

**Analyse der Informationsverarbeitung in  
CHL1-defizienten Mäusen mittels  
metabolischer Markierung, Expressionsstudien  
der *Immediate-Early-Gene c-fos* und *arg3.1/arc* sowie  
verhaltensbiologischer Tests**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades**

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

**genehmigt durch**

**die Fakultät der Naturwissenschaften**

**der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg**

**von Dipl.-Biol. Andrea Hamm-Baarke, geb. Baarke  
geb. am 27.01.1974 in Berlin**

**Gutachter: PD Dr. Dirk Montag, IfN Magdeburg  
Prof. Dr. Eckart D. Gundelfinger, IfN Magdeburg  
Prof. Dr. Dietmar Kuhl, FU Berlin**

**Eingereicht am: 18.12.2002**

**Verteidigung am: 11.12.2003**

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich PD Dr. Dirk Montag und Dr. Monique Montag-Sallaz dafür danken, daß ich an solch einem vielseitigen Projekt mitarbeiten und meine Kenntnisse der wissenschaftlichen Laborarbeit vertiefen durfte. Außerdem danke ich für die Betreuung und das stets offene Ohr für kleine und große Probleme.

Dr. Petra Dirks, Dr. Michaela Kraus und Dr. Ilona Schön bin ich dankbar für viele klärende Gespräche über fachliche Probleme und auch die Ablenkung von solchigen.

Ein besonderer Dank geht an Angelika Reichel und Karla Sowa für ihre technische Hilfe im Labor und bei den Mäusen sowie die wunderbare Arbeitsatmosphäre.

Allen Mitarbeitern des IFN, aber speziell der Abteilung Neurochemie/Molekularbiologie unter der Leitung von Prof. Eckart Gundelfinger, danke ich für die Hilfsbereitschaft im Labor und drumherum.

Allen meinen Freunden, aber besonders Henrik Kühn, Dr. Claudia Iserhot und Corina Flade, danke ich für ihr Verständnis und die langen Stunden, die es braucht, sein Leid zu klagen.

Mein allergrößter Dank gilt Ralf Hamm und meinen Eltern für ihre Liebe, ihren Glauben an mich und ihre immerwährende Unterstützung.

.....  
Andrea Hamm-Baarke

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Neurale Zellerkennungsmoleküle</b>	<b>2</b>
2.1.1	Die L1-Familie der neuronalen Zellerkennungsmoleküle	4
2.1.2	Das Molekül CHL1 ( <i>Close Homolog of L1</i> )	5
2.1.2.1	Die konventionelle CHL1-defiziente Maus	8
2.1.2.2	Induzierbare <i>knock-out</i> -Systeme	9
<b>2.2</b>	<b>Neuronale Plastizität als Grundlage für Informationsverarbeitung, Lernen und Gedächtnis</b>	<b>11</b>
2.2.1	Kartierung der Gehirnaktivität	12
2.2.1.1	<i>Immediate-Early</i> -Gene (IEG)	12
2.2.1.1.1	Der Transkriptionsfaktor <i>c-fos</i>	12
2.2.1.1.2	Das Effektor-Gen <i>arg3.1/arc</i>	13
2.2.1.2	Metabolische Kartierung mittels 2DG-Autoradiographie	15
2.2.1.3	Vergleich von IEG-Expression und 2DG-Autoradiographie	15
2.2.2	Verhalten als Korrelat für Informationsverarbeitung	16
<b>2.3</b>	<b>Lernrelevante Areale des Gehirns</b>	<b>16</b>
<b>2.4</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	<b>19</b>
3.1.1	Chemikalien	19
3.1.2	Kits und Enzyme	19
3.1.3	Standardlösungen	20
3.1.4	PCR-Primer	20
3.1.5	Antikörper	20
3.1.5.1	Primäre Antikörper	20
3.1.5.2	Sekundäre Antikörper	21
3.1.6	Versuchstiere	21
3.1.6.1	Konventionelle CHL1- <i>knock-out</i> -Tiere	21
3.1.6.2	Konditionelle CHL1- <i>knock-out</i> -Tiere ( <i>loxP</i> -Cre-Rekombinase System)	22
3.1.6.3	Induktion der ligandenabhängigen CMV-CreER <sup>T</sup> -Rekombinase	22
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>23</b>
3.2.1	Verhaltensbiologische Methoden	23
3.2.1.1	<i>Taste-Novelty</i> -Paradigma	23
3.2.1.2	Offenfeld-Lochbrett-Test	24
3.2.1.3	Geruchs-Kennenlern-Test	25
3.2.1.4	Angst-Konditionierung	26
3.2.1.5	Heiße-Platte-Analgesie-Test	27
3.2.2	Histologisch-morphologische Methoden	28
3.2.2.1	<i>in situ</i> -Hybridisierung (ISH)	28
3.2.2.2	Auswertung der ISH	29
3.2.2.3	2-Deoxy-D-[1- <sup>14</sup> C]-Glukose Autoradiographie	30
3.2.2.4	Auswertung der Autoradiogramme	30
3.2.2.5	Statistische Auswertung	30

3.2.2.6	Neutralrot- bzw. Hämatoxylin-Färbung.....	31
3.2.2.7	Immunhistochemie (IHC) .....	31
3.2.2.8	TIMMs-Färbung.....	32
3.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	33
3.2.3.1	DNA-Isolierung aus Gewebe .....	33
3.2.3.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	33
3.2.3.3	Southern-Blotting.....	34
3.2.3.4	Herstellung chemokompetenter Zellen .....	35
3.2.3.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	35
3.2.3.6	Elution von DNA aus Agarose-Gelen und Ligation von DNA-Fragmenten .....	36
3.2.3.7	Transformation von Bakterien .....	36
3.2.3.8	Plasmid-Präparation .....	36
3.2.3.9	Sequenzierung und Sequenzvergleich.....	37
3.2.3.10	Herstellung Digoxigenin-markierter cRNA-Sonden durch <i>in vitro</i> -Transkription	37
3.2.4	Proteinbiochemische Methoden .....	38
3.2.4.1	Proteingewinnung aus Gewebe .....	38
3.2.4.2	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	39
3.2.4.3	Western-Blotting und Antikörperdetektion.....	39
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Verhaltensbiologische Charakterisierung der konventionell CHL1-defizienten Maus.....</b>	<b>41</b>
4.1.1	<i>Taste-Novelty</i> -Paradigma .....	41
4.1.1.1	2-Deoxy-Glukose-Anreicherung nach Stimulation im <i>Taste-Novelty</i> -Paradigma ..	43
4.1.1.1.1	2DG-Anreicherung in Wildtyp-Tieren.....	43
4.1.1.1.2	Vergleich der 2DG-Anreicherung in CHL1-defizienten Tieren und Wildtypen .....	44
4.1.1.2	<i>in situ</i> -Hybridisierung nach Stimulation im <i>Taste-Novelty</i> -Paradigma .....	46
4.1.1.2.1	<i>c-fos</i> -mRNA-Expression .....	47
4.1.1.2.1.1	<i>c-fos</i> -Expression in Wildtyp-Geschwister-Tieren .....	47
4.1.1.2.1.2	Vergleich der <i>c-fos</i> -Expression in CHL1-defizienten Mäusen und Wildtypen .....	48
4.1.1.2.2	<i>arg3.1/arc</i> -mRNA-Expression.....	52
4.1.1.2.2.1	<i>arg3.1/arc</i> -Expression in Wildtyp-Geschwister-Tieren .....	52
4.1.1.2.2.2	Vergleich der <i>arg3.1/arc</i> Expression in CHL1-defizienten Mäusen und Wildtypen .....	53
4.1.1.3	Zusammenfassung der <i>Taste-Novelty</i> -Ergebnisse .....	56
4.1.2	Offenfeld-Lochbrett-Test .....	57
4.1.3	Geruchs-Kennenlern-Test.....	60
4.1.4	Angst-Konditionierung.....	62
4.1.5	Heiße-Platte-Analgesie-Test.....	65
4.1.6	Zusammenfassung der Analyse der CHL1-defizienten Tiere .....	66
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung der induzierbar CHL1-defizienten Linien .....</b>	<b>67</b>
4.2.1	Die konstitutiv aktive CMV-Cre-Rekombinase-Linie .....	67
4.2.1.1	Nachweis der CHL1-Excision auf genomischer Ebene .....	68
4.2.1.2	Nachweis des Proteins von CHL1 mittels Western-Blot und CHL1-Immunhistochemie (IHC).....	69

4.2.1.3	Visualisierung der Moosfaserendigungen im Hippocampus durch anti-Synaptophysin-IHC sowie TIMMs-Färbung in <i>loxP</i> -CMV-Cre-Tieren .....	71
4.2.1.4	Lectin-Färbung der olfaktorischen Bulbi in der <i>loxP</i> -CMV-Cre-Maus .....	73
4.2.2	Die konditionell aktive CMV-CreER <sup>T</sup> -Rekombinase-Linie.....	76
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>79</b>
<b>5.1</b>	<b>Verhaltensbiologische Charakterisierung der konventionell CHL1-defizienten Maus.....</b>	<b>79</b>
5.1.1	<i>Taste-Novelty</i> und plastizitätsrelevante Ereignisse im CHL1-defizienten Gehirn .....	79
5.1.1.1	Der lokale Glukoseumsatz nach gustatorischer Stimulation.....	80
5.1.1.2	Die mRNA-Expression von <i>c-fos</i> nach gustatorischer Stimulation .....	81
5.1.1.3	Die <i>arg3.1/arc-Expression</i> nach gustatorischer Stimulation.....	83
5.1.1.4	<i>Taste-Novelty</i> und ihre Auswirkung auf verschiedene limbische und neokortikale Areale der CHL1-defizienten Maus .....	84
5.1.2	Offenfeld-Lochbrett-Test und Geruchs-Kennenlern-Test .....	89
5.1.3	Angst-Konditionierung und Heiße-Platte-Analgesie-Test .....	92
5.1.4	Zusammenfassung für die konventionell CHL1-defizienten Mäuse .....	93
<b>5.2</b>	<b>Die Analyse der konditionell CHL1-defizienten Linien.....</b>	<b>94</b>
5.2.1	Überprüfung der Funktionalität der <i>loxP</i> -Cre-Rekombinase-Systeme.....	94
5.2.1.1	Das <i>loxP</i> -CMV-Cre-Rekombinase-System.....	94
5.2.1.2	Das <i>loxP</i> -CreER <sup>T</sup> -Rekombinase-System .....	95
5.2.2	Morphologische Veränderungen im <i>loxP</i> -CMV-Cre-CHL1-defizienten Gehirn.....	96
<b>5.3</b>	<b>Vergleich der konventionell und konditionell CHL1-defizienten Mäuse.....</b>	<b>98</b>
<b>5.4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>103</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>114</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	114
7.2	Gruppen-Mittelwerte der 2DG-Anreicherung in relativer optischer Dichte (ROD) mit Standardfehler für die <i>Taste-Novelty</i> .....	116
7.3	Gruppen-Mittelwerte der <i>c-fos</i> -positiven Zellen pro mm <sup>2</sup> mit Standardfehler für die <i>Taste-Novelty</i> .....	117
7.4	Gruppen-Mittelwerte der <i>arg3.1/arc</i> -positiven Zellen pro mm <sup>2</sup> mit Standardfehler für die <i>Taste-Novelty</i> .....	118

Lebenslauf

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

Das Molekül CHL1 (*Close Homolog of L1*) gehört zur L1-Familie der Ig-Superfamilie neuronaler Zellerkennungsmoleküle. Die Deletion von CHL1 in der Maus führte im Hippocampus und im olfaktorischen Bulbus zu Fehlern in der axonalen Verschaltung. Erste verhaltensbiologische Analysen konnten bei CHL1-defizienten Tieren Unterschiede im Verhalten aufzeigen, die auf eine veränderte Informationsverarbeitung schließen lassen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob das fehlerhafte neuronale Netzwerk CHL1-defizienter Tiere Prozesse der Informationsverarbeitung im Gehirn beeinflusst. Zur Überprüfung dieser Theorie wurde die Aktivität verschiedener limbischer und neokortikaler Areale CHL1-defizienter Tiere nach Stimulation mit einem neuen, vertrauten oder neutralen Geschmack untersucht. Als Aktivitätsmarker dienten neben 2-Deoxyglukose die IEGs *c-fos*, ein modulatorischer Transkriptionsfaktor, und *arg3.1/arc*, ein Effektor-Gen.

