei Felder des AC, nämlich AI, AAF und DP/VP, injiziert. Die verwendeten Dosierungen wurden aus der Literatur entnommen (Grecksch und Matthies, 1980; Patterson *et al.*, 1986; Rosenblum *et al.*, 1993; Meiri und Rosenblum, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass Gerbils, denen der Proteinsyntheseinhibitor ANI zu verschiedenen Zeiten nach einem Training zum Erwerb der Diskriminierungsreaktion bilateral in den AC appliziert wurde, im Vergleich zu Kontrolltieren, an den nachfolgenden Trainingstagen Defizite in der Diskriminierungsleistung aufwiesen. Die ANI-behandelten Gerbils waren in der Lage, ihre Diskriminierungsleistung innerhalb einer Trainingssitzung deutlich zu verbessern. Im Gegensatz zu den Kontrolltieren begannen sie jedoch jede neue Trainingssitzung auf niedrigerem Niveau. Wurde ANI an bereits über mehrere Tage trainierte Tiere verabreicht, so blieb die vor der

Injektion erreichte Diskriminierungsleistung erhalten, während eine Verbesserung der Reaktion, wie in den Kontrolltieren, über mehrere Trainingstage hinweg gestört war. Die Injektion eines weiteren Inhibitors der Proteinsynthese, EME, zeigte eine ähnliche Wirkung. Weder ANI noch EME beeinflussten die Diskriminierungsleistung der Gerbils, wenn sie einige Tage vor dem initialen Training appliziert wurden.

Verschiedene Kontrollexperimente wurden durchgeführt, um mögliche unspezifische Nebenwirkungen der pharmakologischen Behandlung auszuschließen. Wie bereits beschrieben, führten Operation, Narkose und Injektionsprozedur zu keiner signifikanten Beeinträchtigung des Erlernens und der Durchführung der FM-Diskriminierungsreaktion. Funktionelle Schädigungen des AC durch die Injektion der Substanzen konnten ausgeschlossen werden, da unilaterale Injektionen von ANI nach Training keinen Einfluss auf die Diskriminierungsleistung hatten, während unilaterale Läsionen zu einer starken Beeinträchtigung der Tiere führten. Das Diskriminierungsverhalten war nicht beeinflusst, wenn die Inhibitoren ANI oder EME 2 bzw. 3 Tage vor dem initialen Training appliziert wurden. Keinen Effekt hatte die Applikation von ANI oder EME in den AC von bereits vortrainierten Tieren auf die vor der Injektion etablierte Diskriminierungsreaktion in den nachfolgenden Trainingssitzungen. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass weder die Operation, noch Narkose, die Injektion, die Hemmstoffe selbst oder die Inhibition der Proteinsynthese sich störend auf Mechanismen auswirken, die in die Durchführung, Abrufung, Retention und Expression der etablierten FM-Diskriminierungsreaktion involviert sein könnten und so möglicherweise einen amnestischen Effekt verursachen.

Die Resultate zeigen, dass die Applikation von Inhibitoren der Proteinsynthese in den AC des Gerbils in zeitlicher Nähe zum Lernexperiment notwendig ist, um einen amnestischen Effekt auszulösen. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in verschiedenen Spezies, Paradigmen und Hirnregionen von anderen Autoren beschrieben (Übersicht siehe Davis und Squire, 1984; Stork und Welzl, 1999). In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass Proteinsynthese-abhängige Prozesse im auditorischen Kortex des Gerbils für Aspekte der FM-Verarbeitung, die in die Konsolidierung und lang anhaltende Stabilisierung eines Langzeitgedächtnisses involviert sind, eine Rolle spielen.

Für ANI wurden neben der Inhibition der Proteinsynthese auch weitere Wirkmechanismen beschrieben. Durch die Gabe von ANI kann es zur Aktivierung von Stress-aktivierten *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) kommen, wie z. B. der *c-Jun N-terminal kinase*, die p38 sowie der *extracellular regulated kinase* (ERK) und zu einer transkriptionellen Induktion der Zielgene

dieser Kinasen, wie der IEGs *c-fos*, *c-jun* und *Zif268* (Edwards und Mahadevan, 1992; Torocsik und Szeberenyi, 2000). Die Wirkung von ANI auf die Diskriminierungsleistung könnte daher auf zusätzliche unspezifische physiologische Einflüsse zurückzuführen sein. Deshalb wurde anlehnend an vorhergehende Befunde ein Kontrollexperiment durchgeführt. Von Barea-Rodriguez *et al.* (2000) wurde im Hippokampus der Ratte gezeigt, dass die Applikation von 1 µl einer 10 mM ANI-Lösung die Proteinsynthese signifikant beeinträchtigte, wohingegen für eine 0,04 mM Lösung nur ein geringfügiger Effekt nachweisbar war. In unseren Experimenten hatte die Injektion von 0,04 mM ANI 5 min und 2 h nach dem initialen Training keinen Einfluss auf Diskriminierungsleistung in den nachfolgenden Trainingssitzungen im Vergleich zu Kontrolltieren (Horst Schicknick, persönliche Mitteilung). Der zu beobachtende amnestische Effekt des ANI scheint somit dosisabhängig zu sein. Die verwendeten Konzentrationen von ANI sollten laut Literatur mindestens 80 % der Proteinsynthese im AC des Gerbils hemmen. Dieses Ausmaß an Hemmung ist in anderen Spezies und Lernparadigmen notwendig, um einen amnestischen Effekt hervorzurufen (Flood *et al.*, 1973; Flood *et al.*, 1975; Barea-Rodriguez *et al.*, 2000). Darüber hinaus beeinträchtigte die Applikation von EME, eines anderen Inhibitors der Translation, in vergleichbarer Weise wie ANI die Diskriminierungsleistung der Gerbils. Der Effekt von EME auf die oben beschriebenen von ANI beeinflussten Kinase-Signalwege ist dagegen vernachlässigbar. Sowohl ANI als auch EME wurden als Inhibitoren der Proteinsynthese identifiziert aber mit verschiedenen unspezifischen Nebeneffekten. Für beide konnte aber ein ähnlicher Einfluss auf die Diskriminierungsleistung festgestellt werden. Dies legt nahe, dass die beobachteten amnestischen Effekte durch eine Inhibition der Proteinsynthese hervorgerufen wurden.

Veränderungen im Verhalten der Tiere in den Trainingssitzungen nach dem initialen Training, reflektieren möglicherweise viele Prozesse, einschließlich Akquisition, Konsolidierung, Retention und Abrufung des Gedächtnisses (Abel und Lattal, 2001; Cahill *et al.*, 2001). Um Nebenwirkungen des ANI auf Mechanismen, die möglicherweise mit dem Diskriminierungsverhalten interferieren, zu überprüfen, erfolgte parallel die Überwachung und Aufnahme weiterer Parameter, wie der Explorationsaktivität (SA) und der Seitenwechsel zwischen den Trainingsläufen (ITC). Diese Werte sollten Aussagen über den Aktivitätsstatus, mögliche Auswirkungen der Substanzapplikation auf die Sensorik wie auch auf das motorische System geben. Für die ITC als auch die Explorationsaktivität konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Inhibitor-behandelten und Kontrolltieren festgestellt werden. Ein sehr wichtiges Ergebnis war, dass im Vergleich zum initialen Training, die Explorationsaktivität in

allen Versuchen abnahm und die Anzahl der bedingten Reaktionen anstieg. Diese Veränderungen spiegeln wahrscheinlich eine Gewöhnung der Tiere an die Shuttle Box und die Prozedur wider, was darauf hindeutet, dass die Gerbils unabhängig von der Behandlung in der Lage sind, sich an die experimentelle Situation zu erinnern. Die Inhibitoren verursachen keine Veränderungen, die Wachsamkeit, Aktivität oder Sensitivität des sensorischen und motorischen Systems beeinflussen und damit für die schlechtere Diskriminierungsleistung der ANI- oder EME-behandelten Tiere in Vergleich zu den Kontrolltieren verantwortlich sein könnten.

Gerbils, denen unmittelbar und 2 h nach dem initialen Training ANI bilateral in den AC appliziert worden war, zeigten eine deutliche Steigerung ihrer Diskriminierungsleistung zwischen den ersten 24 Läufen (Block A) und den verbleibenden 36 Läufen (Block B, siehe Abb. 3.3). Die Diskriminierungsrate der ANI-behandelten Gerbils unterschied sich an den Tagen nach der Injektion im Block B nicht von der Kontrollgruppe. Die ANI-behandelten Tiere sind also in der Lage, die sensorischen Prozesse auszuführen, welche für die Richtungsdiskriminierung von FMs erforderlich sind und die entsprechende Verhaltensantwort zu geben. Sie sind aber nicht fähig, in den ersten Trainingsläufen nach Applikation der Substanzen die am Tag zuvor gezeigte Diskriminierungsleistung wieder zu erbringen. Daraus könnte man schließen, dass die erlernte Reaktion zwischen den einzelnen Trainingssitzungen, wenn die Tiere wieder in ihrem Käfigen untergebracht sind, nicht stabilisiert wird und die Gerbils innerhalb einer jeden Trainingssitzung ein Kurzzeitgedächtnis für die Diskriminierung von FMs ausbilden. Die beobachtete Steigerung der Diskriminierungsleistung innerhalb einer Trainingssitzung nach Injektion von ANI könnte aber auch darauf hinweisen, dass in der ersten Hälfte die Abrufung gestört war und während des Training wieder hergestellt wurde.

Da die bilaterale Applikation von ANI und EME die Expression einer bereits etablierten Reaktion nicht beeinträchtigte, kann die amnestische Wirkung der Proteinsyntheseinhibitoren nicht durch einen Effekt auf die generelle Fähigkeit des Behaltens und Abrufens erklärt werden. Die beobachteten Ergebnisse stehen allerdings im Widerspruch zu Befunden, nachdem die erneute Aktivierung einer Erinnerung Prozesse der Rekonsolidierung initiiert, die anfällig sind für Interventionen mit Proteinsyntheseinhibitoren und dadurch zu einer retrograden Amnesie führen. Diese Hypothese wurde bereits in 60er und 70er Jahren aufgestellt, als gezeigt werden konnte, dass die Gedächtnisleistung in einem bestimmten Zeitraum nach Reaktivierung sensitiv ist für amnestisch wirkende Substanzen oder Behandlungen (Misanin *et al.*, 1968; Howard und Meyer, 1971; Przybylski und Sara, 1997; Nader *et al.*, 2000; Sara, 2000). Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse stimmen aber mit Studien überein, die zeigen, dass

die Abrufung eines Gedächtnisses keine Proteinsynthese-abhängigen Prozesse der Rekonsolidierung aktiviert (Berman und Dudai, 2001; Lattal und Abel, 2001; Taubenfeld *et al.*, 2001; Vianna *et al.*, 2001). Dies deutet darauf hin, dass Mechanismen, die der Stabilisierung von reaktiviertem Gedächtnis zugrunde liegen, wahrscheinlich spezifisch für die jeweilige Gehirnregion und das Trainingsparadigma sind. Für Gerbils konnte 24 h nach der Injektion der Inhibitoren kein Einbruch ihrer partiell etablierten Diskriminierungsleistung nachgewiesen werden, sie war vergleichbar zum Vortag.