Mit 2DG, einem Marker für metabolische Aktivität, konnten keine generellen Unterschiede in der Aktivierung von Hirnarealen durch geschmackliche Stimulation zwischen Wildtypen und CHL1-defizienten Tieren gefunden werden. Im Gegensatz dazu führte die Stimulation von Wildtypen mit einer neuen Lösung (*Novelty*) im Vergleich zu einer neutralen Lösung zu einer signifikant erhöhten Expression der IEGs *c-fos* und *arg3.1/arc*. Ähnlich erhöhte Expressionslevel konnten in bestimmten Hirnarealen CHL1-defizienter Tiere sowohl durch eine neue als auch eine vertraute Lösung induziert werden. Am deutlichsten wurde dieser Effekt in der Amygdala und den cingulären Kortizes. Diese gleichförmige Repräsentation neuer und vertrauter Stimuli in Arealen des *Novelty*-verarbeitenden Netzwerkes CHL1-defizienter Tiere deuten auf eine gestörte Erkennung dieser Stimuli hin. Weitere verhaltensbiologische Untersuchungen zur *Novelty*-Detektion und Familiarisierung mittels Offenfeld-Lochbrett-Test und Geruchs-Kennenlern-Test ließen dagegen keine Beeinträchtigung dieser Prozesse in Abwesenheit von CHL1 erkennen. Die Überprüfung der Funktion von Hippocampus und Amygdala durch eine klassische Angst-Konditionierung ergaben keine Hinweise auf eine grundsätzliche Störung dieser Areale. CHL1-defiziente Tiere zeigten in den genannten Tests allerdings Veränderungen im Verhalten, die darauf hindeuten, daß CHL1-defiziente Tiere Informationen nicht korrekt verarbeiten können und zum Beispiel auf angstvolle Situationen in veränderter Weise reagieren.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob auch die Verwendung eines *loxP*-Cre-Rekombinase-Systems zu einer CHL1-Defizienz führt. Durch molekularbiologische, proteinbiochemische und immunhistochemische Methoden konnte gezeigt werden, daß eine zum konventionellen CHL1-*knock-out* äquivalente Mutation im CHL1-Gen zu einer Reduktion des Proteins im Gehirn von *loxP*-CMV-Cre-Tieren führte und vergleichbare axonale Projektionsfehler im Hippocampus und im olfaktorischen Bulbus auftraten.

Durch die vorliegenden Ergebnisse wird die Theorie erhärtet, daß CHL1 an der korrekten Ausbildung des neuronalen Netzwerkes beteiligt ist und das permanente Fehlen des Moleküls zu axonalen Projektionsfehlern führt. Zudem konnte erstmalig gezeigt werden, daß morphologische Veränderungen im neuronalen Netzwerk mit Veränderungen von Informationsverarbeitungsprozessen auf molekularer Ebene korrelieren, was die Verhaltensantwort von Tieren auf bestimmte Reize beeinflussen kann.

## 2 EINLEITUNG

Vor nahezu 100 Jahren wurde das Prinzip der selektiven Zell-Zell-Erkennung durch Versuche an Schwämmen (*Porifera*) entdeckt und rund 40 Jahre später ebenfalls für die Embryonalentwicklung von Vertebraten nachgewiesen. Im Jahr 1963 haben Attardi & Sperry das Vorkommen verschiedener Moleküle in der Zelloberfläche postuliert, die durch chemotaktische Prozesse die Zellerkennung zwischen verschiedenen Zellen während der Ontogenese und im ausgereiften Organismus kontrollieren. Durch Antikörperhemmstudien, bei denen durch Applikation von Antikörpern die Reaggregation von dissoziierten Zellen verhindert wurde, konnten diverse Moleküle entdeckt werden, die diese Aufgabe wahrnehmen. Ursprünglich als reiner ‚Zellkleber‘ verstanden, haben diese sogenannten Zelladhäsionsmoleküle aber weit mehr Funktionen als das bloße Zusammenhalten von Zellverbänden (Übersichtsartikel: Juliano, 2002). In den letzten Jahrzehnten wurde durch intensive Forschung auf diesem Gebiet deutlich, daß Zelladhäsionsmoleküle in der Tat an vielen Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind, weshalb sie mittlerweile auch Zellerkennungsmoleküle genannt werden. Sie beeinflussen einerseits die Anheftung von Zellen untereinander oder an die extrazelluläre Matrix, auf der anderen Seite sind sie wichtig für Zellwanderung. Diese Prozesse der Gewebedifferenzierung und Zellwanderung sind Aspekte, die sowohl zur Entwicklung nicht-neuronaler als auch neuronaler Gewebe gehören. Für die Entwicklung und Integrität des Nervensystems kommt daher der Gruppe der neuronalen Zellerkennungsmoleküle eine besondere Bedeutung zu.

### 2.1 Neurale Zellerkennungsmoleküle

Das menschliche Gehirn besteht aus etwa  $10^{12}$  Neuronen, die über  $10^{15}$  spezifische synaptische Verbindungen herstellen, um ein funktionelles Organ zu bilden (Goodman, 1996). Das Auswachsen von Axonen und Dendriten ist eine Besonderheit neuronaler Ausdifferenzierung, welche zur Etablierung der neuronalen Verbindungen beiträgt und gleichzeitig einen limitierenden Faktor für die Regeneration des Nervensystems darstellt. Der Prozeß des Neuritenauswachsens ist ein hochpräziser Vorgang, der durch Interaktion des Wachstumskegels, der Spitze des auswachsenden Fortsatzes, mit attraktiven oder auch repulsiven Signalen im umgebenden Milieu gesteuert wird. Ausgehend von den Studien Sperrys (1963), der einzigartige chemische Signale auf jedem Neuron postulierte, wird heute allgemein angenommen, daß Zellerkennungsmoleküle als solche Signale fungieren können (Übersichtsartikel: Goodman, 1996). Attraktive und repulsive Moleküle befinden sich

entweder in der extrazellulären Matrix oder in der Membran von Zellen. Allerdings sind ‚repulsiv‘ und ‚attraktiv‘ keine Eigenschaften der Moleküle an sich, sondern hängen vom Status der reagierenden Neurone ab. So haben Castellani *et al.* (2000) durch Zellkulturexperimente gezeigt, daß Semaphorin3A in Interaktion mit L1 als Repellent auf Wachstumskegel wirkt. Dagegen ist eine lösliche L1Fc-Chimäre ein effizientes extrazelluläres Signal, das die Reaktivität L1-defizienter Axone gegenüber Semaphorin3A nicht wieder herstellt, sondern die Chemorepulsion von Semaphorin3A gegenüber Axonen in Attraktion umwandelt.

Neurale Zellerkennungsmoleküle werden aufgrund molekular-struktureller Merkmale in vier Hauptfamilien eingeteilt: Cadherine, Integrine, extrazelluläre Matrixmoleküle und Immunglobulin-(Ig-) Superfamilie. An der Zelloberfläche exprimiert, fungieren Integrine als Rezeptoren für Proteine der extrazellulären Matrix, wie Fibronectin, Laminin oder Kollagen, und Cadherine als Vermittler von Kontakten zwischen benachbarten Zellen und spielen bei der Synaptogenese eine wichtige Rolle (Garner *et al.*, 2002; Juliano, 2002). Die neuronalen Mitglieder der Ig-Superfamilie sind durch das Vorhandensein zumindest einer Immunglobulin-Domäne gekennzeichnet. Ig-Domänen sind aus etwa 100 Aminosäuren aufgebaute kompakte Strukturen aus zwei  $\beta$ -Faltblättern in antiparalleler Anordnung, deren Stabilität durch eine Disulfidbrücke zwischen zwei konservierten Cysteinen gewährleistet wird. Mitglieder dieser Superfamilie sind entweder integrale Membranproteine (z.B. NCAM-180, L1) oder durch einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-) (z.B. NCAM-120, TAG-1, F3) in der Zellmembran verankert. Die Art der Befestigung an der Zellmembran und die Länge der intrazellulären Domäne sind strukturelle Faktoren, die entscheidende Konsequenzen für die Funktionsweise dieser Moleküle haben. So gibt es für viele dieser Proteine verschiedene Isoformen mit unterschiedlichen funktionellen Aspekten und Expressionsmustern im Gehirn (Übersichtsartikel: Fields & Itoh, 1996). Ein typisches Beispiel dafür ist das neurale Zellerkennungsmolekül NCAM, das im sich entwickelnden und ausgereiften Nervensystem stark exprimiert ist. Dieses Molekül kommt in diversen Isoformen vor, welche sich durch alternatives Spleißen in der intrazellulären Domäne, die Art der Membranassoziation sowie im Vorhandensein von bestimmten extrazellulären Mikroexons unterscheiden (Übersichtsartikel: Goodman, 1996). Für L1 wurde gezeigt, daß der alternative Gebrauch von Exon 2 im extrazellulären Teil die Bindungseigenschaften von L1, homophil aber auch heterophil mit TAG-1 und Contactin/F11/F3, *in vitro* beeinflussen kann (De Angelis *et al.*, 2001). Während L1 in voller Länge neuronal verbreitet ist, ist die alternativ gespleißte Isoform ohne Exon 2 und 27 in anderen Zelltypen vertreten. Neurale Zellerkennungsmoleküle kontrollieren Prozesse wie neuronale Adhäsion und Migration,

Neuritenauswachsen und Faszikulation sowie Synaptogenese und intrazelluläre Signalübertragung.

### 2.1.1 Die L1-Familie der neuralen Zellerkennungsmoleküle

Zur Immunglobulin-Superfamilie gehört auch die L1-Familie der neuralen Zellerkennungsmoleküle. Die Mitglieder der L1-Familie zeichnen sich durch ihre hohe strukturelle Homologie aus und kommen in verschiedenen Spezies vom Invertebraten bis zum Säugetier vor (Fields & Itoh, 1996; Holm *et al.*, 1996). In Vertebraten wurden in verschiedenen Spezies bisher folgende Mitglieder der L1-Familie beschrieben: L1 (Maus, Ratte, Mensch), CHL1 (Maus, Ratte, Mensch), Neurofascin (Maus, Ratte, Huhn), NrCAM (Maus, Ratte, Huhn, Mensch), NgCAM (Huhn), L1.1 und L1.2 (Zebrafisch) und L1-CAM (Goldfisch). In Invertebraten konnten zwei weitere Mitglieder, Neuroglian (Grashüpfer, Motte, Fruchtfliege) und Tractin (Blutegel), isoliert werden (Übersichtsartikel: Hortsch, 1996). Proteine der L1-Familie sind plasmamembranständig mit einem glykosylierten extrazellulären N-terminalen Bereich, einer Transmembrandomäne sowie einer stark konservierten phosphorylierbaren zytoplasmatischen C-terminalen Domäne. Der extrazelluläre Abschnitt besitzt eine Signalsequenz, sechs C2-Typ-Immunglobulin-Domänen und vier bis fünf Fibronectin-TypIII-Domänen. Die Moleküle der L1-Familie vermitteln Kalzium-unabhängig Adhäsion durch homophile (zwischen zwei identischen Molekülen) und/oder heterophile (zwischen zwei unterschiedlichen Molekülen) Interaktionen. Heterophile Interaktionen werden mit Mitgliedern der Ig-Superfamilie, Integrinen oder extrazellulären Matrixproteinen eingegangen (Übersichtsartikel: Kamiguchi & Lemmon, 2000). Die intrazelluläre Domäne der Moleküle der L1-Familien ist nicht wichtig für homophile Interaktionen aber für Signaltransduktionsvorgänge und die Interaktion mit dem Zytoskelett (z.B. Bindung von Ankyrin). Diese Interaktionen können durch Phosphorylierungen z.B. an der FIGQY-Region der intrazellulären Domäne verschiedener L1-Familienmitglieder gesteuert werden (Jenkins *et al.*, 2001). Homo- und heterophile Interaktionen können sowohl in trans- (mit Molekülen in benachbarten Zellen) als auch in cis-Form (mit Molekülen in derselben Zellmembran) stattfinden. In Zellkulturexperimenten haben Malhotra *et al.* (1998) zeigen können, daß TAG-1 homophile trans-Interaktionen eingeht, dadurch befähigt wird in cis-Form mit L1 zu interagieren, was wiederum L1 in die Lage versetzt Ankyrin zu binden. Mitglieder der L1-Familie fördern einerseits das Neuritenauswachsen und die Zellbeweglichkeit, auf der anderen Seite aber auch die Zellanheftung und die Axonbündelung. Diese antagonistischen Effekte werden durch Veränderungen in der

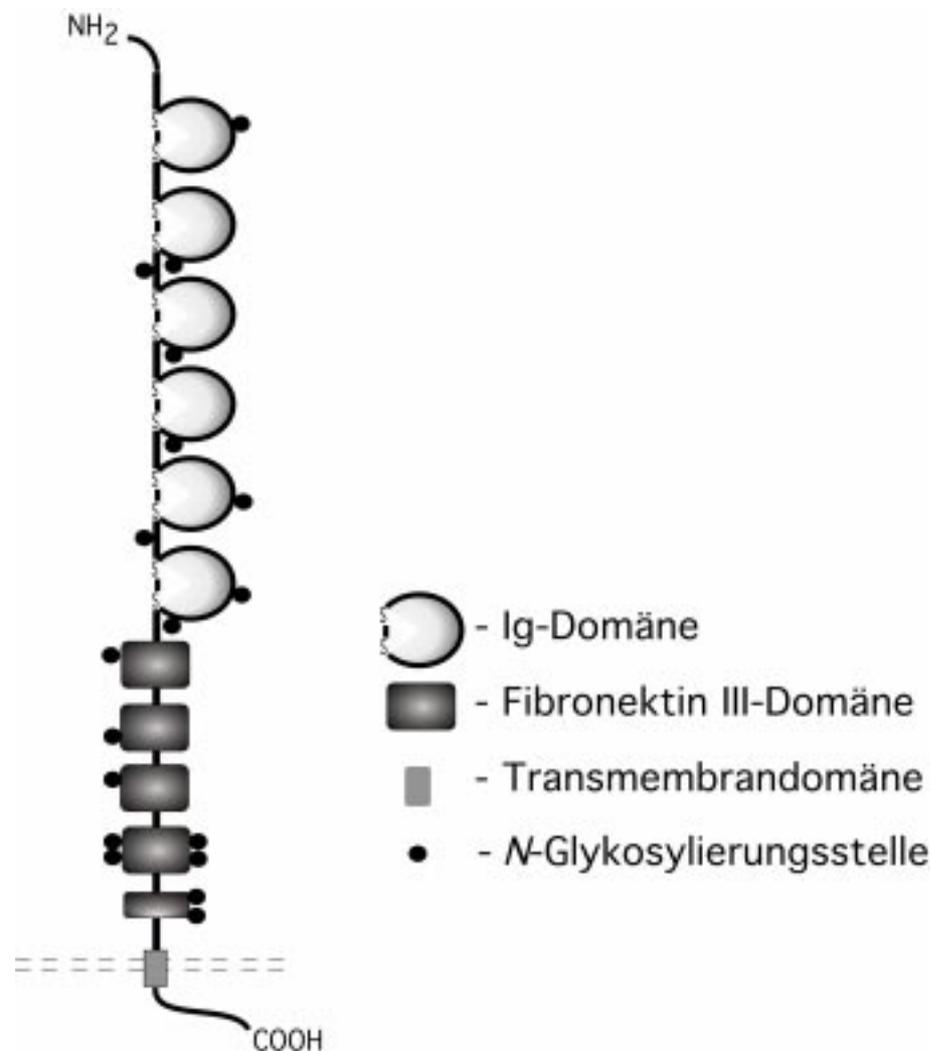
Expression einzelner Moleküle, durch Variation der verschiedenen Isoformen einzelner Mitglieder, sowie posttranslationale Modifizierungen und intrazelluläre Signalweiterleitung gesteuert. Die nur zum Teil zeitlich und lokal überlappenden Expressionsmuster der verschiedenen Mitglieder der L1-Familie lassen auf ähnliche aber distinkte Funktionsweisen dieser Moleküle schließen. Dies implizieren auch Befunde von *knock-out*-Mäusen verschiedener neuraler Zellerkennungsmoleküle, z.B. L1 (Cohen *et al.*, 1998), Netrin-1 (Serafini *et al.*, 1996) und NCAM (Cremer *et al.*, 1997). Die Deletion von Zellerkennungsmolekülen, auch aus der L1-Familie, hat in den defizienten Tieren zu Defekten im Auswachsen von Axonen in jeweils bestimmten Regionen des Nervensystems geführt.

Durch mögliche Interaktionen mit dem Zytoskelett und der Befähigung zur Signaltransduktion sind neurale Zellerkennungsmoleküle, nicht nur der L1-Familie, ideale Kandidaten, als Akteure in Plastizitätsvorgänge des neuronalen Netzwerkes einzugreifen. So kann L1 durch Interaktion mit verschiedenen Liganden zum Beispiel eine Änderung des pH-Werts der Zelle oder Konzentrationsänderungen von intrazellulärem Inositolphosphat und  $\text{Ca}^{2+}$  bewirken (Übersichtsartikel: Bartsch & Schachner, 1999). Diese Veränderungen können die Signalleitungseigenschaften der Zelle beeinflussen und die synaptische Gewichtung im neuronalen Netzwerk verändern, was wiederum direkten Einfluß auf Lernleistungen und Verhalten von Tieren haben kann. So diskutieren Murphy *et al.* (1998) einen Einfluß von NCAM und dessen Polysialylierung auf die Konsolidierung von Gedächtnisinhalten. Ein direkter Hinweis auf die Bedeutung von Zellerkennungsmolekülen für Lernprozesse konnte z.B. durch die Applikation von Antikörpern gegen L1.1 im Zebrafisch oder antisense-Oligonukleotiden gegen NCAM im Huhn gezeigt werden, wodurch eine erfolgreiche Gedächtnisetablierung verhindert wurde (Mileusnic *et al.*, 1999; Pradel *et al.*, 2000).

### 2.1.2 Das Molekül CHL1 (*Close Homolog of L1*)

Bei dem Molekül CHL1 handelt es sich um einen relativ neu entdeckten Vertreter der L1-Familie. Mit dem Namensgeber L1 teilt dieses Protein eine hohe strukturelle Homologie. So ist die Aminosäureabfolge der intrazellulären Domäne zu 57 % und des gesamten extrazellulären Teils zu 37 % zwischen L1 und CHL1 konserviert (Holm *et al.*, 1996). CHL1 besitzt sechs Immunglobulin- und viereinhalb Fibronectin-TypIII-Domänen, eine Transmembran- sowie eine intrazelluläre Domäne (siehe **Abb. 1**). Die mRNA von CHL1 kann im Gehirn und Rückenmark gefunden werden. In nicht-neuronalen Geweben wie Thymus, Lunge, Leber und Nieren scheint keine oder nur sehr wenig mRNA vorzukommen.

dortigen Neurone CHL1-positiv sind. So konnte CHL1 mittels *in situ*-Hybridisierung im Cerebellum der Maus ausschließlich in der Körnerzellschicht nachgewiesen werden (Holm *et al.*, 1996). Eine Entwicklungsstudie an Ratten hat gezeigt, daß im Neokortex CHL1-mRNA nur in postmitotischen Zellen exprimiert wird (Liu *et al.*, 2000).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der domänenartigen Struktur des CHL1-Proteins**

Das Molekül CHL1 zeichnet sich durch 6 Ig-Domänen des C2-Typs mit Disulfidbrücken, 4<sup>1/2</sup> Fibronectin-Typ-III Domänen, einer Transmembrandomäne sowie einer intrazellulären Domäne aus. Zusätzlich sind mögliche Glykosylierungsstellen angegeben.

Das Protein von CHL1 ist in den meisten neuronalen Zelltypen exprimiert und kann im Gehirn erstmals am Embryonaltag 13 gefunden werden, erreicht ein Expressionsmaximum vom Embryonaltag 18 bis zum Postnaltag 7, wird im weiteren Verlauf herunterreguliert und im adulten Gehirn nur in geringeren Mengen exprimiert (Hillenbrand *et al.*, 1999). Dieser Zeitverlauf ist ähnlich der Expression des Namensgebers L1. Somit ist CHL1 zum Zeitpunkt der Synaptogenese, die um Postnaltag 14 größtenteils abgeschlossen ist, besonders stark vertreten. Im Western-Blot zeigt CHL1, wie verwandte Moleküle, ein dreiteiliges Bandenmuster. So gibt es eine transmembrane Form von 185 kDa Molekulargewicht und zwei

Bandenmuster. So gibt es eine transmembrane Form von 185 kDa Molekulgewicht und zwei lösliche Formen von 165 kDa und 125 kDa Größe (Hillenbrand *et al.*, 1999). Vermutlich entsteht die lösliche 165 kDa Form durch proteolytische Spaltung, obwohl keine entsprechende Konsensussequenz in der Aminosäuresequenz von CHL1 gefunden wurde (Holm *et al.*, 1996). Holm *et al.* (1996) konnten durch enzymatische Deglycosylierung außerdem nachweisen, daß etwa 20 % der Molekülmasse aller drei Formen von CHL1 durch Karbohydrate verursacht werden, die über *N*-Glykosylierungsstellen mit dem extrazellulären Teil verbunden sind.

Die Funktion des Moleküls ist bisher weitgehend unbekannt. Es wurde aber gezeigt, daß CHL1 *in vitro* sowohl in löslicher als auch in membranständiger Form das Neuritenwachstum fördern kann (Holm *et al.*, 1996). Sowohl Hippocampusneurone als auch Körnerzellen des Cerebellums zeigten ein verstärktes Auswachsen ihrer Neurite, wenn sie auf CHL1-transfizierten L-Zellen kultiviert wurden (Hillenbrand *et al.*, 1999). Zhang *et al.* (2000) konnten zeigen, daß eine Hochregulation von CHL1 in Motor-Neuronen und Neuronen der *dorsal root ganglia* (Hinterwurzelganglien) mit axonaler Regeneration korreliert ist und postulierten eine Rolle von CHL1 für die Regeneration peripherer Nerven. Mögliche Interaktionspartner von CHL1 konnten bisher nicht identifiziert werden. So bilden CHL1-transfizierte L-Zellen keine Aggregate, was gegen homophile Bindungsmechanismen spricht (Hillenbrand *et al.*, 1999). Eine Interaktion mit L1 konnte durch das gleiche Versuchssystem ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Holm *et al.* (1996) haben mittels eines spezifischen Antikörpers herausgefunden, daß CHL1 ein HNK-1-Karbohydrat trägt. Es wird vermutet, daß CHL1, wie andere Mitglieder der L1-Familie, über das HNK-1-Karbohydrat mit Laminin in der extrazellulären Matrix interagieren kann. Interaktionen von Zellerkennungsmolekülen mittels des HNK-1-Karbohydrats mit Laminin können Prozesse des Axonauswachsens beeinflussen, wie Schmidt *et al.* (1998) für die Regeneration retinotektaler Projektionen im Goldfisch durch Antikörperapplikationen mittels Infusionspumpe für L1 und NCAM gezeigt haben. Für das zielgerichtete Auswachsen von Axonen scheint das Vorkommen von CHL1 in deren Zielgebiet nicht wichtig zu sein. Dies deuten zumindest neuere Befunde für den olfaktorischen Bulbus der Maus an, wo keine mRNA aber das Protein von CHL1 nachgewiesen werden konnte (Montag-Sallaz *et al.*, 2002). Die Autoren vermuten eine Lokalisation von CHL1 in den Axonen und Endigungen der olfaktorischen Nerven und/oder zentraler Afferenzen. Somit trägt das Vorhandensein von CHL1 in Axonen möglicherweise zu deren zielgerichtetem Auswachsen bei.

Auch im Menschen konnte CHL1 nachgewiesen werden. Das menschliche Ortholog von CHL1 (CALL, 84 % Aminosäure-Identität zu CHL1) liegt auf dem Abschnitt p26 des dritten

Chromosoms (Wei *et al.*, 1998). Vor einiger Zeit wurde festgestellt, daß das sogenannte 3p-Syndrom durch einen DNA-Verlust genau dieser Region hervorgerufen wird (Angeloni *et al.*, 1999a). Das 3p-Syndrom ist durch verschiedene Deformationen unter anderem am Gehirn, wie durch die Ausbildung eines Mikrocephalus oder Myelinisierungsfehler, sowie durch motorische und geistige Retardierung gekennzeichnet. Außerdem wird ein Zusammenhang zwischen dem CHL1-Molekül und menschlicher Intelligenz diskutiert (Angeloni *et al.*, 1999a; Angeloni *et al.*, 1999b). Um die Konsequenzen einer CHL1-Defizienz gezielt *in vivo* zu studieren, wurde eine CHL1-defiziente Maus hergestellt.