Im Vergleich zu den Kontrolltieren war eine weitere Verbesserung der Inhibitor-behandelten Tiere mit partiell etablierter Diskriminierungsleistung über mehrere Trainingstage gestört. Dieses Resultat lässt vermuten, dass Prozesse der Speicherung von neuer Information in bereits existierende Speicher auf ähnlichen Proteinsynthese-abhängigen Mechanismen der Konsolidierung beruhen könnten, wie die Stabilisierung der Reaktion nach initialer Akquisition. Für Gerbils, welchen ANI nach dem initialen Training appliziert wurde, konnte trotz der im Vergleich zu Kontrolltieren schlechteren Diskriminierungsleistung in nachfolgenden Trainingssitzungen eine Verbesserung der Diskriminierungsrate ermittelt werden. Eine völlige, irreversible Blockierung der Konsolidierung des Gedächtnisses für die Diskriminierung der Richtung von FMs kann daher ausgeschlossen werden. Dennoch war im Vergleich zu Kontrolltieren für die ANI-behandelten Tiere ein Defizit in der Diskriminierungsleistung über mehrere Trainingstage nachweisbar. Bereits in anderen Lernparadigmen war nach Applikation von ANI in verschiedene Gehirnregionen ein Effekt des Inhibitors über mehrere Tage nachweisbar, wie z. B. nach der Konditionierung des Lidreflexes bei Kaninchen sowie dem Auslösen eines einmaligen inhibitorischen Vermeidungstrainings bei Ratten (Bracha *et al.*, 1998; Vianna *et al.*, 2001). Im Gegensatz zum letzten Beispiel konnte das Auslösen einer Gedächtnisleistung für die *conditioned taste aversion* mittels ANI nicht über mehrere Tage verhindert werden (Berman und Dudai, 2001). Eine lang anhaltende Wirkung der Proteinsyntheseinhibitoren scheint also abhängig vom gewählten Lernparadigma, der Spezies und der Gehirnregion zu sein. Eine Studie im AC des Meerschweinchens nach Tonkonditionierung zeigte, dass sich neuronale Filtereigenschaften über mehrere Tage veränderten, was als ein Beleg für lang dauernde Konsolidierungsprozesse gewertet wird (Galvan und Weinberger, 2002). Diese Veränderungen der Filtereigenschaften erreichten erst 3 Tage nach der Konditionierung ein asymptotisches Niveau. Die Autoren vermuten, dass es sich dabei um Prozesse der Konsolidierung eines Gedächtnisses im AC des Meerschweinchens nach klassischer

Konditionierung handelt, deren Ausbildung bis zu 3 Tagen andauert. Dies würde sehr gut mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnissen korrespondieren.

Die dargestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Applikation von Proteinsyntheseinhibitoren in den Hörkortex des Mongolischen Gerbils in zeitlicher Nähe zum Lernexperiment mit Aspekten der FM-Verarbeitung, die in die Konsolidierung, also Stabilisierung und Sicherung der Abrufbarkeit, eines Langzeitgedächtnisses für die Diskriminierungsreaktion involviert sind, interferieren.

4.1.3. Injektion von Rapamycin und FK506

Am Modell des Mantelrückzugreflexes der Meeresschnecke *Aplysia* wurde erstmals ein bisher an Neuronen zum ersten Mal verwendeter Inhibitor der Regulation der Translation, RAPA, im Zusammenhang mit Mechanismen von synaptischer Plastizität untersucht. Wird ein Axon eines sensorischen Neurons von *Aplysia* mit 5 Pulsen Serotonin (5-HT) stimuliert, induziert dies eine synaptische Langzeitverstärkung, welche Transkription sowie die Synthese von neuen Proteinen benötigt. Wenn gleichzeitig ein einzelner Stimulus 5-HT, welcher sonst nur eine Proteinsynthese-unabhängige Kurzzeitverstärkung induziert, auf ein zweites Axon des sensorischen Neurons appliziert wird, dann führt dies zu einer Langzeitverstärkung an der Synapse (Martin *et al.*, 1997; Casadio *et al.*, 1999). Die Autoren vermuten, dass diese Synapse markiert wurde, ähnlich dem für adulte Hippokampus-Schnitte beschriebenen synaptischen *tagging* (Frey und Morris, 1997). Diese Langzeitverstärkung kann 24 h nach Induktion sowohl morphologisch als auch elektrophysiologisch nachgewiesen werden. Die durch den einzelnen 5-HT Puls hervorgerufene Langzeitverstärkung ist bei nachfolgender Applikation von RAPA oder EME 72 h später nicht mehr nachweisbar (Casadio *et al.*, 1999). Die an dem Axon des sensorischen Neurons durch fünf Pulse 5-HT induzierte Langzeitverstärkung wird ebenfalls durch die Applikation von RAPA 72 h später blockiert. Diese Stabilisierung der synaptischen Langzeitverstärkung in beiden Axonen des sensorischen Neurons erfordert RAPA-sensitive Mechanismen, deren Fehlen lang anhaltende funktionelle und strukturelle Veränderungen an den Synapsen blockiert.

RAPA bindet im Komplex mit FKBP12 an die Kinase mTOR. Durch den Komplex werden verschiedene Signalwege, die an der Regulation der Initiation der Translation beteiligt sind, inhibiert. Könnten die beobachteten lang anhaltenden Effekte von ANI oder EME eine RAPA-sensitive Komponente enthalten?

Die Applikation von RAPA nach dem initialen Training führte zu keinerlei Beeinträchtigung der nach 24 h im Vergleich zu Kontrolltieren gemessenen Diskriminierungsleistung. In der darauf folgenden Trainingssitzung waren jedoch Diskriminierungsdefizite bei RAPA-behandelten Tieren nachweisbar.

Zu Beginn der Experimente war noch nichts bekannt über die Wirkung von intrazerebral injizierten RAPA. Wie erst kürzlich publiziert wurde, führt die intrakraniale Injektion von 50 nM RAPA unmittelbar nach einem passiven Vermeidungslernen in Küken zu einer Beeinträchtigung des Kurzzeitgedächtnisses (Bennett *et al.*, 2002). Nach Perfusion eines hippokampalen Schnittes der Ratte mit RAPA kommt es zu keiner Veränderung der basalen Transmission (Tang *et al.*, 2002). Um Nebenwirkungen des RAPA und FK506 auf Mechanismen, die möglicherweise mit dem Diskriminierungsverhalten interferieren, zu überprüfen, erfolgte die Überwachung und Aufnahme weiterer Parameter, wie der SA und der ITC. Für die ITC wie auch die SA konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen nachgewiesen werden. Die Explorationsaktivität nahm im Vergleich zum initialen Training ab und die Anzahl der bedingten Reaktionen stieg an. Wie bereits für die analogen ANI-Experimente beschrieben, spiegeln diese Veränderungen wahrscheinlich eine Gewöhnung der Tiere an die Trainingsbox und an die allgemeine Prozedur wider. Die Gerbils sind also unabhängig von der Behandlung in der Lage, sich an die experimentelle Situation zu erinnern. RAPA oder auch FK506 verursachen keine Veränderungen, welche die Wachsamkeit, Aktivität oder Sensitivität des sensorischen und motorischen Systems beeinflussen und damit für die sinkende Diskriminierungsleistung der RAPA-behandelten Tiere im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen verantwortlich sein könnten.

Der Effekt von RAPA war aber erst 48 h nach der Injektion zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass bei diesen Gerbils die Applikation von RAPA nach der Akquisition zu einer Inhibition von Komponenten oder Strukturen führt, welche für die Stabilisierung und/oder die Möglichkeit der Abrufung des Langzeitgedächtnis über 24 h hinaus benötigt werden. Wie bereits für *Aplysia* vermutet, könnte dies auf einer Hemmung der lokalen synaptischen Proteinsynthese beruhen.

Welche intrazellulären Signalwege werden möglicherweise durch RAPA beeinflusst? Der intrazelluläre Rezeptor für RAPA in Eukaryoten ist FKBP12. FKBP12 ist eine Peptidyl-prolyl-cis/trans-Isomerase, welche die *cis/trans* bzw. *trans/cis* Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen in prolinhaltigen Peptiden oder Proteinen katalysiert.

FKBP12, der Hauptbindungspartner für RAPA, wurde als integraler Bestandteil zweier Ca^{2+} -Kanäle identifiziert. So liegt FKBP12 im Komplex mit dem Inositol-1,4,5-triphosphat-

Rezeptor (IP3R) und Ryanodin-Rezeptor (RyR) vor (Schiene-Fischer und Yu, 2001). FKBP12 scheint weiterhin eine Funktion bei der Regulation der Wirkung von Wachstumsfaktoren wie dem *transforming growth factor* β (TGF β) und dem *epidermal growth factor* (EGF) zu haben (Schiene-Fischer und Yu, 2001). Sowohl RAPA als auch FK506, sind in der Lage, FKBP12 vom RyR sowie vom IP3R zu verdrängen sowie die Phosphorylierung und damit Aktivierung von TGF β und EGF zu verstärken (Schiene-Fischer und Yu, 2001). Die Isomerase-Aktivität von FKBP12 kann durch Bindung von RAPA wie auch FK506 inhibiert werden. FK506 kompetitiert mit RAPA um die Bindungsstelle in FKBP12, wobei die Affinität für FKBP12 von RAPA ca. 2fach höher ist als die von FK506 (Abraham und Wiederrecht, 1996). Der FKBP12/RAPA-Komplex bindet mit hoher Affinität an das evolutionär hoch konservierte 289 kDa Protein mTOR (Synonyme: TOR, RAFT, FRAP, SEP oder RAPT), während der FKBP12/FK506-Komplex die Aktivität der Ca²⁺-Calmodulin-abhängigen Proteinphosphatase Calcineurin inhibiert (Liu *et al.*, 1991).

mTOR ist eine Serin/Threonin Kinase und gehört zur Familie der Phosphatidylinositolkinase-ähnlichen Kinasen (Schmelzle und Hall, 2000). Ob der Komplex RAPA/FKBP12 die Kinaseaktivität von mTOR direkt inhibiert, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden (Raught *et al.*, 2001). mTOR reguliert die Translation von bestimmten Subklassen von mRNAs durch die Regulation der Phosphorylierung von verschiedenen Proteinen in der Zellkultur (Raught *et al.*, 2001). Diese Komponenten der Translation sind die ribosomalen S6 Kinasen, S6K1 und S6K2, 4E-BPs (4IF4E-Bindungsproteine), eIF4GI, eIF4B und eEF2. Die ribosomalen S6 Kinasen regulieren die Translation einer Klasse von mRNAs, welche an ihrem 5'-Ende mehrere Pyrimidine besitzt (5'-TOP). Zu dieser Klasse gehören mRNAs von ribosomalen Proteinen, andere Komponenten der Translation sowie Proteine, die für die Prozessierung von mRNA verantwortlich sind (Meyuhas und Hornstein, 2000). Die Aktivierung der S6K resultiert in der Phosphorylierung des 40S ribosomalen S6 Proteins und des Initiationsfaktor eIF4B (Fumagalli und Thomas, 2000; Meyuhas und Hornstein, 2000). Die S6K können durch RAPA gehemmt werden (Thomas und Hall, 1997). mTOR moduliert ebenfalls die Phosphorylierung des 4E-BPs (Gingras *et al.*, 1999; Mothe-Satney *et al.*, 2000). 4E-BP1 ist ein eIF4E Inhibitor. Durch die Phosphorylierung von 4E-BP1 reduziert sich seine Affinität zu eIF4E, welches im hypophosphorylierten Zustand mit hoher Affinität an eIF4E bindet. Dadurch wird die Interaktion von eIF4E mit eIF4G verhindert und die Entstehung des aktiven eIF4F-Multiproteinkomplexes, welcher an die Cap-Struktur am 5'-Ende der mRNA bindet und die Translation initiiert, gehemmt (Hershey und Merrick, 2000; Raught *et al.*, 2000; Miron *et al.*, 2001). Zusätzlich zur Modulation

der Translation während der Initiationsphase kann diese auch während der Elongation bei Eukaryoten beeinflusst werden. Der Elongationsfaktor eEF2 fördert die Translokation der mRNA vom ribosomalen Ort H zu P (Merrick und Nyborg, 2000; Proud, 2000). Phosphoryliertes eEF2 inhibiert diesen Prozess und die RAPA-Behandlung verhindert die Dephosphorylierung (Redpath *et al.*, 1996). Ob mTOR die Aktivität von eEF2 reguliert ist unklar.