### 2.1.2.1 Die konventionelle CHL1-defiziente Maus

Wie kürzlich von Montag-Sallaz *et al.* (2002) beschrieben, wurde mittels homologer Rekombination eine CHL1-*knock-out*-Maus generiert. Das erste Exon vom CHL1-Gen, welches das Start-Codon trägt, wurde durch eine PGK-*neo* Kasette ersetzt und führte daraufhin zu einem totalen Verlust des CHL1-Moleküls. Wie die Autoren weiter ausführen sind die CHL1-defizienten Tiere lebensfähig und relativ unauffällig in ihrem Verhalten. Der generelle Status der Tiere, erhoben nach dem SHIRPA-Protokoll (Hatcher *et al.*, 2001), hat keine Besonderheiten ergeben. Dabei wurden wichtige Grundwerte und Funktionen, wie z.B. Gewicht, Körpertemperatur, Freßverhalten, motorische Fähigkeiten und dergleichen aufgenommen. Die von Montag-Sallaz *et al.* (2002) durchgeführte erste Analyse sowohl der Hirnmorphologie als auch des Verhaltens dieser Tiere erbrachte einige Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen. So wurde auf Hirnschnitten CHL1-defizienter Mäuse mit einer radioaktiven *in situ*-Sonde eine signifikant erhöhte Expression der mRNA von NCAM-180 im olfaktorischen Bulbus, im Kortex, in den verschiedenen Regionen des Hippocampus (CA1-CA3, Gyrus Dentatus) und in der Amygdala festgestellt. Zu den morphologischen Defekten CHL1-defizienter Tiere zählt eine veränderte axonale Terminierung der hippocampalen Moosfasern in die CA3-Region. In CHL1-defizienten Tieren verschalten die Moosfasern, die Axone der Körnerzellen des Gyrus Dentatus, nicht nur auf die apikalen Dendriten, wie es in Wildtypen der Fall ist, sondern auch auf die Somata der CA3-Pyramidenzellen des Hippocampus. Auch im olfaktorischen Bulbus konnten Veränderungen in der axonalen Projektion gefunden werden. In adulten Wildtyp-Mäusen projizieren die Rezeptorneurone des Riechepithels der Nase ausschließlich und gezielt in einen Glomerulus. In CHL1-defizienten Tieren enervieren die Rezeptorneurone dagegen zum Teil zwei Glomeruli oder wachsen in die tiefergelegene externe plexiforme Schicht des olfaktorischen Bulbus ein. Eine weitere morphologische Veränderung in CHL1-Mutanten ist die Erweiterung der lateralen Ventrikel,

die sich mit fortschreitender Rückkreuzung auf den C57-Hintergrund manifestiert hat. Erste verhaltensbiologische Versuche haben gezeigt, daß CHL1-defiziente Tiere im Offenfeld-Test eine größere Präferenz für das Mittelfeld zeigen als ihre Wildtyp-Geschwister. Hinzu kommt eine erhöhte Offenarmpräferenz im Vergleich zu Wildtypen im erhobenen Plus-Labyrinth, während der Licht-Dunkel-Vermeidungs-Test keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt hat. Die Durchführung eines *Water-Maze* mit unsichtbarer Plattform ergab keine Lerndefizite bei CHL1-defizienten Tieren. Allerdings waren sie nach dem Erlernen einer Plattformposition beim Umlernen auf eine neue Position weniger flexibel als ihre Wildtyp-Geschwister. Die Unterschiede im Verhalten CHL1-defizienter Tiere werden von den Autoren als Konsequenzen eines veränderten Explorationsverhaltens diskutiert. Aus der morphologischen und verhaltensbiologischen Analyse CHL1-defizienter Tiere resultiert die Hypothese, daß CHL1 an der korrekten Etablierung des neuronalen Netzwerkes beteiligt ist, welches für die richtige Verarbeitung von Informationen von Bedeutung ist. Für eine Überprüfung dieser Theorie ist eine detailliertere Analyse der CHL1-defizienten Tiere unerlässlich.

### 2.1.2.2 Induzierbare *knock-out*-Systeme

Der Einsatz der konventionellen *knock-out*-Technologie birgt einige Limitierungen, die eine Analyse der Mutanten und die Interpretation der daraus resultierenden Ergebnisse erschweren wenn nicht sogar unlösbar machen. So zeigen die CHL1-defizienten Tiere axonale Fehlterminierungen in der hippocampalen Region und im olfaktorischen Bulbus, die ursächlich für die Veränderungen im Verhalten sein können. Zusätzlich kann es aber auch zu Kompensationsmechanismen kommen, das heißt, das fehlende Protein wird durch eine veränderte Expression anderer Moleküle ersetzt und verschleiert die tatsächliche Bedeutung des Moleküls für den Organismus (Picciotto and Wickman, 1998). Dies wurde zum Beispiel für CREB-defiziente Mäuse beschrieben, in denen das fehlende Protein durch andere Mitglieder aus der gleichen Molekülfamilie (CREM und ATF-1) kompensiert wird (Hummler *et al.*, 1994). Die erhöhte Expression von NCAM-180 mRNA im Gehirn CHL1-defizienter Tiere könnte ebenfalls auf Kompensationsmechanismen hindeuten (Montag-Sallaz *et al.*, 2002). Verhaltensänderungen und morphologische Defekte sind möglicherweise nicht etwa primär auf das Fehlen eines einzelnen Produktes zurückzuführen, sondern könnten sekundäre Effekte der veränderten Molekülausstattung sein. Ein direkter Einfluß von CHL1 auf Lern- und Gedächtnisvorgänge, wie sie für NCAM oder L1 beschrieben sind, kann nicht ganz ausgeschlossen werden. Die Untersuchung der CHL1-defizienten Maus führt zu Fragen, die mit einem konventionellen *knock-out*-Organismus nicht beantwortet werden können.

Aus diesem Grund wurden Möglichkeiten gesucht, ein Gen *in vivo* zu deletieren. Es wurde ein virales System, das *loxP*-Cre-Rekombinase-System des P1-Bakteriophagen, für den Gebrauch im Mammaliengenom adaptiert (Übersichtsartikel: Nagy, 2000). In das Genom werden sogenannte *loxP*-Elemente eingefügt, so daß sie das interessierende Gen flankieren. Ein *loxP*-Element ist eine 34 bp DNA-Sequenz, die zwei spiegelverkehrte 13 bp Stücke und eine 8 bp große Kernregion enthält. Wenn diese *loxP*-Elemente in gleicher Orientierung eingefügt werden, kann die Cre-Rekombinase aus dem P1-Bakteriophagen von *E. coli* an dieser Stelle das dazwischen liegende DNA-Stück ausschneiden und so einen genetischen *knock-out* erzeugen (Kellendonk *et al.*, 1999; Tsien, 1999). Durch Fusionieren der Cre-Rekombinase mit verschiedenen Promotoren kann eine räumliche und zeitliche Kontrolle ihrer Aktivität erreicht werden (Eriksson *et al.*, 2000; Hirasawa *et al.*, 2001). In den meisten Fällen ist es allerdings technisch unmöglich, das gesamte Gen von Interesse mit *loxP*-Elementen zu flankieren, da mit steigender Nukleotidzahl, und damit Größe der Zielregion, zusätzlich auch die Excisionseffizienz der Cre-Rekombinase fällt (Nagy, 2000). Typischerweise wird deswegen das Exon mit dem Signal für den Translationsstart mit *loxP*-Elementen versehen (Abb. 2). Man spricht dann von einem geflochtenen Gen.

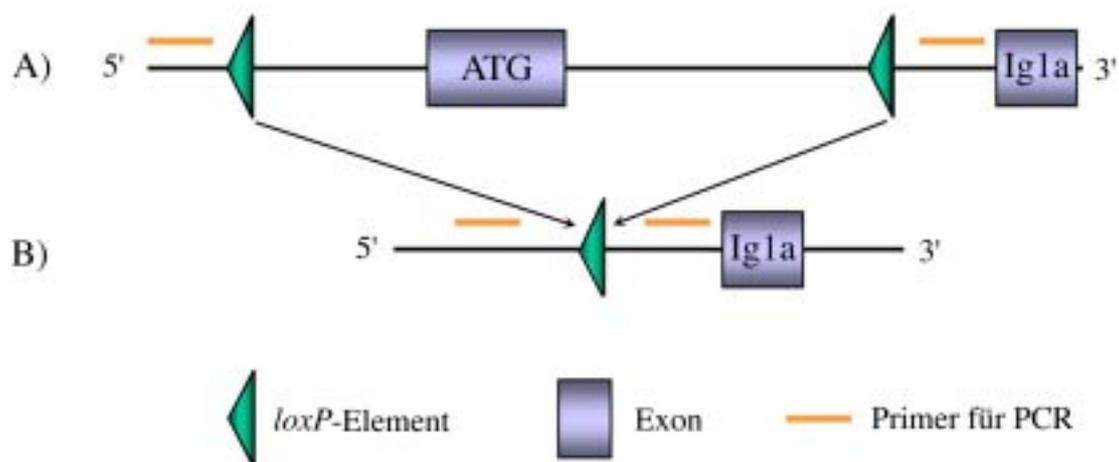


Abb. 2: **Schematische Darstellung der Funktionsweise des *loxP*-Cre-Rekombinase-Systems**

A) Die Cre-Rekombinase schneidet an den *loxP*-Elementen die dazwischen befindliche Nukleotidsequenz heraus, so daß ein *loxP*-Element verbleibt. B) Das Start-Codon fehlt und das Protein kann nicht mehr translatiert werden. Die Excision kann über spezifische Primer mittels PCR nachgewiesen werden.

Für einen induzierbaren *CHL1-knock-out* wurden *loxP*-Elemente in Intronbereiche des *CHL1*-Gens inkloniert, die das Start-Exon flankieren (Dr. D.Montag, Abschnitt 3.1.6.2, **Abb. 3**). Eine andere Zuchtlinie trägt eine mit einem CMV-Promoter fusionierte Cre-Rekombinase (Nagy, 2000). Der Promoter des Cytomegalovirus (CMV), einem Virus aus der Herpes-Familie, ist ein ubiquitär wirksamer Promoter, der in postmitotischen noch nicht ausdifferenzierten Zellen aktiv ist. Durch Verpaaren der Linien kommt es in deren

Nachkommen, die sowohl das gefloxt Gen als auch die Cre-Rekombinase tragen, zur gerichteten Excision des Gens in den Zellen, in denen die Cre-Rekombinase exprimiert wird (**Abb. 2**). So sollte die Excision bereits in der befruchteten Eizelle oder in den darauf folgenden Entwicklungsstadien stattfinden. Auf diese Weise würde mittels des *loxP*-Cre-Systems eine CHL1-defiziente Maus entstehen. Die Etablierung dieser Linie wäre wichtig, um durch deren Analyse Erkenntnisse darüber zu erlangen, ob die Manipulation des Genoms oder zufällig aufgetretene Mutationen den Phänotyp der konventionellen CHL1-defizienten Maus beeinflusst haben.

Um entwicklungsbedingte Phänotypen zu vermeiden und eine zeitliche Kontrolle der genetischen Deletion zu erreichen, wurden ligandenabhängige Cre-Rekombinasen entwickelt. Durch Fusionierung der mutierten Ligandenbindungsstelle des humanen Östrogenrezeptors mit der CMV-Cre-Rekombinase (CMV-CreER<sup>T</sup>) kann diese nun durch Gabe von synthetischem Tamoxifen, aber nicht durch endogenes Östrogen, aktiviert werden (Indra *et al.*, 1999; Kellendonk *et al.*, 1999). Dazu wurde eine Punktmutation in die Ligandenbindungsstelle eingefügt, wobei die Aminosäure Glyzin an Position 521 durch Arginin ausgetauscht wurde (Feil *et al.*, 1996). Durch Zucht der geflochten CHL1-Linie mit einer CMV-CreER<sup>T</sup>-Rekombinase Linie kann eine zeitliche Kontrolle der CreER<sup>T</sup>-Aktivität erreicht werden. Das heißt, zu einem frei wählbaren Zeitpunkt kann die Cre-ER<sup>T</sup>-Rekombinase aktiviert werden. Damit könnte die Zeitspanne minimiert werden, in der sich kompensatorische Effekte etablieren würden. Im Vergleich von induzierten (Aktivierung der Cre-Rekombinase durch Tamoxifen-Injektion) zu nichtinduzierten Tieren, die bis auf das Zielgen genetisch identisch sind, könnte die Auswirkung dieser Mutation viel gezielter betrachtet werden. Die Etablierung der Tamoxifen induzierbaren Linie ist wichtig, in Zukunft die Auswirkungen einer erst im adulten Tier auftretenden CHL1-Defizienz zu untersuchen. Bevor aber morphologische und später verhaltensbiologische Untersuchungen stattfinden können, muß die Effizienz des *loxP*-Cre-Systems sowohl für die CMV-Cre-Rekombinase als auch die CMV-CreER<sup>T</sup>-Rekombinase überprüft werden.