mTOR reguliert also u. a. den Phosphorylierungszustand von Proteinen, die in die Translationskontrolle involviert sind. Welche Rolle könnte mTOR bei Lern- und Gedächtnisvorgängen spielen? RAPA inhibiert die Langzeitverstärkung in *Aplysia*-Neuronen (Casadio *et al.*, 1999), die frühe Phase einer BDNF induzierten LTP sowie die späte Phase (2 – 3 h nach Tetanus) einer LTP in hippocampalen Schnitten von Ratten (Raymond *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2002). 5-HT-Behandlung von *Aplysia*-Neuronen steigert die Phosphorylierung der S6K1. Dieser Signalweg ist RAPA-sensitiv (Khan *et al.*, 2001). Dopamin-Applikation in Zellkultur aktiviert RAPA-abhängig ebenfalls die S6K1 (Polakiewicz *et al.*, 1998).

mTOR interagiert mit Gephyrin, welches in das Gruppieren von GABA_A- und Glyzin-Rezeptoren involviert ist. Diese Bindung ist notwendig für das Signal zur S6K1 sowie zu 4E-BP1 (Essrich *et al.*, 1998; Sabatini *et al.*, 1999). Neurabin, ein neuronenspezifisches F-Aktin-bindendes Protein, bindet über seine PDZ-Domäne an den C-terminalen Teil der S6K1 und transportiert die S6K1 zu Nervendigungen (Nakanishi *et al.*, 1997; Burnett *et al.*, 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mTOR, Gephyrin, S6K1 und Neurabin sich in einer synaptosomalen Fraktion anreichern (Burnett *et al.*, 1998; Sabatini *et al.*, 1999). Studien in kultivierten Hippokampus-Neuronen deuten darauf hin, dass eIF4E, 4EBP1, 4EBP2 und mTOR an der Postsynapse angereichert sind (Tang *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse sprechen für eine lokale Funktion von mTOR in der Regulation von synaptischer Proteinsynthese. Eine andere Verbindung zwischen mTOR und lokaler Translation könnte die Modulation der Phosphorylierung von eEF2 über verschiedene Neurotransmitter sein. Glutamat- und NMDA-Behandlung von kortikalen Neuronen in Zellkultur führt zu einer verstärkten Phosphorylierung von eEF2 und zu einer Verringerung der Translationsrate in Zellkörpern sowie in proximalen aber nicht distalen Zellfortsätzen (Marin *et al.*, 1997; Scheetz *et al.*, 2000). Weitere Studien weisen darauf hin, dass die Phosphorylierung des Elongationsfaktors die Translation von bestimmten mRNAs, wie die der alpha-Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase II (α CaMKII), in Dendriten verstärkt (Scheetz *et al.*, 1997; Scheetz *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit, war der Effekt von RAPA 48 h nach dem initialen Training nachweisbar. Es stellte sich die Frage, ob der beobachtete Einfluss von RAPA auf seine Bindung

an FKBP12 und damit möglicherweise auf die Inhibition der Aktivität vom mTOR sowie die Hemmung der Translation zurückzuführen ist. In einem parallelen Wettbewerbsversuch wurden dazu die Bindungsstellen von FKBP12 mit FK506 abgesättigt und anschließend RAPA appliziert. Es sollte getestet werden, ob durch die Blockade der FKBP12-Bindungsstelle für RAPA sein Effekt auf die Diskriminierungsleistung unterdrückt werden kann. Der 100fache Überschuss von FK506 hob den durch RAPA verursachten Effekt vollständig auf. Die Injektion von FK506 gefolgt von einer Doppel-Injektion NaCl beeinflusste dagegen die Diskriminierungsleistung der Tiere nicht. Sowohl RAPA als auch FK506 hemmen durch die Bindung an FKBP12 dessen Isomerase-Aktivität und beide sind in der Lage, FKBP12 von den Rezeptoren zu verdrängen. Der RAPA-FKBP12-Komplex bindet aber im Gegensatz zu dem FK506-FKBP12-Komplex an mTOR.

Die Ergebnisse dieses Versuches deuten darauf hin, dass der durch RAPA hervorgerufene amnestische Effekt über den RAPA-FKBP12-mTOR-Signalweg vermittelt wird. Es ist daher zu vermuten, dass RAPA-sensitive Mechanismen der Regulation der Initiation der Translation für die lang anhaltende Stabilisierung eines Gedächtnisses für die Diskriminierung von FM im AC des Gerbils eine wichtige Rolle spielen.

4.2. Veränderungen in der Genexpression nach FM-Diskriminierungstraining

4.2.1. Erhöhte Expression von Arc (Arg3.1)-mRNA nach FM-Diskriminierungstraining

Um einen ersten Hinweis zu erhalten, ob es im Hörkortex des Gerbils nach FM-Diskriminierungslernen zu Änderungen in der Genexpression kommt, wurde zu Beginn die Expression von Arc untersucht. Für die mRNA von Arc konnte bereits in kortikalen Strukturen der Maus 4,5 h nach Präsentation eines neuen Stimulus eine erhöhte Expression nachgewiesen werden (Montag-Sallaz *et al.*, 1999). Arc wurde als ein IEG identifiziert (Link *et al.*, 1995; Lyford *et al.*, 1995). Für verschiedene IEGs ist eine Erhöhung der Expression unmittelbar nach Lernexperimenten gezeigt worden, so auch für Arc (Link *et al.*, 1995; Lyford *et al.*, 1995; Guzowski *et al.*, 2000). Die Expression von Arc wird massiv durch synaptische Aktivität (Link *et al.*, 1995; Lyford *et al.*, 1995; Ying *et al.*, 2002) sowie verschiedenste biochemische Stimuli induziert (z. B. Nakahara *et al.*, 2000; Pei *et al.*, 2000; Klebaur *et al.*, 2002). Arc-mRNA sowie auch das Protein wurde in Dendriten von aktivierten Synapsen nachgewiesen (Steward *et al.*, 1998; Wallace *et al.*, 1998). Durch die Blockierung der Proteinexpression mittels *antisense*-Oligonukleotiden konnte gezeigt werden, dass Arc für die Aufrechterhaltung einer LTP sowie die

Konsolidierung eines Langzeitgedächtnis für räumliches Lernen wichtig ist. In Neuronen kann durch Ca^{2+} und zyklisches Adenosin-3'5'-monophosphat (cAMP) die mRNA von Arc induziert werden. Die Induzierbarkeit ist dabei von der Aktivierung der PKA und des MAPK/ERK-Signalweges abhängig (Waltereit *et al.*, 2001). Weitere Studien deuten darauf hin, dass BDNF ein Regulator der Arc-Induktion bei lang anhaltender synaptischer Plastizität ist (Ying *et al.*, 2002). Es ist bisher wenig bekannt über die Funktion von Arc. Es wird vermutet, dass Arc an der Reorganisation des Zytoskeletts sowie der Regulation der Lokalisation von αCaMKII in die Dendriten beteiligt ist (Guzowski *et al.*, 2001).

Nach der Auswertung der ISH mit einer Sonde für Arc konnte im Hörkortex des Gerbils 5 h nach FM-Diskriminierungstraining eine erhöhte mRNA-Expression im Vergleich zu untrainierten Tieren ermittelt werden. In der Tendenz war ein ähnliches Resultat nach der Auszählung der Zellen für den SCo nachweisbar. Der SCo ist nach der Akquisition des FM-Diskriminierungstrainings vermutlich auch für die somatosensorische Integration verantwortlich. Nach Tonkonditionierung war eine Erhöhung metabolischer Aktivität (2DG) auch in dieser Kortexregion nachweisbar (Scheich *et al.*, 1993a). Eine Erhöhung des Arc-Transkriptes im SCo spricht somit nicht gegen eine spezifisch induzierte Expression von Arc-mRNA im AC im Kontext zum FM-Diskriminierungslernen.

4.2.2. Subtraktive Hybridisierung zur Detektion differentiell exprimierter Gene

Zur Detektion von Veränderungen der Genexpression auf der Ebene der mRNA finden verschiedene Techniken ihre Anwendung. Häufig genutzte sind das *Differential Display* und die subtraktive Hybridisierung. Erstmals wurde die Methode des *Differential Displays* 1992 beschrieben (Liang und Pardee, 1992). Durch die SSH werden vorzugsweise solche Gene erfasst, die in einem von zwei zu vergleichenden Zell- oder Gewebetypen eine veränderte Expression aufweisen. Vorteile der SSH sind: 1.) differentiell exprimierte Gene können sich stark anreichern (bis 1000fach), 2.) für die Durchführung sind nur wenige (3 – 4) Tage notwendig, 3.) erhaltene cDNAs können sehr schnell kloniert oder der subtrahierte cDNA-Mix direkt als Probe für eine Hybridisierung eingesetzt werden, 4.) die hohe Sensitivität sowie 5.) die Möglichkeit der Isolierung gewebespezifischer und seltener mRNAs, da der Hintergrund abundanter mRNAs (z. B. Haushaltsgene) in der subtrahierten Probe reduziert wird (Diatchenko *et al.*, 1996; Gurskaya *et al.*, 1996). Als methodischer Nachteil ist der Einsatz großer poly-A-RNA Mengen (0,5 – 2 μg) bei geringer cDNA Ausbeute seltener RNA-Transkripte zu nennen, wobei letzteres durch die

PCR-Amplifikationsrunden kompensiert werden kann. Da die SSH eine kinetische Reaktion ist, werden in beiden zu vergleichenden Gewebeproben vorkommende mRNAs nicht vollständig subtrahiert, weshalb cDNAs von im Zielgewebe 5 – 10fach erhöht exprimierter RNAs isoliert werden können.

Für die in dieser Arbeit bearbeitete Fragestellung wurde die SSH aus folgenden Gründen verwendet: nur zwei Proben sollten miteinander verglichen werden (trainiert minus untrainiert), die schnelle Durchführbarkeit des Experimentes (3 – 4 Tage) und die in der Literatur beschriebene geringe Anzahl falsch positiver PCR-Produkte (zum Teil weniger als 10 %) (Bole-Feysot *et al.*, 2000). Durch die vorherige Verwendung des SMART™ PCR cDNA Synthesis Kits stand genügend Ausgangsmenge zur Verfügung. Dieses System bietet die Möglichkeit, cDNA über die gesamte Länge der mRNA-Moleküle herzustellen, was eine Identifizierung der erhaltenen cDNAs vereinfacht. Weiterhin bestanden bereits gute Erfahrung in der Anwendung dieser Methode innerhalb der Abteilung (Dieterich *et al.*, 2002). Ferner wurde die SSH bereits zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene in der Amygdala nach Angstkonditionierung genutzt (Stork *et al.*, 2001). Nach Auswertung der identifizierten Klone mittels Northern-Blot-Hybridisierung konnten aber keine trainingsbedingten Expressionsänderungen nach Erwerb der FM-Diskriminierungsreaktion im AC des Gerbils gefunden werden.

In verschiedenen Spezies wurde bereits nachgewiesen, dass Langzeitgedächtnis eine zweite Phase intakter Proteinsynthese benötigt, die 3 – 5 h oder 6 – 7 h nach Training beginnt (Grecksch und Matthies, 1980; Chew *et al.*, 1995; Freeman *et al.*, 1995; Bourtchouladze *et al.*, 1998; Tiunova *et al.*, 1998; Quevedo *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu Kochsalz-behandelten Tieren, Gerbils, denen 4 und 6 h nach dem initialen Training ANI in den AC verabreicht worden war, in den nachfolgenden Trainingssitzungen Defizite in der Diskriminierungsleistung aufwiesen. Veränderungen in der Expression auf Ebene der Transkription wurden daher 5 h nach Akquisition, in der möglichen zweiten Phase erhöhter Proteinsynthese, untersucht. Es war aber keine Induktion auf mRNA-Niveau mittels SSH detektierbar.

Es besteht die Möglichkeit, dass sich unter den trainierten Tieren, deren AC später für die SSH eingesetzt wurden, Gerbils mit unterschiedlicher Lerndynamik befanden, d. h. die Tiere erlernten innerhalb der ersten Trainingssitzung die Diskriminierung der FMs unterschiedlich gut. Dies könnte möglicherweise in verschiedenen Expressionsniveaus resultieren. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in der Expression von mRNAs zwischen guten und schlechten Lernern möglich sind. Die Arc mRNA-Expression im dorsalen Hippokampus der

Ratte von guten Lernern nach räumlichem Lernen war stärker als die von schlechteren Lernern (Guzowski *et al.*, 2001). Eine höhere Menge des Arc Transkriptes in der CA3-Region wurde bei Wasser-deprivierten Ratten ermittelt, die länger dafür benötigten ein *leverpressing operant conditioning paradigm* (Hebel wird nach Ton gedrückt, um an Wasser zu gelangen) zu erlernen. Im Gegensatz dazu war eine geringere Arc Expression in der CA3-Region bei schnelleren Lerner nachweisbar (Kelly und Deadwyler, 2002). Wenn also die mRNA aus dem ACs von guten und schlechten Lernern 5 h nach FM-Diskriminierungstraining vermischt wurde, dann besteht die Möglichkeit, dass eine veränderte Expression mittels SSH nicht mehr detektierbar war. Weiterhin wird eine unterschiedliche Aufgabenverteilung der einzelnen Felder des AC diskutiert (Budinger *et al.*, 2000a; Budinger *et al.*, 2000b). Das könnte zu unterschiedlichen Expressionsmustern in diesen Feldern führen, die mittels SSH nicht detektiert werden konnten, da mRNA vom gesamten AC isoliert wurde.

4.2.3. Veränderungen der Genexpression nach FM-Diskriminierungstraining und Stimulation mit Kainat

4.2.3.1. Northern-Blot-Hybridisierung

Die nach der SSH identifizierten Klone wurden mit Ausnahme der Haushaltsgene und mitochondrialen Gene mittels Northern-Blot-Hybridisierung hinsichtlich trainingsbedingter Expressionsänderungen überprüft. Keines der getesteten Gene zeigte 5 h nach FM-Diskriminierungstraining eine erhöhte mRNA-Expression. Für VILIP-1-mRNA konnte eine Reduktion ermittelt werden. Parallel dazu erfolgte eine weitere Northern-Blot-Hybridisierung der Klone, bei welcher Gesamt-RNA aus Kortex und Hippokampus von Tieren, denen 6 h zuvor intraperitoneal Kainat oder physiologische Kochsalzlösung injiziert wurde, Verwendung fand. Durch Behandlung mit Kainat kommt es zur Depolarisation von Neuronen, gefolgt von epileptischen Anfällen, Neurodegeneration, Plastizität sowie Gliosis, welche besonders im Hippokampus, aber auch in kortikalen und subkortikalen Arealen ausgeprägt sind (Ben-Ari, 1985; Zagulska-Szymczak *et al.*, 2001). Durch systemische oder intrazerebrale Applikation von Kainat können bei Versuchstieren Symptome ausgelöst werden, die sehr ähnlich zu Temporallappenepilepsien des Menschen sind (Ben-Ari, 1985). Gleichzeitig können Änderungen in der Genexpression zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Injektion der Substanz detektiert werden (z. B. Pazman *et al.*, 1997; Hevroni *et al.*, 1998; Zagulska-Szymczak *et al.*, 2001). Für BDNF wie auch Activin- β A waren bereits erhöhte mRNA-Mengen im Hippokampus der Ratte

6 h nach intraperitonealer Applikation von Kainat beschrieben worden (Zafra *et al.*, 1990; Inokuchi *et al.*, 1996). Daher wurden Gerbil-spezifische cDNA-Sonden in der Northern-Blot-Hybridisierung als Positivkontrolle genutzt, um nachzuweisen, dass die Stimulation mit Kainat im Gerbil ähnliche Veränderungen auf Ebene der Transkription hervorruft, wie bei der Ratte. Tatsächlich war die Expression beider Gene deutlich erhöht, wodurch sowohl die Sensitivität plastizitätsrelevanter Mechanismen der Regulation der Transkription im Gerbilhirn, als auch die Eignung der Methode zur Erfassung von Änderungen der mRNA-Expression bestätigt wurde. In den untersuchten Hirnstrukturen von trainierten Gerbils wie auch von Kontrolltieren überstieg das Expressionsniveau beider Gene allerdings nicht die Nachweisgrenze der Methode. Eine Erhöhung der mRNA-Expression nach Applikation von Kainat wurde weiterhin für Nurr1/2, Translin und Klon 2.2.69 detektiert.

4.2.3.2. Nicht-radioaktive *in situ*-Hybridisierung

Mit Ausnahme von VILIP-1, für das eine Reprimierung der mRNA nachweisbar war, konnte für keinen weiteren Klon aus der SSH eine Expressionsänderung 5 h nach FM-Diskriminierungstraining ermittelt werden. Dies könnte auch an der fehlenden Sensitivität der Methode der Northern-Blot-Hybridisierung liegen. Daher wurden interessante Klone mittels nicht-radioaktiver ISH untersucht. Die nicht-radioaktive ISH bietet im Vergleich zur radioaktiven eine bessere zelluläre Auflösung, bei gleich guter Detektion von RNA-Transkripten. Es muss aber darauf hingewiesen werden, dass im Vergleich zur radioaktiven ISH, keine Erhöhung der Expressionsrate von mRNAs innerhalb einer Zelle nachweisbar ist, sondern nur eine Steigerung der Anzahl an Zellen, welche die jeweilig nachzuweisende mRNA transkribieren. Bei hochabundanten Transkripten, welche in fast allen Zellen zu finden sind, kann daher keine Veränderung mehr detektiert werden. Deshalb wurde zusätzlich mittels Nissl-Färbung die Anzahl neuronaler Zellen bestimmt und mit den Zellzahlen, welche nach Auszählung der einzelnen ISH ermittelt wurden, verglichen.

VILIP-1

Für VILIP-1 war eine Senkung der mRNA-Expression im AC des Mongolischen Gerbils 5 h nach FM-Diskriminierungstraining sowohl durch Northern-Blot-Hybridisierung als auch durch die Detektion der mRNA im Gewebe nachweisbar. Im Vergleich dazu konnten keine Unterschiede zwischen trainierten und untrainierten Gerbils im SCo ermittelt werden. Dies

spricht für eine spezifische Regulation der Expression von VILIP-1-mRNA im AC des Gerbils nach FM-Diskriminierungstraining. Im Kortex bzw. Hippokampus fanden sich keine Unterschiede 6 h nach der intraperitonealen Applikation von Kainat im Vergleich zu NaCl-behandelten Gerbils.

Bereits für andere Ca^{2+} -bindende Proteine konnten nach einem Lernexperiment Änderungen in der Genexpression nachgewiesen werden. In der Amygdala der Ratte wurde 6 h nach einer Angstkonditionierung eine erhöhte mRNA-Menge für Neurocalcin δ , einem Mitglied der NCS-Familie, beschrieben (Stork *et al.*, 2001). Die Sensitisierung von *Aplysia* führte zu einer Steigerung der mRNA-Konzentration von Calreticulin, einem Ca^{2+} -bindenden Protein im endoplasmatischen Retikulum der Präsynapse des sensorischen Neurons (Kennedy *et al.*, 1992). Nach Hell-Dunkel-Diskriminierungslernen in der Y-Kammer wurde 24 h später eine signifikante Verringerung der Parvalbumin-Protein-Konzentration gegenüber passiven Kontrollen im Hippokampus der Ratte gemessen (Handsack, 1995). Eine deutliche Steigerung der VILIP-1-Protein- und mRNA-Expression konnte einen Tag nach der Induktion einer LTP im Gyrus dentatus festgestellt werden (Manahan-Vaughan und Braunewell, 1996). Die Aktivierung von Gruppe 1 metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR) durch (R,S)-3,5-Dihydroxyphenylglycin führte zu einer verstärkten Expression von VILIP-1 im Gyrus dentatus sowie der CA1- und CA3-Region 24 h nach Substanzapplikation (Manahan-Vaughan und Braunewell, 1996). VILIP-1 spielt möglicherweise bei den molekularen Veränderungen, die bei LTP auftreten, eine Rolle und die Aktivierung von mGluRs könnten bei der Regulation der VILIP-1-Expression eine Rolle spielen. Eine weitere Studie wies nach, dass VILIP-1 Ca^{2+} -abhängig doppelsträngige RNA binden kann (Mathisen *et al.*, 1999). Eine solche Interaktion wurde gezeigt mit der 3'UTR der mRNA von TrkB, des Rezeptors für BDNF. Das könnte auf einen neuen Mechanismus zur mRNA-Lokalisierung im Zentralnervensystem hinweisen. Die physiologische Funktion von VILIP-1 ist noch weitergehend ungeklärt. Es waren auch Ca^{2+} -abhängig Effekte von VILIP-1 auf verschiedene Zyklaseenzyme nachweisbar (Boekhoff *et al.*, 1997; Braunewell *et al.*, 1997; Braunewell *et al.*, 2001). Dies könnte darauf hindeuten, dass VILIP-1 an der Modulation von lernrelevanten Signalwegen, wie dem cAMP- oder cGMP-Signalweg beteiligt ist. Sowohl den Adenylatzyklasen (Hanoune und Defer, 2001) als auch den Guanylatzyklasen (Wang und Robinson, 1997) werden eine wichtige Rolle innerhalb gedächtnisbildender bzw. plastizitätsabhängiger Prozesse zugeschrieben.