## **2.2 Neuronale Plastizität als Grundlage für Informationsverarbeitung, Lernen und Gedächtnis**

Für das Überleben von Individuen in einer dynamischen Umwelt ist das Erlernen und Erinnern von Verhaltensweisen, bestimmten Reizen und Ereignissen unerlässlich. Dazu werden Informationen über die Sinnesorgane aufgenommen und innerhalb des Nervensystems weitergeleitet und verarbeitet. Durch Übertragung und Modifikation von Aktivitätsmustern

bzw. Informationen kann das neuronale Netzwerk plastisch auf seine Umwelt reagieren. Indem es sich strukturell verändert, daß heißt synaptische Verbindungen zwischen Nervenzellen gestärkt, geschwächt, neu geschaffen oder getrennt werden, kann das Netzwerk sich den veränderlichen Umweltbedingungen anpassen und Informationen speichern (Murphy & Regan, 1998). Durch Stimulation evozierte Aktivitätsmuster des Gehirns bzw. neuronaler Netzwerke können mittels der verschiedensten Techniken, zum Beispiel elektrophysiologischer Ableitungen oder moderner nichtinvasiver Bildgebungsverfahren, dokumentiert werden und geben Hinweise auf die an der Informationsverarbeitung beteiligten Hirnstrukturen.

## **2.2.1 Kartierung der Gehirnaktivität**

### **2.2.1.1 *Immediate-Early-Gene (IEG)***

Ein wichtiges Element plastizitätsrelevanter Vorgänge im Gehirn ist die Expression sogenannter *Immediate-Early-Gene* (IEG). Sie sind die ersten Gene deren Expression nach zellulärer Stimulation ohne vorhergehende *de novo* Proteinsynthese reguliert wird. Allein ihre rasche und grundsätzlich temporäre Expression nach Stimulation klassifiziert diese Gene als IEG. Darunter befinden sich strukturell und funktionell unterschiedliche Moleküle, wie sekretorische Proteine (z.B. Zytokine), zytoplasmatische Enzyme (z.B. Phosphatasen), ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren (NGFI-B/Nur77/N10) und induzierbare Transkriptionsfaktoren (z.B. Jun, Fos, Krox, SRF) (Übersichtsartikel: Herdegen & Leah, 1998; Guzowski, 2002).

#### **2.2.1.1.1 Der Transkriptionsfaktor *c-fos***

*c-fos* ist eines der bestuntersuchten IEG und gehört zur Klasse der modulatorischen Transkriptionsfaktoren. Nach vollendeter Translation kehrt Fos in den Kern zurück und bildet mit Mitgliedern der Jun-Familie Heterodimere. Dieser sogenannte AP-1-DNA-Bindungskomplex kann an bestimmten Konsensussequenzen in Promoterbereichen vieler Gene binden. AP-1-Bindungsstellen wurden z.B. in Proenkephalin, Prodynorphin und Tyrosin-Hydroxylase gefunden (Herdegen & Leah, 1998). Durch Bindung des AP-1-Komplexes kann die Transkription dieser Zielgene, darunter auch *c-fos*, aktiviert oder gehemmt werden. Der Zeitrahmen der *c-fos* Induktion ist unter den meisten Bedingungen identisch. Innerhalb der ersten 5 Minuten nach Beginn der Stimulation startet der Transkriptionsvorgang und hält 15 – 20 Minuten an. Die angereicherte mRNA erreicht ihren

Konzentrationshöhepunkt 30 – 45 Minuten nach Stimulationsbeginn, um danach mit einer ungefähren Halbwertszeit von 12 Minuten wieder zu fallen (Übersichtsartikel: Morgan & Curran, 1991; Herdegen & Leah, 1998). Multiple Signalwege beeinflussen die rasche Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von konstitutiv exprimierten Transkriptionsfaktoren einschließlich CREB, *serum-response-faktor* (SRF) und *ternary-complex-faktor* (TCF), welche wiederum die Transkription vieler induzierbarer Transkriptionsfaktoren wie *c-fos* steuern. Spannungsabhängige Kalzium-Kanäle sind auch maßgeblich an der Induktion von *c-fos* beteiligt. Viele physiologische aber auch nicht-physiologische Reize können eine schnelle und deutliche mRNA-Anreicherung in vielen Hirnregionen zur Folge haben (Übersichtsartikel: Herrera & Robertson, 1996; Herdegen & Leah, 1998). Dazu zählen unter anderem Neurotransmitter, Streß und auch schmerzhaft oder andere sensorische Stimuli. In den letzten Jahren wurde immer intensiver die Bedeutung von induzierbaren Transkriptionsfaktoren inklusive *c-fos* für die Gedächtnisbildung in Vertebraten vom Vogel bis hin zum Affen diskutiert (Übersichtsartikel: Tischmeyer & Grimm, 1999). Dabei hat sich gezeigt, daß für die Induktion von *c-fos* die Neuigkeit (*Novelty*) des Stimulus bzw. der Trainingssituation ein entscheidender Faktor ist. So habituiert die IEG-Antwort mit fortschreitender Trainingserfahrung. Die Blockierung der *c-fos*-Aktivität durch Applikation von *antisense*-Oligonukleotiden während des Lernvorganges konnte die Gedächtnisetablierung in verschiedenen Spezies und Lernparadigmen stören. Dabei wurde nicht das Kurzzeitgedächtnis sondern nur das Langzeitgedächtnis beeinträchtigt (Tischmeyer & Grimm, 1999; Guzowski, 2002). Somit stellt *c-fos* ein Bindeglied zwischen kurzzeitiger neuronaler Aktivierung und der Formierung von Gedächtnisspuren durch längerwährende Veränderungen des zellularen Phänotyps über die Expressionskontrolle ausgewählter Zielgene dar. Mittlerweile gibt es unzählige Untersuchungen, in denen die Expression von *c-fos* in den verschiedensten Stimulierungs- und Lernparadigmen, wie gustatorischer, olfaktorischer oder taktiler Stimulation, Exploration räumlicher *Novelty* oder konditionierter Geschmacksaversion, z.B. bei Ratten, Mäusen oder Zebrafinken als Marker für die Aktivierung der beteiligten Zellen und Hirnareale eingesetzt wurde (Montag-Sallaz *et al.*, 1999; Filipkowski *et al.*, 2000; Navarro *et al.*, 2000; Bailey *et al.*, 2002; Montag-Sallaz & Buonviso, 2002; Staiger *et al.*, 2002; Turgeon & Reichstein, 2002).

#### **2.2.1.1.2 Das Effektor-Gen *arg3.1/arc***

Zu einer anderen Gruppe der IEG, den sogenannten Effektorgenen, gehört das *activity-regulated gene* (*arg3.1*) (Link *et al.*, 1995) auch *activity-regulated cytoskeleton-associated*

*gene (arc)* (Lyford *et al.*, 1995), welches auf der Basis seiner raschen Induktion nach Auslösen epileptischer Anfälle im Gehirn entdeckt wurde. Effektorgene scheinen direkt in Plastizitätsvorgänge an der Synapse einzugreifen, indem sie deren Struktur, die Signal-Transduktions-Eigenschaften, oder die räumliche Lokalisation kritischer Rezeptoren beeinflussen. So kann die mRNA von *arg3.1/arc* nicht nur im Zellsoma sondern auch in dendritischen Bereichen gefunden werden, die nach Stimulation synaptisch aktiv waren, z.B. nach Induktion von LTP (Steward & Worley, 2001). Die Blockierung von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptoren hat eine Reduzierung der *arg3.1/arc*-mRNA zur Folge (Link *et al.*, 1995; Lyford *et al.*, 1995), was ebenfalls eine Steuerung der Expression durch natürliche exzitatorische synaptische Aktivität belegt. Diese Eigenschaften zusammen mit einer strukturellen Ähnlichkeit zu  $\alpha$ -Spectrin implizieren eine Interaktion von *arg3.1/arc* mit dem Zytoskelett und daraus resultierenden morphologischen Veränderungen der aktivierten Synapsen. Obwohl die letztendliche Funktion von *arg3.1/arc* noch nicht geklärt wurde, konnte experimentell gezeigt werden, daß das Proteinprodukt von *arg3.1/arc* mit strukturellen Proteinen und *calcium and calmodulin kinase II* (CAMKII) interagiert (Übersichtsartikel: Guzowski, 2002). Zumindest eine Funktion des Arg3.1/Arc-Proteins konnte kürzlich in Zellkulturexperimenten nachgewiesen werden. Durch Komplexbildung mit Amida, einem konstitutiv im Gehirn exprimierten Protein, kann Arg3.1/Arc in den Nucleus transportiert werden und die Amida-induzierte Apoptose der transfizierten Zellen verhindern (Irie *et al.*, 2000).

Während der zweiten bis dritten postnatalen Woche, einer Phase in der synaptische Verbindungen aktivitätsbedingt umstrukturiert werden, ist *arg3.1/arc* besonders stark im Gehirn exprimiert. Dies läßt auf eine Rolle von *arg3.1/arc* in sowohl entwicklungsbedingten als auch adulten Plastizitätsvorgängen schließen. Ein besonderer Aspekt der *arg3.1/arc*-Induktion liegt in seiner zweiphasigen Expression. So kann der erste Konzentrationshöhepunkt der mRNA etwa 30 Minuten und der zweite etwa 4,5 Stunden nach Stimulation mit einem gustatorischen Reiz beobachtet werden (Montag-Sallaz *et al.*, 1999). Wenn Transkriptions- oder Translationshemmer zu diesen Zeitpunkten verabreicht werden, kann eine erfolgreiche Etablierung von Langzeitgedächtnis verhindert werden (Übersichtsartikel: Stork & Welzl, 1999; Igaz *et al.*, 2002). Die gezielte Störung der Proteinexpression von *arg3.1/arc* durch *antisense*-Oligonukleotide im Hippocampus kann zudem die Aufrechterhaltung einer LTP und die Konsolidierung räumlichen Gedächtnisses behindern (Guzowski *et al.*, 2000). Diverse Studien konnten nachweisen, daß die Expression von *arg3.1/arc* stimulationsabhängig reguliert wird, wobei ein wichtiger Faktor für die Expression der Neuigkeitscharakter des Stimulus oder der Trainingssituation ist (Montag-

Sallaz *et al.*, 1999; Guzowski *et al.*, 2001; Kelly & Deadwyler, 2002; Klebaur *et al.*, 2002; Montag-Sallaz & Buonviso, 2002).

### **2.2.1.2 Metabolische Kartierung mittels 2DG-Autoradiographie**

Ein Marker für metabolisch aktive Hirnregionen ist die  $^{14}\text{C}$ -2-Deoxyglukose (2DG) - Autoradiographie-Methode. Sokoloff hat diese Methode 1977 erstmals beschrieben (Sokoloff *et al.*, 1977). Dabei kann folgendes Prinzip ausgenutzt werden. Das Gehirn verbraucht, im Gegensatz zu vielen anderen Geweben, fast ausschließlich Glukose als Energielieferant. Die 2-Desoxyglukose kompetetiert mit Glukose und wird von Zellen im Gehirn in gleicher Weise aufgenommen. Dort werden beide Substrate von der Hexokinase durch Phosphorylierung in ihre Hexose-6-Phosphate umgewandelt. Während dann Glukose-6-Phosphat zu Fruktose-6-Phosphat und durch weitere enzymatische Schritte der Glykolyse zwecks Energiegewinnung verarbeitet wird, ist Desoxyglukose-6-Phosphat nicht metabolisierbar und reichert sich in aktiven Zellen an. Dies trifft zumindest für einen Zeitraum von 30 - 45 Minuten nach der Injektion zu. Durch radioaktive Markierung der 2-Desoxyglukose wird es unter Ausnutzung des beschriebenen Prinzips möglich, nach Exposition von Hirnschnitten auf einen radiosensitiven Film, Unterschiede in der 2DG-Anreicherung festzustellen. Filmschwärzungen der Autoradiogramme verdeutlichen Regionen mit erhöhter synaptischer Aktivität sowohl exzitatorischer als auch inhibitorischer Art (Dewar & McCulloch, 1992). Diese Methode kann simultan die Aktivität eines ganzen Gehirns während einer bestimmten Stimulation sichtbar machen, wobei nicht die Somata sondern die Regionen der Axonterminalien der aktiven Zellen markiert werden. Vielfach wurde diese Methode eingesetzt, um verschiedene physiologische und pathophysiologische Zustände des Gehirns z.B. von Katzen, Degus, Ratten oder Mäusen zu kartieren, wie nach olfaktorischer, akustischer und auditorischer Stimulation, epileptischen Anfällen oder Applikation von Rezeptor-Antagonisten (Royet *et al.*, 1987; Slotnik *et al.*, 1989; Dewar & McCulloch, 1992; White & Price, 1993; Braun & Scheich, 1997; Kearney *et al.*, 1997; Löwel, 2002).