Nurr1/Nurr2

Eine Steigerung der Expression der Nurr1/2-mRNA konnte 6 h nach krampfauslösender Stimulation mit Kainat im Kortex und Hippokampus des Gerbils im Vergleich zu NaCl-behandelten Tieren detektiert werden. Diese Daten bestätigen die von Crispino *et al.* (1998) beschriebene Induktion von Nurr1 im Kortex und Hippokampus der Ratte nach Injektion von Kainat. Keine Unterschiede fanden sich dagegen mittels Northern-Blot-Hybridisierung und ISH 5 h nach FM-Diskriminierungstraining im Vergleich zu Kontrolltieren. Es war aber eine signifikant erhöhte Anzahl Nurr1/2 positiver Zellen im rechten AC im Vergleich zum linken AC trainierter Tiere nachweisbar. Nach Läsionsexperimenten wurden für die beiden Hemisphären unterschiedliche Funktionen für die FM-Diskriminierungsreaktion vermutet. Dass für Nurr1/2 erhobene Resultat könnte möglicherweise ein Hinweis darauf sein, dass bereits auf Ebene der Transkription Lateralisierungsphänomene detektiert werden könnten. Das Ergebnis müsste aber mit weiteren molekularbiologischen und biochemischen Experimenten verifiziert werden.

Der Orphan-Rezeptor Nurr1 ist ein Mitglied der NGFI-B Familie, einer Familie von Hormonrezeptoren, welche als Monomere an eine bestimmte DNA-Sequenz (AAAGGTCA) binden. Sie regulieren so die Expression ihrer Zielgene, ohne dass sie eine Ligandenbindung benötigen (Murphy und Conneely, 1997). Nurr2 kann möglicherweise als kompetitiver Repressor für Nurr1 wirken (Ohkura *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass Nurr1 eine wichtige Rolle in der Koordination der Regulation von Neuroendokrinen spielt. Die Analyse von Nurr1^{-/-}-Mäusen zeigte, dass dieses Molekül essentiell für die Entwicklung von dopaminergen Neuronen des Mesenzephalons ist (Zetterstrom *et al.*, 1997; Castillo *et al.*, 1998; Saucedo-Cardenas *et al.*, 1998). Das für Nurr1 kodierende Gen ist ein IEG, welches nach Stimulation sehr schnell induziert wird (Davis und Lau, 1994; Murphy und Conneely, 1997). Pena de Ortiz *et al.* (2000) wiesen eine erhöhte Expression von Nurr1-mRNA in den Regionen CA1 und CA3 des dorsalen Hippokampus der Ratte nach räumlichem Lernen nach. Dies legt eine Rolle für Nurr1 bei Plasizitätsprozessen nahe, die näher untersucht werden sollte.

4.3. Zusammenfassung und Ausblick

Die Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses für die FM-Diskriminierungsreaktion ist, wie gezeigt werden konnte, abhängig von intakter Proteinsynthese im Hörkortex des Gerbils. Für die zugrunde liegenden Mechanismen können Proteinsynthese-abhängige Prozesse mit verschiedenen Zeitcharakteristiken angenommen werden, die sich in unterschiedlicher Weise

pharmakologisch beeinflussen lassen. Die Befunde lassen vermuten, dass in zeitlicher Nähe zum Lernexperiment die Translation unterschiedlicher Klassen von mRNAs erfolgen muss, deren Proteinprodukte offenbar für verschiedene Phasen der Langzeitgedächtnisbildung von Bedeutung sind. Die Konsolidierung eines Gedächtnisses für die FM-Diskriminierung für die Dauer von 1 - 2 Tagen erfordert die Expression von Proteinen, deren Synthese nicht durch RAPA beeinträchtigt werden kann. Für eine über diesen Zeitraum hinausgehende Stabilisierung des Gedächtnisses wird dagegen zusätzlich RAPA-sensitive Proteinsynthese benötigt.

Erste Ergebnisse zeigen, dass es auch zu trainingsbedingten Veränderungen in der Genexpression auf Ebene der Transkription im AC des Gerbils 5 h nach FM-Diskriminierungstraining kommt. Es war sowohl die Induktion als auch die Reprimierung von mRNAs nachweisbar.

Bisherige Resultate aus der Literatur weisen darauf hin, dass der AC von Säugetieren eine wichtige Funktion in der Prozessierung von auditorischen Stimuli hat und verschiedene Formen von auditorischen Antwortverhalten vermittelt. Die pharmakologischen Studien sind das erste experimentell vorliegende Ergebnis, dass intakte Proteinsynthese im AC des Gerbils für die Konsolidierung und die Widerabrufbarkeit der FM-Diskriminierungsreaktion notwendig ist. Ferner sind nach dem Erwerb der FM-Diskriminierungsreaktion Veränderungen auf Ebene der Transkription im AC nachweisbar. Die in dieser Arbeit vorgestellten Befunde sprechen dafür, der AC des Gerbils für Aspekte der FM-Verarbeitung, die in Mechanismen des Lernens und der Gedächtnisbildung involviert sind, von Bedeutung ist.

Ein Ziel weiterführender Arbeiten könnte die Identifizierung von Neurotransmittersystemen und Charakterisierung von Signalkaskaden sein, die in die Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses für die FM-Diskriminierungsreaktion im AC involviert sind.

5. Zusammenfassung

Die Konditionierung des Mongolischen Gerbils zur Diskriminierung von linear frequenzmodulierten Tönen (FM) ist ein wichtiges Tiermodell für die auditorische Hirnforschung. In der hier vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung des Hörkortex für die Richtungsdiskriminierung von FMs untersucht werden.

Um die Rolle von zerebraler Proteinsynthese für das Gedächtnis der FM-Diskriminierung zu untersuchen, erhielten Gerbils nach dem Lernexperiment bilaterale Injektionen des Proteinsyntheseinhibitors Anisomycin (ANI) in den auditorischen Kortex (AC). Im Vergleich zu Kontrolltieren zeigten die ANI-behandelten Gerbils Defizite in der Diskriminierungsleistung in nachfolgenden Sitzungen. Sie waren zwar in der Lage, innerhalb einer Trainingssitzung ihre Diskriminierungsleistung deutlich zu verbessern, im Gegensatz zu Kontrolltieren begannen sie jedoch jede neue Sitzung wieder auf niedrigem Niveau. Wenn vortrainierten Tieren nach dem Training ANI appliziert wurde, dann war die Diskriminierungsleistung an den nach folgenden Tagen ähnlich der an den Tagen vor der Injektion gemessenen. Das deutet darauf hin, dass die Retention, Abrufung und die Expression der etablierten Reaktion nicht beeinträchtigt waren. Eine Verbesserung der Reaktion, wie sie für Kontrolltiere beobachtet werden konnte, war jedoch über Tage gestört. Intrakortikale Injektionen eines weiteren Inhibitors der Proteinsynthese, Emetin (EME), bestätigten dieses Ergebnis. ANI oder EME beeinflussten nicht die Diskriminierungsleistung, wenn sie einige Tage vor dem initialen Training appliziert wurden. Die Befunde belegen, dass Inhibitoren der Proteinsynthese, die nach Akquisition der Diskriminierungsreaktion in den AC des Gerbils verabreicht werden, mit Aspekten des Lernens und der Gedächtnisbildung interferieren. Das daraus resultierende Defizit in der Diskriminierungsleistung war über mehrere Tage nachweisbar und beruht wahrscheinlich auf einer Beeinträchtigung der Gedächtniskonsolidierung, d. h., von Prozessen, die für Langzeit-Stabilisierung und/oder Abrufung des Gedächtnisses benötigt werden, während das Kurzzeitgedächtnis intakt bleibt.

Wird Rapamycin (RAPA), das mit der Translationsaktivität nur bestimmter mRNA-Subgruppen interferiert, nach dem Training von Gerbils zum Erwerb einer FM-Diskriminierungsreaktion in den Hörkortex verabreicht, so führte dies zu keinerlei Beeinträchtigung der nach 24 Stunden im Vergleich zu Kontrolltieren gemessenen Diskriminierungsleistung. Am darauf folgenden Tag sind jedoch Diskriminierungsdefizite nachweisbar. Ein Kompletionsversuch mit FK506 zeigte, dass der Effekt von RAPA aufgehoben werden kann. Dies könnte bedeuten, dass Mechanismen der Regulation der Initiation der Translation für die langfristige Stabilisierung der FM-Diskriminierungsreaktion benötigt werden.

Ferner konnte gezeigt werden, dass es zu Veränderungen in der Expression von mRNAs im AC des Gerbils fünf Stunden nach initialem FM-Diskriminierungstraining kommt. Was zu der Annahme führt, dass auch transkriptionelle Prozesse an der Konsolidierung einer Diskriminierungsreaktion im AC des Gerbils beteiligt sind.

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass transkriptionelle Veränderungen und Proteinsynthese-abhängige Prozesse sowie möglicherweise Mechanismen der Regulation der Initiation der Translation im AC des Gerbils für Konsolidierung, langfristige Stabilisierung und/oder Abrufung eines Gedächtnisses für die FM-Diskriminierungsreaktion eine Rolle spielen.

6. Literaturverzeichnis

- Abel T, Lattal KM (2001) Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol* 11:180-187.
- Abraham RT, Wiederrecht GJ (1996) Immunopharmacology of rapamycin. *Annu Rev Immunol* 14:483-510.
- Aoki K, Suzuki K, Sugano T, Tasaka T, Nakahara K, Kuge O, Omori A, Kasai M (1995) A novel gene, *Translin*, encodes a recombination hotspot binding protein associated with chromosomal translocations. *Nat Genet* 10:167-174.
- Bandyopadhyay S, Ghosh SK (1990) Goat testis calmodulin: purification and physicochemical characterization. *J Protein Chem* 9:603-611.
- Barea-Rodriguez EJ, Rivera DT, Jaffe DB, Martinez JL, Jr. (2000) Protein synthesis inhibition blocks the induction of mossy fiber long-term potentiation *In vivo*. *J Neurosci* 20:8528-8532.
- Barondes SH, Cohen HD (1968) Arousal and the conversion of "short-term" to "long-term" memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61:923-929.
- Ben-Ari Y (1985) Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14:375-403.
- Ben-Ari Y, Represa A (1990) Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fibre sprouting in the hippocampus. *Trends Neurosci* 13:312-318.
- Bennett PC, Schmidt L, Lawen A, Moutsoulas P, Ng KT (2002) Cyclosporin A, FK506 and rapamycin produce multiple, temporally distinct, effects on memory following single-trial, passive avoidance training in the chick. *Brain Res* 927:180-194.
- Berman DE, Dudai Y (2001) Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science* 291:2417-2419.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.
- Boekhoff I, Braunewell KH, Andreini I, Breer H, Gundelfinger E (1997) The calcium-binding protein VILIP in olfactory neurons: regulation of second messenger signaling. *Eur J Cell Biol* 72:151-158.
- Bole-Feysot C, Perret E, Roustan P, Bouchard B, Kelly PA (2000) Analysis of prolactin-modulated gene expression profiles during the Nb2 cell cycle using differential screening techniques. *Genome Biol* 1:RESEARCH0008.
- Bourtchouladze R, Abel T, Berman N, Gordon R, Lapidus K, Kandel ER (1998) Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn Mem* 5:365-374.
- Bracha V, Irwin KB, Webster ML, Wunderlich DA, Stachowiak MK, Bloedel JR (1998) Microinjections of anisomycin into the intermediate cerebellum during learning affect the acquisition of classically conditioned responses in the rabbit. *Brain Res* 788:169-178.
- Braunewell KH, Brackmann M, Schaupp M, Spilker C, Anand R, Gundelfinger ED (2001) Intracellular neuronal calcium sensor (NCS) protein VILIP-1 modulates cGMP signalling pathways in transfected neural cells and cerebellar granule neurones. *J Neurochem* 78:1277-1286.
- Braunewell KH, Spilker C, Behnisch T, Gundelfinger ED (1997) The neuronal calcium-sensor protein VILIP modulates cyclic AMP accumulation in stably transfected C6 glioma cells: amino-terminal myristoylation determines functional activity. *J Neurochem* 68:2129-2139.

- Budinger E, Heil P, Scheich H (2000a) Functional organization of auditory cortex in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). III. Anatomical subdivisions and corticocortical connections. *Eur J Neurosci* 12:2425-2451.
- Budinger E, Heil P, Scheich H (2000b) Functional organization of auditory cortex in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). IV. Connections with anatomically characterized subcortical structures. *Eur J Neurosci* 12:2452-2474.
- Burgoyne RD, Weiss JL (2001) The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins. *Biochem J* 353:1-12.
- Burnett PE, Blackshaw S, Lai MM, Qureshi IA, Burnett AF, Sabatini DM, Snyder SH (1998) Neurabin is a synaptic protein linking p70 S6 kinase and the neuronal cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8351-8356.
- Cahill L, McGaugh JL, Weinberger NM (2001) The neurobiology of learning and memory: some reminders to remember. *Trends Neurosci* 24:578-581.
- Cahill L, Ohl F, Scheich H (1996) Alteration of auditory cortex activity with a visual stimulus through conditioning: a 2-deoxyglucose analysis. *Neurobiol Learn Mem* 65:213-222.
- Cajal SRY (1995) *Histology of the nervous systems of man and vertebrates*, Vol. I. Oxford University Press; Translated from the french by N. Swanson and L.W. Swanson.
- Casadio A, Martin KC, Giustetto M, Zhu H, Chen M, Bartsch D, Bailey CH, Kandel ER (1999) A transient, neuron-wide form of CREB-mediated long-term facilitation can be stabilized at specific synapses by local protein synthesis. *Cell* 99:221-237.
- Castillo SO, Baffi JS, Palkovits M, Goldstein DS, Kopin IJ, Witta J, Magnuson MA, Nikodem VM (1998) Dopamine biosynthesis is selectively abolished in substantia nigra/ventral tegmental area but not in hypothalamic neurons in mice with targeted disruption of the *Nurr1* gene. *Mol Cell Neurosci* 11:36-46.
- Cavallaro S, Meiri N, Yi CL, Musco S, Ma W, Goldberg J, Alkon DL (1997) Late memory-related genes in the hippocampus revealed by RNA fingerprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9669-9673.
- Chennathukuzhi VM, Kurihara Y, Bray JD, Hecht NB (2001) Trax (translin-associated factor X), a primarily cytoplasmic protein, inhibits the binding of TB-RBP (translin) to RNA. *J Biol Chem* 276:13256-13263.
- Chew SJ, Mello C, Nottebohm F, Jarvis E, Vicario DS (1995) Decrements in auditory responses to a repeated conspecific song are long-lasting and require two periods of protein synthesis in the songbird forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3406-3410.
- Chew SJ, Vicario DS, Nottebohm F (1996) Quantal duration of auditory memories. *Science* 274:1909-1914.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Crispino M, Tocco G, Feldman JD, Herschman HR, Baudry M (1998) *Nurr1* mRNA expression in neonatal and adult rat brain following kainic acid-induced seizure activity. *Brain Res Mol Brain Res* 59:178-188.
- Davis HP, Squire LR (1984) Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* 96:518-559.
- Davis IJ, Lau LF (1994) Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and *Nurr-1* in the adrenal glands. *Mol Cell Biol* 14:3469-3483.
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6025-6030.

- Dieterich DC, Bockers TM, Gundelfinger ED, Kreutz MR (2002) Screening for differentially expressed genes in the rat inner retina and optic nerve after optic nerve crush. *Neurosci Lett* 317:29-32.
- Dineley KT, Weeber EJ, Atkins C, Adams JP, Anderson AE, Sweatt JD (2001) Leitmotifs in the biochemistry of LTP induction: amplification, integration and coordination. *J Neurochem* 77:961-971.
- Dragunow M (1996) A role for immediate-early transcription factors in learning and memory. *Behav Genet* 26:293-299.
- Edwards DR, Mahadevan LC (1992) Protein synthesis inhibitors differentially superinduce c-fos and c-jun by three distinct mechanisms: lack of evidence for labile repressors. *Embo J* 11:2415-2424.
- Eichenbaum H (2001) The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behav Brain Res* 127:199-207.
- Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, Luscher B (1998) Postsynaptic clustering of major GABA_A receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* 1:563-571.
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6-13.
- Fendt M, Fanselow MS (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 23:743-760.
- Fisher RS (1989) Animal models of the epilepsies. *Brain Res Brain Res Rev* 14:245-278.
- Flood JF, Bennett EL, Orme E, Rosenzweig MR (1975) Relation of memory formation to controlled amounts of brain protein synthesis. *Physiol Behav* 15:97-102.
- Flood JF, Rosenzweig MR, Bennett EL, Orme AE (1973) The influence of duration of protein synthesis inhibition on memory. *Physiol Behav* 10:555-562.
- Freeman FM, Rose SP, Scholey AB (1995) Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. *Neurobiol Learn Mem* 63:291-295.
- Frey U, Morris RG (1997) Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 385:533-536.
- Fumagalli S, Thomas G (2000) S6 Phosphorylation and signal transduction. In: *Translational Control of Gene Expression*; eds. Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. & Mathews, M.B.; Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, N.Y: 695-718.
- Galvan VV, Weinberger NM (2002) Long-term consolidation and retention of learning-induced tuning plasticity in the auditory cortex of the Guinea pig. *Neurobiol Learn Mem* 77:78-108.
- Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, Aebersold R, Sonenberg N (1999) Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev* 13:1422-1437.
- Goelet P, Castellucci VF, Schacher S, Kandel ER (1986) The long and the short of long-term memory--a molecular framework. *Nature* 322:419-422.
- Goodman Gilman A, L.S. G, A. G (1985) *The pharmacological basis of Therapeutics*. New York : MacMillan Publishing Comp.
- Grecksch G, Matthies H (1980) Two sensitive periods for the amnesic effect of anisomycin. *Pharmacol Biochem Behav* 12:663-665.
- Grollman AP (1967) Inhibitors of protein biosynthesis. II. Mode of action of anisomycin. *J Biol Chem* 242:3226-3233.
- Gurskaya NG, Diatchenko L, Chenchik A, Siebert PD, Khaspekov GL, Lukyanov KA, Vagner LL, Ermolaeva OD, Lukyanov SA, Sverdlov ED (1996) Equalizing cDNA subtraction based

- on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem* 240:90-97.
- Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, Barnes CA (2000) Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* 20:3993-4001.
- Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL (2001) Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *J Neurosci* 21:5089-5098.
- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509-514.
- Hall C, Michael GJ, Cann N, Ferrari G, Teo M, Jacobs T, Monfries C, Lim L (2001) alpha2-chimaerin, a Cdc42/Rac1 regulator, is selectively expressed in the rat embryonic nervous system and is involved in neuritogenesis in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Neurosci* 21:5191-5202.
- Hall C, Monfries C, Smith P, Lim HH, Kozma R, Ahmed S, Vanniasingham V, Leung T, Lim L (1990) Novel human brain cDNA encoding a 34,000 Mr protein n-chimaerin, related to both the regulatory domain of protein kinase C and BCR, the product of the breakpoint cluster region gene. *J Mol Biol* 211:11-16.
- Han JR, Gu W, Hecht NB (1995) Testis-brain RNA-binding protein, a testicular translational regulatory RNA-binding protein, is present in the brain and binds to the 3' UTR of Tau mRNA, a transported brain mRNA. *Biol Reprod* 53:707-717.
- Handsack T (1995) Untersuchungen zur Expression des Calcium-bindenden Proteins Parvalbumin bei Entwicklungs- und Lernplastizität. Dissertation; Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.
- Hanoune J, Defer N (2001) Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:145-174.
- Hatada Y, Wu F, Sun ZY, Schacher S, Goldberg DJ (2000) Presynaptic morphological changes associated with long-term synaptic facilitation are triggered by actin polymerization at preexisting varicosities. *J Neurosci* 20:RC82.
- Hebb DO (1949) *The organization of Behavior*. Wiley and Sons, New York .
- Hecht NB (2000) Intracellular and intercellular transport of many germ cell mRNAs is mediated by the DNA- and RNA-binding protein, testis-brain-RNA-binding protein (TB-RBP). *Mol Reprod Dev* 56:252-253.
- Herdegen T, Leah JD (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev* 28:370-490.
- Hershey JWB, Merrick WC (2000) Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In: *Translational Control of Gene Expression*; eds. Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. & Mathews, M.B.; Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, N.Y.: 33-88.
- Hess A, Scheich H (1996) Optical and FDG mapping of frequency-specific activity in auditory cortex. *Neuroreport* 7:2643-2647.
- Hevroni D, Rattner A, Bundman M, Lederfein D, Gabarah A, Mangelus M, Silverman MA, Kedar H, Naor C, Kornuc M, Hanoch T, Seger R, Theill LE, Nedivi E, Richter-Levin G, Citri Y (1998) Hippocampal plasticity involves extensive gene induction and multiple cellular mechanisms. *J Mol Neurosci* 10:75-98.

- Hicks A, Davis S, Rodger J, Helme-Guizon A, Laroche S, Mallet J (1997) Synapsin I and syntaxin 1B: key elements in the control of neurotransmitter release are regulated by neuronal activation and long-term potentiation in vivo. *Neuroscience* 79:329-340.
- Howard RL, Meyer DR (1971) Motivational control of retrograde amnesia in rats: a replication and extension. *J Comp Physiol Psychol* 74:37-40.
- Huang T, Grollman AP (1970) Novel Inhibitors of protein synthesis in animal cells. *Fed Proc* 29:609.
- Huber KM, Kayser MS, Bear MF (2000) Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science* 288:1254-1257.
- Inokuchi K, Kato A, Hiraia K, Hishinuma F, Inoue M, Ozawa F (1996) Increase in activin beta A mRNA in rat hippocampus during long-term potentiation. *FEBS Lett* 382:48-52.
- Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM (1999) Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res* 103:1-11.
- Jefferies HB, Reinhard C, Kozma SC, Thomas G (1994) Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4441-4445.
- John HA, Birnstiel ML, Jones KW (1969) RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223:582-587.
- Johnston IG, Paladino T, Gurd JW, Brown IR (1990) Molecular cloning of SC1: a putative brain extracellular matrix glycoprotein showing partial similarity to osteonectin/BM40/SPARC. *Neuron* 4:165-176.
- Judge ME, Quartermain D (1982) Characteristics of retrograde amnesia following reactivation of memory in mice. *Physiol Behav* 28:585-590.
- Kang H, Schuman EM (1996) A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science* 273:1402-1406.
- Kazanietz MG (2002) Novel "nonkinase" phorbol ester receptors: the C1 domain connection. *Mol Pharmacol* 61:759-767.
- Kelly MP, Deadwyler SA (2002) Acquisition of a novel behavior induces higher levels of Arc mRNA than does overtrained performance. *Neuroscience* 110:617-626.
- Kennedy TE, Kuhl D, Barzilai A, Sweatt JD, Kandel ER (1992) Long-term sensitization training in *Aplysia* leads to an increase in calreticulin, a major presynaptic calcium-binding protein. *Neuron* 9:1013-1024.
- Khan A, Pepio AM, Sossin WS (2001) Serotonin activates S6 kinase in a rapamycin-sensitive manner in *Aplysia* synaptosomes. *J Neurosci* 21:382-391.
- Klebaur JE, Ostrander MM, Norton CS, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (2002) The ability of amphetamine to evoke arc (Arg 3.1) mRNA expression in the caudate, nucleus accumbens and neocortex is modulated by environmental context. *Brain Res* 930:30-36.
- Kleiman R, Banker G, Steward O (1990) Differential subcellular localization of particular mRNAs in hippocampal neurons in culture. *Neuron* 5:821-830.
- Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L (1996) The GTPase-activating protein n-chimaerin cooperates with Rac1 and Cdc42Hs to induce the formation of lamellipodia and filopodia. *Mol Cell Biol* 16:5069-5080.
- Lanahan A, Worley P (1998) Immediate-Early Genes and Synaptic Function. *Neurobiol Learn Mem* 70:37-43.
- Lattal KM, Abel T (2001) Different requirements for protein synthesis in acquisition and extinction of spatial preferences and context-evoked fear. *J Neurosci* 21:5773-5780.