### **2.2.1.3 Vergleich von IEG-Expression und 2DG-Autoradiographie**

Durch die parallele Anwendung dieser drei beschriebenen Marker können Unterschiede in der Aktivierung verschiedener Areale aufgezeigt werden. Wie schon vergleichende Studien zwischen *c-fos*-Expression und 2DG gezeigt haben, liefern diese beiden Kartierungsverfahren

zwar überlappende aber nicht identische Ergebnisse (White & Price, 1993; Kearney *et al.*, 1997; Duncan *et al.*, 1998; Gass, 1997). Auch der Vergleich der Expression von *c-fos* und *arg3.1/arc* hat zu unterschiedlichen Ergebnissen in der Aktivierung von Hirnarealen nach gustatorischer Stimulation geführt (Montag-Sallaz *et al.*, 1999). Da jeder dieser drei Marker einen anderen Aspekt zellulärer Aktivität bei Lernvorgängen sichtbar macht, *c-fos* (auf transkriptioneller Ebene) und *arg3.1/arc* (auf Effektorgen-Ebene) markieren die Soma bzw. Dendriten aktiver Zellen und 2DG aktive Axonterminalien, können im direkten Vergleich zusätzliche Informationen über die Art der Aktivierung der stimulierten Areale gewonnen werden. Da für die Induktion von sowohl *c-fos* als auch *arg3.1/arc* der Neuigkeitscharakter eines Stimulus von entscheidender Bedeutung ist, sind diese Marker besonders geeignet, Prozesse der Informationsverarbeitung neuer bzw. vertrauter Reize zu untersuchen.

### **2.2.2 Verhalten als Korrelat für Informationsverarbeitung**

Eine weitere Möglichkeit, die Informationsverarbeitung in Tieren zu überprüfen, ist die Durchführung von Verhaltensversuchen. Der Offenfeld-Test kann z.B. genutzt werden, die Reaktion von Tieren auf räumliche *Novelty* zu überprüfen. Dabei repräsentieren verschiedene Verhaltensparameter unterschiedliche Aspekte im Verhalten. Die Grundaktivität, wie die zurückgelegte Weglänge im Offenfeld, ist z.B. ein Maß für die Vertrautheit der Situation. Mit zunehmender Vertrautheit nimmt die Grundaktivität ab und man spricht von Habituation. Dagegen kann die Zeit, die ein Tier im Zentrum der Arena verbracht hat, Aussagen über den Angststatus des Tieres zulassen (File, 2001). Die Verhaltensantwort eines Tieres in einer standardisierten Situation kann somit als Korrelat für Informationsverarbeitung bzw. Lernen und Gedächtnis genutzt werden und Verhaltensabweichungen ein Hinweis auf Veränderungen von Informationsverarbeitungsprozessen sein (van der Staay & Steckler, 2001).

### **2.3 Lernrelevante Areale des Gehirns**

Lernvorgänge finden nicht in isolierten Neuronen statt, es handelt sich immer um Zellverbände die in zum Teil anatomisch-morphologischen aber auch funktionell distinkten Hirnarealen organisiert sind und über ihre Faserprojektionen miteinander kommunizieren. Durch Proteinsyntheseinhibition sowie funktionelle Inaktivierung konnte gezeigt werden, daß Regionen des limbischen Systems und neokortikale Areale für die Gedächtnisbildung entscheidend sind. Speziell die Amygdala, der Hippocampus oder der insulare Kortex wurden

als wichtige Elemente für mnemotische Prozesse beschrieben (Lorenzini *et al.*, 1999; Schafe & LeDoux, 2000). So konnten z.B. Nader *et al.* (2001) durch Läsionen der Amygdala die Aquisition einer konditionierten Angstreaktion in Ratten beeinträchtigen. Die Amygdala, aus diversen Subkernen aufgebaut, ist das zentrale Element des limbischen Systems. Viele Studien mit Angst-Konditionierungs-Versuchen und anderen aversiven Tests haben gezeigt, daß negative Emotionen in der Amygdala prozessiert werden (Übersichtsartikel: LeDoux, 2000). Doch mittlerweile setzt sich die Erkenntnis durch, daß in der Amygdala auch positive Emotionen, wie z.B. Freude, repräsentiert sind (Garavan *et al.*, 2001; Baxter & Murray, 2002). Über Projektionen zum Hippocampus, dessen CA3-Region als Integrator von Außenwelt und Innenwelt betrachtet werden kann (Lisman & Otmakhova, 2001), wird so eine Verbindung zwischen Affekt und Kognition erreicht. Durch die emotionale Bewertung oder Klassifizierung erhält der neue Reiz seine Bedeutung für den Organismus und erleichtert die Weiterverarbeitung der Information. Eine Läsion oder Fehlfunktion von Hippocampus oder Amygdala ist oftmals mit psychischen Erkrankungen und mentalen Verlusten verbunden (z.B. Schizophrenie, Amnesie).

Eine Studie von Montag-Sallaz *et al.* (1999) konnte zeigen, daß durch Stimulation mit einem neuen bzw. vertrauten Geschmack die Amygdala, der parietale Kortex, der Gyrus Dentatus und der cinguläre Kortex in der Maus in Abhängigkeit von der Vertrautheit des Reizes aktiviert werden und möglicherweise an der Erkennung von *Novelty* und assoziierten kognitiven Prozessen beteiligt sind. Somit stellen Elemente des limbischen Systems und neokortikale Areale ideale Strukturen für die Untersuchung plastizitätsrelevanter Ereignisse im Gehirn dar.

## 2.4 Zielsetzung der Arbeit

Neurale Zelladhäsionsmoleküle der L1-Familie und verwandte Moleküle sind für die Entwicklung des Gehirns von zentraler Bedeutung. Aber auch im adulten Gehirn scheinen sie eine wichtige Rolle für plastische Vorgänge wie zelluläre Regeneration nach Verletzungen, z.B. L1 (Chaisuksunt *et al.*, 2000), oder Lernen, z.B. NCAM und L1.1 (Pradel *et al.*, 1999; Pradel *et al.*, 2000), zu spielen. Über die Bedeutung von CHL1 *in vivo* war außer einigen Befunden aus Zellkulturexperimenten nicht viel bekannt. Die totale Deletion des Genproduktes führt in der kürzlich generierten konventionell CHL1-defizienten Maus zu morphologischen Defekten im Hippocampus und im olfaktorischen Bulbus, die auf ein fehlerhaftes Zielfinden von Axonen zurückzuführen sind. Zusätzlich zeigen diese Tiere ein verändertes Explorationsverhalten in neuen Habitaten, was eine veränderte Informationsverarbeitung in CHL1-defizienten Tieren vermuten läßt.

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, welche Auswirkungen eine CHL1-Defizienz auf Prozesse der Informationsverarbeitung in der Maus hat. Zum einen wurden Versuche zum Erkennen und Erinnern neuer (*Novelty*) bzw. vertrauter Reize durchgeführt. In der *Taste-Novelty* wurde durch nichtradioaktive *in situ*-Hybridisierungstechniken und metabolische Kartierung die Ausprägung plastizitätsrelevanter Ereignisse in CHL1-defizienten Tieren erfaßt. Außerdem wurden der Offenfeld-Lochbrett-Test und ein Geruchs-Kennenlern-Test etabliert und angewandt. Zur Überprüfung der Funktionalität von Amygdala und Hippocampus wurde mittels Angst-Konditionierung das Angst-verarbeitende System untersucht. Zusätzlich wurde mit dem Heiße-Platte-Analgesie-Test die Schmerzrezeption CHL1-defizienter Tiere kontrolliert. Da im konventionellen *knock-out*-Organismus Kompensationseffekte oder andere Seiteneffekte auftreten können, wurden zusätzlich *loxP*-Cre-Rekombinase Linien untersucht. So wurden im zweiten Teil dieser Arbeit per PCR, Western-Blot und Immunhistochemie die induzierbaren CHL1-Linien hinsichtlich des Vorkommens bzw. des Fehlens von CHL1 charakterisiert. Des weiteren sollte, wie für den konventionellen CHL1-*knock-out*, die Hirnmorphologie der durch eine konstitutiv aktive Cre-Rekombinase erzeugten CHL1-defizienten Tiere überprüft werden. Dazu wurden immunhistochemische Färbemethoden eingesetzt. Mittels induzierbarer CHL1-defizienter Tiere sollte es möglich sein, die Ergebnisse der Analyse der konventionellen CHL1-defizienten Mäuse zu ergänzen.

Die Ergebnisanalyse sowohl der konventionellen als auch der induzierbar CHL1-defizienten Tiere sollte die Frage beantworten, welche Auswirkungen eine permanente CHL1-Defizienz auf die Morphologie und Informationsverarbeitung des Gehirns von Mäusen hat.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in der Qualität pro analysis (p.a.) eingesetzt und von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Boehringer/Roche (Mannheim), Fluka (Steinheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Spezielle Chemikalien und verwendete Lösungen werden am Anfang jeder Methodenbeschreibung genannt. Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt.

##### 3.1.2 Kits und Enzyme

Produkt	Hersteller
100 bp DNA Ladder, <i>extended</i>	Roth, Karlsruhe
DIG-RNA-Labeling Mix	Boehringer/Roche, Mannheim
diverse Restriktionsenzyme	Boehringer/Roche, Mannheim; New England Biolabs, Frankfurt
DNA Sequenzing Kit	Amersham, Freiburg
dNTP Set	Amersham, Freiburg
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
High-Prime-Kit	Boehringer/Roche, Mannheim
Lambda DNA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
ProteinaseK Solution	Boehringer/Roche, Mannheim
Qiaex II Gelextraktions-Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Nukleotid-Removal Kit	Qiagen, Hilden
Rapid DNA-Ligation Kit	Boehringer/Roche, Mannheim
Sigma Fast™ 3,3'-Diaminobenzidine-Tablet-Sets	Sigma, Steinheim
SP6-RNA-Polymerase	Boehringer/Roche, Mannheim
T7-RNA-Polymerase	Boehringer/Roche, Mannheim
<i>Taq</i> PCR Core Kit	Qiagen, Hilden
Vectastain® Elite ABC Kit	Alexis, San Diego, USA

### 3.1.3 Standardlösungen

<u>LB-Medium:</u>	10 % Bacto-Trypton; 5 % Bacto-Hefe-Extrakt; 5 % NaCl
<u>LB-Platten:</u>	15 % Agar in LB-Medium
<u>DEPC-H<sub>2</sub>O:</u>	0,1 % Diethylpyrocarbonat in H <sub>2</sub> O; autoklaviert; RNase-frei
<u>50 x Denhardt's:</u>	1 % BSA; 1 % Ficoll; 1 % PVP (Polyvinylpyrrolidin)
<u>20 x SSC:</u>	3 M NaCl; 0,3 M tri-NaCitrat; pH 6,3
<u>50 x TAE:</u>	2 M Tris-Acetat; 0,05 M EDTA
<u>10 x TBS:</u>	1,5 M NaCl; 0,2 M Tris-HCl pH 7,6
<u>10 x PBS:</u>	1,5 M NaCl; 16 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O; 80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O; pH 7,4

### 3.1.4 PCR-Primer

Primer für die PCR wurden von der Firma MWG-Biotech AG (High Point, NC, USA) nach gewünschter Nukleotidabfolge synthetisiert und lyophilisiert geliefert. Unter Zugabe von destilliertem Wasser wurde eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt.

### 3.1.5 Antikörper

#### 3.1.5.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
anti-Synaptophysin	Maus, monoklonal	IHC: 1:200	Sigma, Steinheim
anti-CHL1: Ig 1851	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:10000	Dr. D. Montag
Lectin from <i>D. biflorus</i> ; Biotin-gekoppelt	<i>Dolichos biflorus</i>	IHC: 20 μg/ml	Sigma, Steinheim
anti-CHL1: Peptid 1-16	Kaninchen, polyklonal	IHC: 1:1000 WB: 1:5000	Dr. D. Montag*

IHC: Immunhistochemie

WB: Western-Blot

\*Pineda

Die Aminosäuresequenz des Peptids zur Herstellung des Antikörpers „anti-CHL1: Peptid 1-16“ lautet wie folgt: NH<sub>2</sub>-CRSHASLPSDHHETPPAAPDK-CONH<sub>2</sub>

### 3.1.5.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
anti-Digoxigenin-AP (Fab-Fragmente)	Schaf, polyklonal	ISH: 1:500	Boehringer/Roche, Mannheim
anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	Ziege, polyklonal	WB: 1:10000	Dianova, Hamburg
anti-Kaninchen IgG, Biotin-gekoppelt	Ziege, polyklonal	IHC: 1:200	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
anti-Maus IgG, Biotin-gekoppelt	Ziege, polyklonal	IHC: 1:200	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

ISH: *In situ*-Hybridisierung

IHC: Immunhistochemie

WB: Western-Blot

### 3.1.6 Versuchstiere

Die Versuchstiere der Art Hausmaus (*Mus musculus domesticus*) wurden in Gruppen im hauseigenen Tierstall unter Standardbedingungen gehalten und gezüchtet (Raumtemperatur 22 °C, Luftfeuchtigkeit 50 – 55 %). Der Tag-Nacht-Rhythmus entsprach 12:12 h (6 Uhr Licht an). Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Etwa 4 Wochen nach der Geburt erfolgte die Bestimmung des Genotyps mittels DNA-Isolierung aus einer Schwanzbiopsie und anschließender Southern-Blot Analyse bzw. PCR.