- Law SW, Conneely OM, DeMayo FJ, O'Malley BW (1992) Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Mol Endocrinol* 6:2129-2135.
- Lenz SE, Henschel Y, Zopf D, Voss B, Gundelfinger ED (1992) VILIP, a cognate protein of the retinal calcium binding proteins visinin and recoverin, is expressed in the developing chicken brain. *Brain Res Mol Brain Res* 15:133-140.
- Lenz SE, Zuschratter W, Gundelfinger ED (1996) Distribution of visinin-like protein (VILIP) immunoreactivity in the hippocampus of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Neurosci Lett* 206:133-136.
- Liang P, Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971.
- Link W, Konietzko U, Kauselmann G, Krug M, Schwanke B, Frey U, Kuhl D (1995) Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5734-5738.
- Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66:807-815.
- Loskota WJ, Lomax P, Rich ST (1974) The gerbil as a model for the study of the epilepsies. Seizure patterns and ontogenesis. *Epilepsia* 15:109-119.
- Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, Worley PF (1995) Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14:433-445.
- Mactutus CF, Riccio DC, Ferek JM (1979) Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: some anomalous characteristics. *Science* 204:1319-1320.
- Manahan-Vaughan D, Braunewell KH (1996) Metabotropic glutamate receptor activation regulates expression of the neuronal calcium-sensor protein VILIP1 in the hippocampus of freely moving rats: Implication in long-term potentiation. *Neuropharmacology* 39:391-396.
- Marin P, Nastiuk KL, Daniel N, Girault JA, Czernik AJ, Glowinski J, Nairn AC, Premont J (1997) Glutamate-dependent phosphorylation of elongation factor-2 and inhibition of protein synthesis in neurons. *J Neurosci* 17:3445-3454.
- Martin KC, Casadio A, Zhu H, E Y, Rose JC, Chen M, Bailey CH, Kandel ER (1997) Synapse-specific, long-term facilitation of aplysia sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell* 91:927-938.
- Maruyama K, Tsukada T, Ohkura N, Bandoh S, Hosono T, Yamaguchi K (1998) The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily (review). *Int J Oncol* 12:1237-1243.
- Mathisen PM, Johnson JM, Kawczak JA, Tuohy VK (1999) Visinin-like protein (VILIP) is a neuron-specific calcium-dependent double-stranded RNA-binding protein. *J Biol Chem* 274:31571-31576.
- Matthies H (1989) In search of cellular mechanisms of memory. *Prog Neurobiol* 32:277-349.
- Matus A (2000) Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science* 290:754-758.
- McGaugh JL (2000) Memory--a century of consolidation. *Science* 287:248-251.
- Meiri N, Rosenblum K (1998) Lateral ventricle injection of the protein synthesis inhibitor anisomycin impairs long-term memory in a spatial memory task. *Brain Res* 789:48-55.
- Menzel R (2001) Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn Mem* 8:53-62.
- Merrick WC, Nyborg J (2000) The protein biosynthesis elongation cycle. In: *Translational Control of Gene Expression*; Eds. Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. & Mathews, M.B.; Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, N.Y.: 89-126.

- Meyuhas O, Hornstein E (2000) Translational control of TOP mRNAs. In: Translational Control of Gene Expression; Eds. Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. & Mathews, M.B.; Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, N.Y: 671-694.
- Miron M, Verdu J, Lachance PE, Birnbaum MJ, Lasko PF, Sonenberg N (2001) The translational inhibitor 4E-BP is an effector of PI(3)K/Akt signalling and cell growth in *Drosophila*. Nat Cell Biol 3:596-601.
- Misanin JR, Miller RR, Lewis DJ (1968) Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. Science 160:554-555.
- Montag-Sallaz M, Welzl H, Kuhl D, Montag D, Schachner M (1999) Novelty-induced increased expression of immediate-early genes c-fos and arg 3.1 in the mouse brain. J Neurobiol 38:234-246.
- Morales CR, Wu XQ, Hecht NB (1998) The DNA/RNA-binding protein, TB-RBP, moves from the nucleus to the cytoplasm and through intercellular bridges in male germ cells. Dev Biol 201:113-123.
- Moser MB (1999) Making more synapses: a way to store information? Cell Mol Life Sci 55:593-600.
- Mothe-Satney I, Yang D, Fadden P, Haystead TA, Lawrence JC, Jr. (2000) Multiple mechanisms control phosphorylation of PHAS-I in five (S/T)P sites that govern translational repression. Mol Cell Biol 20:3558-3567.
- Murphy EP, Conneely OM (1997) Neuroendocrine regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis by the nurr1/nur77 subfamily of nuclear receptors. Mol Endocrinol 11:39-47.
- Nader K, Schafe GE, Le Doux JE (2000) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. Nature 406:722-726.
- Nakahara T, Kuroki T, Hashimoto K, Hondo H, Tsutsumi T, Motomura K, Ueki H, Hirano M, Uchimura H (2000) Effect of atypical antipsychotics on phencyclidine-induced expression of arc in rat brain. Neuroreport 11:551-555.
- Nakanishi H, Obaishi H, Satoh A, Wada M, Mandai K, Satoh K, Nishioka H, Matsuura Y, Mizoguchi A, Takai Y (1997) Neurabin: a novel neural tissue-specific actin filament-binding protein involved in neurite formation. J Cell Biol 139:951-961.
- Nayak A, Zastrow DJ, Lickteig R, Zahniser NR, Browning MD (1998) Maintenance of late-phase LTP is accompanied by PKA-dependent increase in AMPA receptor synthesis. Nature 394:680-683.
- O'Leary FA, Byrne JH, Cleary LJ (1995) Long-term structural remodeling in *Aplysia* sensory neurons requires de novo protein synthesis during a critical time period. J Neurosci 15:3519-3525.
- Ohkura N, Hosono T, Maruyama K, Tsukada T, Yamaguchi K (1999) An isoform of Nurr1 functions as a negative inhibitor of the NGFI-B family signaling. Biochim Biophys Acta 1444:69-79.
- Ohl FW, Scheich H (1996) Differential frequency conditioning enhances spectral contrast sensitivity of units in auditory cortex (field A1) of the alert Mongolian gerbil. Eur J Neurosci 8:1001-1017.
- Ohl FW, Scheich H (1997) Learning-induced dynamic receptive field changes in primary auditory cortex of the unanaesthetized Mongolian gerbil. J Comp Physiol [A] 181:685-696.
- Ohl FW, Scheich H, Freeman WJ (2001) Change in pattern of ongoing cortical activity with auditory category learning. Nature 412:733-736.

- Ohl FW, Wetzel W, Wagner T, Rech A, Scheich H (1999) Bilateral ablation of auditory cortex in Mongolian gerbil affects discrimination of frequency modulated tones but not of pure tones. *Learn Mem* 6:347-362.
- Ouyang Y, Rosenstein A, Kreiman G, Schuman EM, Kennedy MB (1999) Tetanic stimulation leads to increased accumulation of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II via dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J Neurosci* 19:7823-7833.
- Oyler GA, Higgins GA, Hart RA, Battenberg E, Billingsley M, Bloom FE, Wilson MC (1989) The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J Cell Biol* 109:3039-3052.
- Pardue ML, Gall JG (1969) Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64:600-604.
- Paterlini M, Revilla V, Grant AL, Wisden W (2000) Expression of the neuronal calcium sensor protein family in the rat brain. *Neuroscience* 99:205-216.
- Patterson TA, Alvarado MC, Warner IT, Bennett EL, Rosenzweig MR (1986) Memory stages and brain asymmetry in chick learning. *Behav Neurosci* 100:856-865.
- Pazman C, Bengzon J, McKay RD, Somogyi R (1997) Novel differentially expressed genes induced by kainic acid in hippocampus: putative molecular effectors of plasticity and injury. *Exp Neurol* 146:502-512.
- Pei Q, Lewis L, Sprakes ME, Jones EJ, Grahame-Smith DG, Zetterstrom TS (2000) Serotonergic regulation of mRNA expression of Arc, an immediate early gene selectively localized at neuronal dendrites. *Neuropharmacology* 39:463-470.
- Pena de Ortiz S, Maldonado-Vlaar CS, Carrasquillo Y (2000) Hippocampal expression of the orphan nuclear receptor gene hzf-3/nurr1 during spatial discrimination learning. *Neurobiol Learn Mem* 74:161-178.
- Polakiewicz RD, Schieferl SM, Gingras AC, Sonenberg N, Comb MJ (1998) mu-Opioid receptor activates signaling pathways implicated in cell survival and translational control. *J Biol Chem* 273:23534-23541
- Proud CG (2000) Control of elongation phase of protein synthesis. In: *Translational Control of Gene Expression*; Eds. Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. & Mathews, M.B.; Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, N.Y.: 719-740.
- Przybylski J, Rouillet P, Sara SJ (1999) Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. *J Neurosci* 19:6623-6628.
- Przybylski J, Sara SJ (1997) Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res* 84:241-246.
- Quevedo J, Vianna MR, Roesler R, de-Paris F, Izquierdo I, Rose SP (1999) Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem* 6:600-607.
- Rajkowska G, Halaris A, Selemon LD (2001) Reductions in neuronal and glial density characterize the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 49:741-752.
- Ramirez RR, Gandhi CC, Muzzio IA, Matzel LD (1998) Protein synthesis-dependent memory and neuronal enhancement in *Hermissenda* are contingent on parameters of training and retention. *Learn Mem* 4:462-477.
- Raught B, Gingras A-C, Sonenberg N (2000) Regulation of ribosomal recruitment in eukaryotes. In: *Translational Control of Gene Expression*; Eds. Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. & Mathews, M.B.; Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, N.Y.: 245-294.
- Raught B, Gingras AC, Sonenberg N (2001) The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7037-7044.

- Raymond CR, Redman SJ, Crouch MF (2002) The phosphoinositide 3-kinase and p70 S6 kinase regulate long-term potentiation in hippocampal neurons. *Neuroscience* 109:531-536.
- Redpath NT, Foulstone EJ, Proud CG (1996) Regulation of translation elongation factor-2 by insulin via a rapamycin-sensitive signalling pathway. *EMBO J* 15:2291-2297.
- Ribeiro S, Mello CV (2000) Gene expression and synaptic plasticity in the auditory forebrain of songbirds. *Learn Mem* 7:235-243.
- Richter K, Hess A, Scheich H (1999) Functional mapping of transsynaptic effects of local manipulation of inhibition in gerbil auditory cortex. *Brain Res* 831:184-199.
- Rose SP (2000) God's organism? The chick as a model system for memory studies. *Learn Mem* 7:1-17.
- Rosenblum K, Meiri N, Dudai Y (1993) Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol* 59:49-56.
- Rosman E, Quartermain D, Pang R, Turndorf H (1992) Halothane anesthesia causes state-dependent retrieval failure in mice. *Physiol Behav* 52:449-453.
- Ryan A (1976) Hearing sensitivity of the mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *J Acoust Soc Am* 59:1222-1226.
- Ryan AF, Woolf NK, Sharp FR (1982) Tonotopic organization in the central auditory pathway of the Mongolian gerbil: a 2-deoxyglucose study. *J Comp Neurol* 207:369-380.
- Sabatini DM, Barrow RK, Blackshaw S, Burnett PE, Lai MM, Field ME, Bahr BA, Kirsch J, Betz H, Snyder SH (1999) Interaction of RAFT1 with gephyrin required for rapamycin-sensitive signaling. *Science* 284:1161-1164.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd Edition ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press .
- Sara SJ (2000) Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem* 7:73-84.
- Saucedo-Cardenas O, Conneely OM (1996) Comparative distribution of NURR1 and NUR77 nuclear receptors in the mouse central nervous system. *J Mol Neurosci* 7:51-63.
- Saucedo-Cardenas O, Quintana-Hau JD, Le WD, Smidt MP, Cox JJ, De Mayo F, Burbach JP, Conneely OM (1998) Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4013-4018.
- Schafe GE, LeDoux JE (2000) Memory Consolidation of Auditory Pavlovian Fear Conditioning Requires Protein Synthesis and Protein Kinase A in the Amygdala. *J Neurosci* 20:RC96.
- Scheetz AJ, Nairn AC, Constantine-Paton M (1997) N-methyl-D-aspartate receptor activation and visual activity induce elongation factor-2 phosphorylation in amphibian tecta: a role for N-methyl-D-aspartate receptors in controlling protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14770-14775.
- Scheetz AJ, Nairn AC, Constantine-Paton M (2000) NMDA receptor-mediated control of protein synthesis at developing synapses. *Nat Neurosci* 3:211-216.
- Scheich H, Heil P, Langner G (1993a) Functional organization of auditory cortex in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). II. Tonotopic 2-deoxyglucose. *Eur J Neurosci* 5:898-914.
- Scheich H, Simonis C, Ohl F, Tillein J, Thomas H (1993b) Functional organization and learning-related plasticity in auditory cortex of the Mongolian gerbil. *Prog Brain Res* 97:135-143.
- Scheich H, Stark H, Zuschratter W, Ohl FW, Simonis CE (1997) Some functions of primary auditory cortex in learning and memory formation. *Adv Neurol* 73:179-193.

- Scheich H, Zuschratter W (1995) Mapping of stimulus features and meaning in gerbil auditory cortex with 2-deoxyglucose and c-Fos antibodies. *Behav Brain Res* 66:195-205.
- Schiene-Fischer C, Yu C (2001) Receptor accessory folding helper enzymes: the functional role of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *FEBS Lett* 495:1-6.
- Schmelzle T, Hall MN (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103:253-262.
- Schulze H, Ohl FW, Heil P, Scheich H (1997) Field-specific responses in the auditory cortex of the unanaesthetized Mongolian gerbil to tones and slow frequency modulations. *J Comp Physiol [A]* 181:573-589.
- Squire LR, Knowlton BJ (1999) The medial temporal lobe, the hippocampus, and the memory systems of the brain. in *The new Cognitive Neuroscience*; ed. Gazzangia, M., MIT Press, Cambridge, MA :765-779.
- Stark H, Scheich H (1997) Dopaminergic and serotonergic neurotransmission systems are differentially involved in auditory cortex learning: a long-term microdialysis study of metabolites. *J Neurochem* 68:691-697.
- Steward O, Levy WB (1982) Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J Neurosci* 2:284-291.
- Steward O, Wallace CS, Lyford GL, Worley PF (1998) Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* 21:741-751.
- Stork O, Stork S, Pape HC, Obata K (2001) Identification of genes expressed in the amygdala during the formation of fear memory. *Learn Mem* 8:209-219.
- Stork O, Welzl H (1999) Memory formation and the regulation of gene expression. *Cell Mol Life Sci* 55:575-592.
- Strube G (1996) *Wörterbuch der Kognitionswissenschaft*. Stuttgart: Lett-Cotta .
- Sugimoto S, Sakurada M, Horikawa J, Taniguchi I (1997) The columnar and layer-specific response properties of neurons in the primary auditory cortex of Mongolian gerbils. *Hear Res* 112:175-185.
- Summers MJ, Crowe SF, Ng KT (1997) Administration of DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5) induces transient inhibition of reminder-activated memory retrieval in day-old chicks. *Brain Res Cogn Brain Res* 5:311-321.
- Tang SJ, Reis G, Kang H, Gingras AC, Sonenberg N, Schuman EM (2002) A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:467-472.
- Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B, Alberini CM (2001) The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci* 4:813-818.
- Thoenen H (1995) Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270:593-598.
- Thomas G, Hall MN (1997) TOR signalling and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 9:782-787.
- Thomas H, Tillein J, Heil P, Scheich H (1993) Functional organization of auditory cortex in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). I. Electrophysiological mapping of frequency representation and distinction of fields. *Eur J Neurosci* 5:882-897.
- Thompson RF, Kim JJ (1996) Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13438-13444.
- Tischmeyer W, Grimm R (1999) Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell Mol Life Sci* 55:564-574.

- Tiunova AA, Anokhin KV, Rose SP (1998) Two critical periods of protein and glycoprotein synthesis in memory consolidation for visual categorization learning in chicks. *Learn Mem* 4:401-410.
- Torocsik B, Szeberenyi J (2000) Anisomycin affects both pro- and antiapoptotic mechanisms in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 278:550-556.
- Tulving E (1999) *The new Cognitive Neuroscience*. ed. Gazzangia, M., MIT Press, Cambridge, MA :729-732.
- Vianna MR, Szapiro G, McGaugh JL, Medina JH, Izquierdo I (2001) Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12251-12254.
- Wallace CS, Lyford GL, Worley PF, Steward O (1998) Differential intracellular sorting of immediate early gene mRNAs depends on signals in the mRNA sequence. *J Neurosci* 18:26-35.
- Waltereit R, Dammermann B, Wulff P, Scafidi J, Staubli U, Kauselmann G, Bundman M, Kuhl D (2001) Arg3.1/Arc mRNA induction by Ca²⁺ and cAMP requires protein kinase A and mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase activation. *J Neurosci* 21:5484-5493.
- Wang H, Wang X, Scheich H (1996) LTD and LTP induced by transcranial magnetic stimulation in auditory cortex. *Neuroreport* 7:521-525.
- Wang X, Robinson PJ (1997) Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J Neurochem* 68:443-456.
- Wells DG, Richter JD, Fallon JR (2000) Molecular mechanisms for activity-regulated protein synthesis in the synapto-dendritic compartment. *Curr Opin Neurobiol* 10:132-137.
- Wetzel W, Ohl FW, Wagner T, Scheich H (1998a) Right auditory cortex lesion in Mongolian gerbils impairs discrimination of rising and falling frequency-modulated tones. *Neurosci Lett* 252:115-118.
- Wetzel W, Wagner T, Ohl FW, Scheich H (1998b) Categorical discrimination of direction in frequency-modulated tones by Mongolian gerbils. *Behav Brain Res* 91:29-39.
- Williams JM, Mason-Parker SE, Abraham WC, Tate WP (1998) Biphasic changes in the levels of N-methyl-D-aspartate receptor-2 subunits correlate with the induction and persistence of long-term potentiation. *Brain Res Mol Brain Res* 60:21-27.
- Xiao Q, Castillo SO, Nikodem VM (1996) Distribution of messenger RNAs for the orphan nuclear receptors Nurr1 and Nur77 (NGFI-B) in adult rat brain using in situ hybridization. *Neuroscience* 75:221-230.
- Yan Y, Lagenaur C, Narayanan V (1993) Molecular cloning of M6: identification of a PLP/DM20 gene family. *Neuron* 11:423-431.
- Ying SW, Futter M, Rosenblum K, Webber MJ, Hunt SP, Bliss TV, Bramham CR (2002) Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *J Neurosci* 22:1532-1540.
- Yuste R, Bonhoeffer T (2001) Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 24:1071-1089.
- Zafra F, Hengerer B, Leibrock J, Thoenen H, Lindholm D (1990) Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J* 9:3545-3550.
- Zagulska-Szymczak S, Filipkowski RK, Kaczmarek L (2001) Kainate-induced genes in the hippocampus: lessons from expression patterns. *Neurochem Int* 38:485-501.

- Zetterstrom RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T (1997) Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* 276:248-250.
- Zhang X, Gelowitz DL, Lai CT, Boulton AA, Yu PH (1997) Gradation of kainic acid-induced rat limbic seizures and expression of hippocampal heat shock protein-70. *Eur J Neurosci* 9:760-769.
- Zuschratter W, Gass P, Herdegen T, Scheich H (1995) Comparison of frequency-specific c-Fos expression and fluoro-2-deoxyglucose uptake in auditory cortex of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Eur J Neurosci* 7:1614-1626.

7. Abkürzungen

2DG	2-Desoxyglukose Verfahren
AI	primäres auditorisches Feld
AId	dorsaler Teil des primären auditorischen Kortex
AAF	anteriores auditorisches Feld
AC	auditorischer Kortex (<i>auditory cortex</i>)
ANI	Anisomycin
ANOVA	Varianzanalyse
AV	anteroventrales auditorisches Feld
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Cb	Cerebellum
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary DNA</i>)
CPu	Caudatoputamen
CR+	korrekte konditionierte Reaktion (<i>correct conditioned response</i>)
CR-	falsche Antwort auf den abwärtsmodulierten Ton
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure (<i>complementary RNA</i>)
CS+	aufwärtmodulierter Ton 1-2 kHz, bedingter Reiz
CS-	abwärtsmodulierte Ton 2-1 kHz, bedingter Reiz
D	dorsales auditorischen Feld
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DG	Gyrus dentatus
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DP	dorsoposteriores auditorisches Feld
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EME	Emetin
Ent	entorhinaler Kortex
FM	frequenzmodulierte Töne
FS	Fußschock, Intensität des Strafreizes
GCL	Körnerzellschicht
HCl	Salzsäure
HF	Hippokampusformation
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IEG	<i>immediate early gene</i>
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
ITC	<i>intertrial crossing</i> , Intertrial-Aktivität
LB	Lauria Bertani
mca	mittlere Cerebralarterie
MGB	Corpus geniculatum mediale (mediales Genikulatum)
ML	Molekularschicht

MMLV	Moloney-Maus-Leukämie-Virus
MOPS	2-(N-Morpholino) propansulfonsäure
mRNA	Messenger-RNA (<i>messenger-RNA</i>)
NaCl	Kochsalz
NaOH	Natronlauge
NBT	4-Nitroblue-Tetrazoliumchlorid
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
PCL	Purkinjenzellschicht
PCR	Polymerasekettenreaktion
RAPA	Rapamycin
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
S	Subiculum
SA	Startaktivität (Explorationsaktivität, Seitenwechsel in der Habituationszeit)
SCo	somatosensorischer Kortex
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSH	<i>suppression subtractive hybridization</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TF	Transkriptionsfaktoren
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V	ventrales auditorisches Feld
VM	ventromediales auditorisches Feld
VP	ventroposteriores auditorisches Feld