#### 3.1.6.1 Konventionelle CHL1-knock-out-Tiere

Die von Montag-Sallaz *et al.* (2002) kürzlich beschriebenen CHL1-defizienten Mäuse wurden kongen auf den Stamm C57BL/6 (Charles River) zurück gekreuzt und befinden sich in Generation F10. Alle Versuchstiere hatten bei Versuchsbeginn ein Alter von 3 - 6 Monaten soweit nicht anders angegeben. Eine Woche vor Beginn von Verhaltenstests wurden die Tiere in Einzelkäfige gesetzt und in separaten Haltungsräumen adaptiert. Nach Abschluß aller Versuche wurde der Genotyp der Mäuse nochmals überprüft und bei Diskrepanzen jene Tiere aus den Analysen ausgeschlossen. Für Versuche wurden nur Tiere eingesetzt, die homozygot für die Mutation im CHL1-Gen waren. Die entsprechenden Kontrolltiere waren Geschwistertiere, die homozygot das Wildtypallel von CHL1 besaßen.

### 3.1.6.2 Konditionelle CHL1-knock-out-Tiere (*loxP*-Cre-Rekombinase System)

Zur Gewinnung konditioneller CHL1-defizienter Tiere wurden drei Zuchtlinie miteinander verpaart. Eine Zuchtlinie trug zwei *loxP*-Elemente in Intronbereichen des CHL1-Gens. Diese *loxP*-Elemente flankierten das Start-Exon (**Abb. 3**).



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Startregion des CHL1-Gens

Das Exon mit der Start-Sequenz wird von Intronbereichen flankiert. In der *loxP*-Zuchtlinie sind von Dr. D. Montag an den eingezeichneten Schnittstellen für *SpeI* und *HindIII* *loxP*-Elemente in gleicher Orientierung eingefügt worden.

Zwei weitere Zuchtlinien trugen im Genom entweder die CMV-Cre-Rekombinase (Nagy, 2000) oder die CMV-CreER<sup>T</sup>-Rekombinase (Brocard *et al.*, 1997). Als Versuchstiere wurden Tiere der F1-Generation aus Verpaarungen der *loxP*-Linie mit jeweils einer der Cre-Rekombinase-Linien verwendet. Tiere der F1-Generation trugen ausschließlich homozygot das geloxte CHL1-Gen oder zusätzlich die Cre-Rekombinase. Als Kontrollen wurden außerdem Tiere eingesetzt, die lediglich die Cre-Rekombinase trugen.

### 3.1.6.3 Induktion der ligandenabhängigen CMV-CreER<sup>T</sup>-Rekombinase

Tamoxifenlösung: 10 mg/ml Tamoxifen (freie Base, Sigma) in Sonnenblumenöl

Zur Induktion der ligandenabhängigen CMV-CreER<sup>T</sup>-Rekombinase wurde Tamoxifen eingesetzt. Das Tamoxifen wurde in einer Konzentration von 200 mg/ml in absolutem Ethanol durch starkes Schütteln gelöst. Das Sonnenblumenöl wurde bei 121 °C und 0,5 atm in einer Flasche mit nur leicht geöffnetem Deckel autoklaviert. Bei diesem Vorgang darf kein Wasser in das Öl gelangen. Das klare Sonnenblumenöl wurde dann mit der Tamoxifen-Ethanol-Lösung zu einer finalen Tamoxifenkonzentration von 10 mg/ml gemischt. Zur besseren Homogenisierung wurde die Mischung sonifiziert. Die Induktion der ligandenabhängigen CMV-CreER<sup>T</sup>-Rekombinase erfolgte durch intraperitoneale Injektionen der Tamoxifenlösung. Dabei wurde an fünf aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 1 mg Tamoxifen pro Tier verabreicht. Als Versuchstiere wurden Tamoxifen-induzierte und Vehikel-induzierte (Sonnenblumenöl) Tiere eingesetzt.

## 3.2 Methoden

Bei den verwendeten Methoden handelt es sich zum überwiegenden Teil um Standardmethoden (z.B.: Sambrook *et al.*, 1989; Crawley, 2000). Deswegen werden diese Methoden nur kurz beschrieben. Bei Neuentwicklungen oder Modifikationen erfolgt eine ausführlichere Beschreibung.

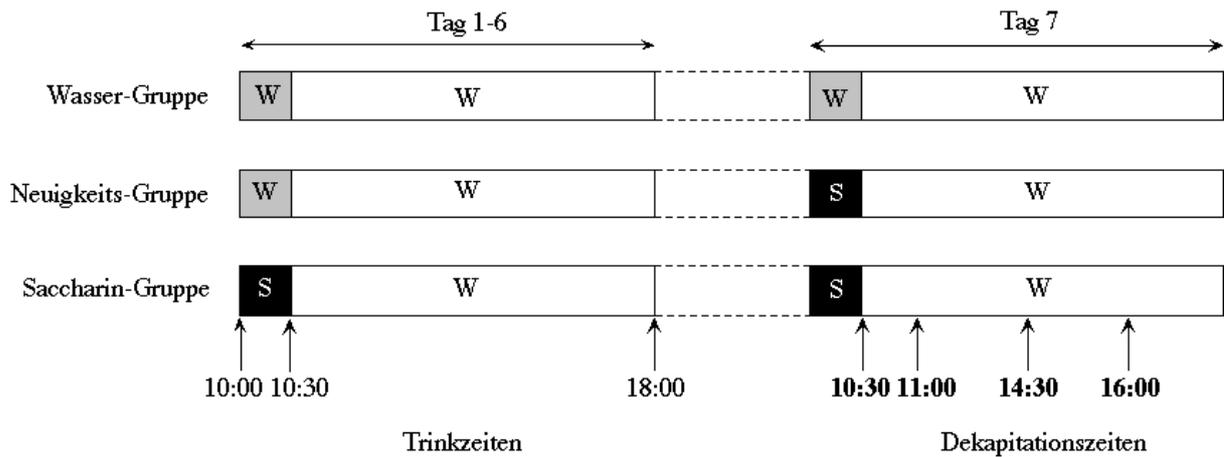
### 3.2.1 Verhaltensbiologische Methoden

Alle Versuche wurden ohne Wissen um den genetischen Hintergrund der Tiere während der Hellphase des Tages durchgeführt. Erst nach Aufnahme aller Daten wurde die Gruppenzuordnung der Tiere für die weitere statistische Auswertung mit Statview 4.0 (Abacus Concept, Inc.) vorgenommen. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

#### 3.2.1.1 Taste-Novelty-Paradigma

Saccharinlösung: 0,5 % Saccharin-Natrium-Salz in Leitungswasser (C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>SNa, Sigma)

Die Versuchstiere hatten an jedem der 7 Versuchstage von 10:00 - 18:00 Uhr freien Zugang zu Trinklösungen. Während alle Tiere von 10:30 bis 18:00 Uhr Wasser erhielten, unterschieden sich die drei Versuchsgruppen hinsichtlich der Flüssigkeit, die ihnen von 10:00 - 10:30 Uhr in ihrem Heimkäfig präsentiert wurde (**Abb. 4**). Innerhalb dieses Zeitraums erhielt die erste Gruppe, die Wasser-Gruppe (ww), an allen sieben Versuchstagen Wasser. Die zweite Gruppe, die Saccharin-Gruppe (ss), bekam an allen Tagen Saccharin. Lediglich die dritte Gruppe, die Neuigkeits-Gruppe (ws), erhielt von Tag eins bis sechs Wasser und am letzten Tag eine Saccharinlösung zu trinken. Die Trinkmenge wurde durch Wiegen der Flaschen vor und nach der täglichen Exposition ermittelt (zwischen 1,5 - 1,6 ml pro Tag). Am letzten Versuchstag wurden die Tiere zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Trinkperiode dekapitiert und die Gehirne entnommen (0,5 h, 1,0 h, 4,5 h und 6,0 h; **Abb. 4**). Für die *in situ*-Hybridisierung wurden 54 CHL1-defiziente Tiere und 54 Wildtyp-Geschwister und für die 2DG-Autoradiographie 26 CHL1-/- und 27 Wildtyp-Geschwister in diesem Paradigma stimuliert.



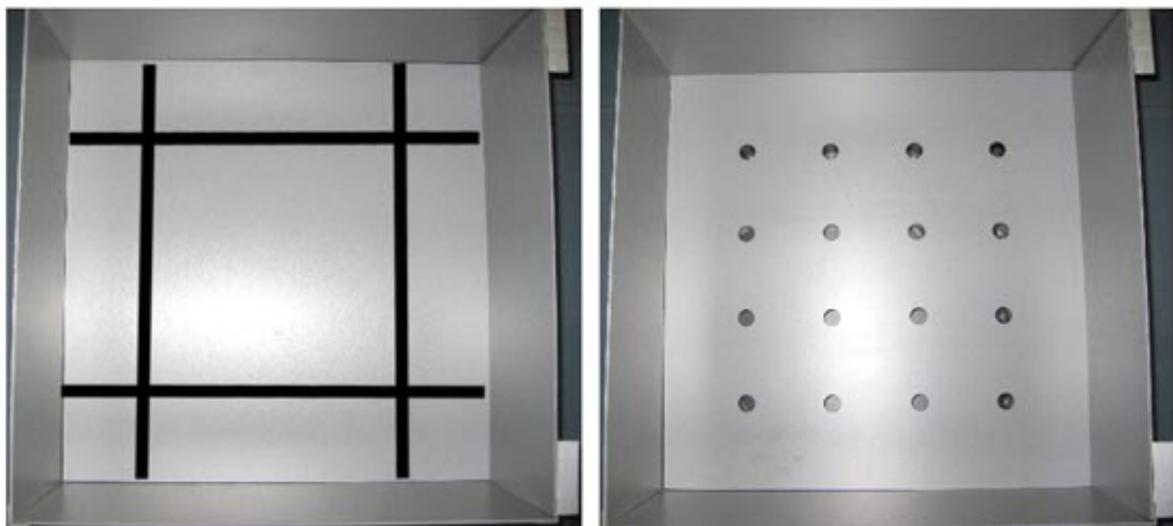
**Abb. 4:** Die Abbildung zeigt das Stimulations-Schema des *Taste-Novelty-Paradigmas*

Es ist angegeben, wann die Tiere Zugang zu welchen Trinklösungen hatten. Für den letzten Versuchstag werden die Dekapitationszeiten genannt. W – Leitungswasser, S – Saccharin

Die weitere Behandlung der Gehirne sowie die Erhebung und Auswertung der Daten ist in den Abschnitten 3.2.2.1 bis 3.2.2.6 beschrieben.

### 3.2.1.2 Offenfeld-Lochbrett-Test

Es wurden 10 CHL1-defiziente und 12 Wildtyp-Tiere eine Stunde vor Versuchsbeginn mit ihren Käfigen zur Adaption in den Versuchsraum gebracht. Das Offenfeld ist eine quadratische Box (50 x 50 cm Kantenlänge, 25 cm Kantenhöhe) (**Abb. 5**).



**Abb. 5:** Fotografische Aufnahme des Offenfeldes (linkes Bild) sowie des Lochbretts (rechtes Bild)

Im Foto der Offenfeld-Box ist die für die Verhaltensanalyse virtuelle Unterteilung der Versuchsfläche in Ecken, Seiten und Mittelfeld schematisch eingezeichnet.

Das Lochbrett entspricht dem Offenfeld, allerdings sind in die Bodenplatte 16 Löcher (ø 2 cm) im Abstand von 10 cm zueinander eingelassen (**Abb. 5**). Die Lichtstärke in der Box

betrug zwischen 170 Lux in der Mitte und etwa 160 Lux in den Ecken. Die Tiere wurden in der Mitte der Box abgesetzt und konnten diese für 15 min frei explorieren. Der Versuch dauerte sechs Tage (drei Tage Offenfeld, drei Tage Lochbrett). Das Verhalten der Versuchstiere wurden mit einer VHS Videokamera aufgezeichnet. Die Videobänder wurden mittels des VideoMot 2 Systems (TSE, Bad Homburg) ausgewertet, wobei die Software zurückgelegte Weglängen, Zeiten und den Aufenthalt in bestimmten Zonen erfaßt hat. Das Offenfeld-Lochbrett wurde dazu virtuell in Mittelfeld (Quadrat 30 x 30 cm), Seiten ohne Ecken (10 x 30 cm) sowie Ecken (10 x 10 cm) unterteilt (**Abb. 5**). Zusätzlich sind die Videobänder hinsichtlich Anzahl und Dauer typischer Verhaltensmuster ausgewertet worden. Dazu zählten freies Aufrichten, Aufrichten an der Wand, Putzen, Putzen an der Wand, Defäkation und Springen sowie Anzahl der Besuche der Löcher. Die Mittelwerte wurden zwischen den Gruppen verglichen und mit einer ANOVA (Genotyp und Tag als Faktoren) statistisch ausgewertet.

### 3.2.1.3 Geruchs-Kennenlern-Test

Isoamylacetat:  $C_7H_{14}O_2$  (Gemisch von 2- und 3-Methylbutylacetat, Merck)

Cyclohexanon:  $C_6H_{10}O$  (Merck)

Für diesen Test wurden 5 CHL1-/- und 6 Wildtypen eine Stunde vor Beginn in den Versuchsraum gebracht. In speziellen Boxen mit einer Tür aus Plexiglas wurden die Tiere in ihrem Heimkäfig auf eine Motilitätsplattform (TSE, Bad Homburg) gesetzt (**Abb. 6**). Der gesamte Versuch wurde an zehn aufeinander folgenden Tagen auf VHS-Kassette aufgenommen und die motorische Aktivität der Tiere per Motilitätsplattform aufgezeichnet. Für die Geruchsstimulation wurde ein Falcon-Röhrchen mit Löchern im Deckel über jedem Mausekäfig in eine spezielle Halterung gegeben und für 30 min dort belassen, so daß die Maus keinen direkten Kontakt zur Geruchsquelle hatte. Von Tag eins bis drei befand sich in dem Falconröhrchen ein leeres Stück Filterpapier. Diese drei Tage dienten zur Habituation der Tiere an den Versuchsablauf. Vom vierten bis zum neunten Tag wurde ein Filterpapier mit 1 µl Cyclohexanon (Amaretto-Mandel-Geruch) präpariert. Am letzten Tag wurde dann 1 µl Isoamylacetat (fruchtiger-Bananen-Geruch) auf das Filterpapier gegeben. Ausgewertet wurde, wie oft die Tiere in Richtung der Geruchsquelle geschnüffelt haben.



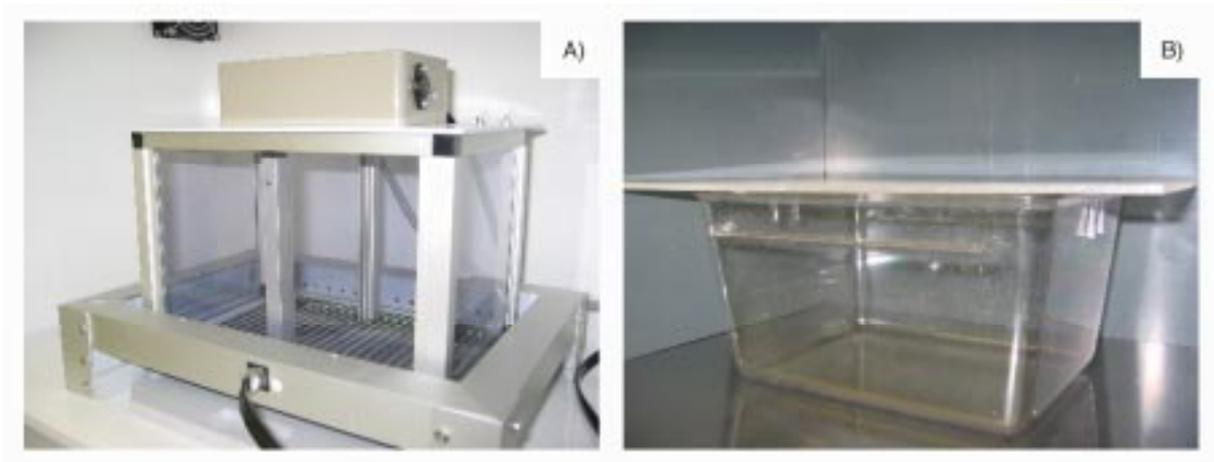
**Abb. 6: Box für die Geruchsstimulation einer Maus in ihrem Heimkäfig**

Der Geruchsstoff wurde in einem Falcon-Röhrchen in der linken vorderen Ecke über dem Käfig platziert. Die Bewegungen des Tieres während der Stimulation wurden mit einer Mobilitätsplattform (TSE) registriert.

Die Reaktion der Tiere auf die Geruchsstimulation wurde quantifiziert und statistisch ausgewertet. Dazu wurden die Mittelwerte mit einer Varianzanalyse (ANOVA) mit den Faktoren Genotyp und Sitzung ausgewertet.

#### 3.2.1.4 Angst-Konditionierung

Die 10 Wildtypen und 9 CHL1-defizienten Tiere wurden am ersten Tag der Angst-Konditionierung einmal vormittags und einmal nachmittags zur Habituation in den neutralen Kontext gesetzt. Dieser bestand aus einem dem Heimkäfig entsprechenden leeren Macrolon-Käfig mit einem Plexiglas-Deckel in einer grauen Überbox bei normaler Beleuchtung (**Abb. 7: Bild B**). Am zweiten Tag fand die Konditionierung im Schock-Kontext statt. Dabei handelte es sich um eine *Shuttle-Box* (TSE, Bad Homburg) ohne Trennwand mit laufender Lüftung und gedämpfter Beleuchtung (**Abb. 7: Bild A**). Nach einer 2minütigen Habituation in der Box wurde den Tieren dreimal für 10 s ein 75 dB Sinus-Ton präsentiert (konditionierter Stimulus: CS). In der letzten Sekunde der Tonpräsentation wurde als unconditionierter aversiver Stimulus (US) ein 0,7 mA starker Fußreiz über das Metallgitter gegeben. Das Interstimulusintervall betrug 1 min. Am Tag drei der Versuchsreihe wurde das Tier für 2 min wieder in den neutralen Kontext (leerer Käfig, helle Beleuchtung) gesetzt und dann die Reaktion auf den CS erfaßt. Der Ton wurde dazu zweimal für 30 s mit 30 s Pause präsentiert. Am vierten Versuchstag wurde dann die Reaktion der Tiere auf den Schock-Kontext (2 min, *Shuttle-Box*) überprüft.



**Abb. 7: Darstellung der Versuchsanordnung für die Angst-Konditionierung**

Die Beleuchtungsverhältnisse entsprechen nicht den Versuchsbedingungen. A) Schock-Kontext: Foto einer *Shuttle-Box* ohne Trennwand zwischen den Kompartimenten (TSE), wie sie für die Angst-Konditionierung eingesetzt wurde. B) Neutraler-Kontext: Foto des Käfigs, wie er zur Habituation und zum Test der *Freezing*-Reaktion auf den CS-Stimulus benutzt wurde.

Das Verhalten der Tiere wurde auf VHS aufgenommen und dann ausgewertet. Es wurde ermittelt, wie lange die Tiere in einem bestimmten Zeitraum auf den Stimulus hin eine Angststarre (*freezing*) von mindestens 3 s gezeigt haben. Angststarre ist das Fehlen jeglicher Bewegung eines Tieres außer der Atmung. Die Zeiten der Angststarre wurden mit einer Stoppuhr erfaßt und in Prozent der Gesamtzeit angegeben. Mit einer ANOVA (Faktoren: Genotyp und Sitzung) wurden die Ergebnisse statistisch ausgewertet.

### 3.2.1.5 Heiße-Platte-Analgesie-Test

Für die Überprüfung der Schmerzrezeption wurde der Heiße-Platte-Analgesie-Test in einer entsprechenden Apparatur (TSE, Bad Homburg) durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Heizplatte mit einem Plexiglaszylinder, die auf 0,1 °C genau die gewählte Temperatur hält und mit einem PC verbunden ist. Das Versuchstier wurde auf der Heizplatte abgesetzt und der Versuch gleichzeitig über einen Fußschalter gestartet. Da im Vortest die in der Literatur beschriebene klassische Reaktion, Heben und Lecken der Hinterfüße, sich in keinem Fall in einem ethisch vertretbaren Zeitraum zeigte, dafür aber Tänzeln mit oder Heben der Hinterfüße, wurden diese Reaktionen als spezifisch erfaßt. Sobald die Maus eine Reaktion zeigte, wurde über den Fußschalter die Uhr gestoppt und die Maus sofort von der Platte entfernt. Spätestens nach 30 s wurde der Test vom Versuchsleiter beendet, um Gewebeschäden zu vermeiden. In einem Vortest wurde mit C57 Wildtyp-Tieren eine Temperatur von 56,5 °C ermittelt. Bei dieser Temperatur zeigten die Tiere im Schnitt nach ca. 9 s die erwartete Reaktion. Der gesamte Versuch wurde zusätzlich auf VHS aufgezeichnet.

Bei der Versuchsgruppe handelte es sich um die selben Tiere, mit denen die Angst-Konditionierung durchgeführt wurde. Der Mittelwert der Latenzzeiten wurde zwischen den 8 CHL1-defizienten Tieren und den 10 Wildtyp-Geschwistern verglichen. Für die statistische Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt.

### 3.2.2 Histologisch-morphologische Methoden

#### 3.2.2.1 *in situ*-Hybridisierung (ISH)

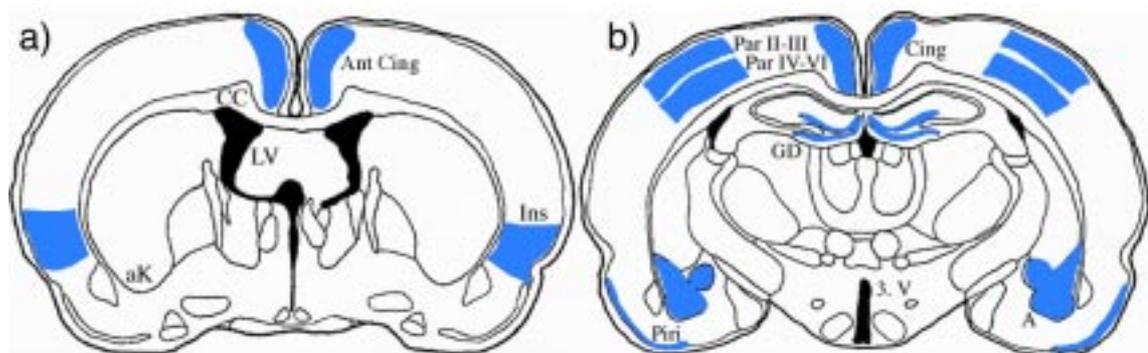
<u>Fixierlösung:</u>	4 % Paraformaldehyd in PBS; pH 7,2
<u>MBM:</u>	0,1M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,5; 1 % Blocking Reagent (Boehringer); 0,5 % BSA (Rinder-Serum-Albumin Fraktion V, Merck)
<u>P<sub>1</sub>-Dig:</u>	0,1 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,5
<u>P<sub>3</sub>-Dig:</u>	0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl <sub>2</sub> ; pH 9,5
<u>P<sub>4</sub>-Dig:</u>	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0
<u>Prähybridisierungslösung:</u>	2,5 x Denhardts-Lösung; 25 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,25 mg/ml tRNA (Hefe tRNA, Boehringer); 20 mM NaCl; 50 % Formamid
<u>Hybridisierungslösung:</u>	20 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 1x Denhardts-Lösung; 0,5 mg/ml tRNA; 0,1 mg/ml Polyadenylic Acid (Poly A, Sigma); 0,33 M NaCl; 0,1 M Dithiothreitol (DTT); 10 % Dextran-Sulfat; 50 % Formamid
<u>Entwicklungspuffer:</u>	P <sub>3</sub> Dig; 0,34 mg/ml 4-Nitroblue Tetrazoliumchlorid (NBT, Boehringer, Mannheim); 0,175 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP, Boehringer.); 0,25 mg/ml Levamisol (Sigma)

Die Versuchstiere wurden dekapitiert und die entnommenen Gehirne in  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  kaltem 2-Methylbutan (Roth) eingefroren. In einem motorisierten Cryostat (Leica, Wetzlar) wurden bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$   $14\text{ }\mu\text{m}$  dicke Hirnschnitte angefertigt und auf Objektträger gezogen. Die Objektträger waren mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (Sigma) beschichtet, um die Haftung der Schnitte zu gewährleisten. Zur Vorbereitung wurde das Gewebe mindestens 30 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Fixierlösung und anschließend mehrmals in PBS gebadet. Nach 5 min in 70 % Ethanol wurden die Objektträger zweimal 10 min in destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Permeabilisierung der Membranen wurden die Schnitte 5 min in 0,1 M HCl belassen. Nach mehrmaligem Spülen in PBS wurden die Objektträger 20 min in 0,1 M Triethanolamin pH 8,0/0,25 % Essigsäureanhydrid inkubiert. In aufsteigender Alkoholkonzentration wurde das Gewebe dehydriert und anschließend getrocknet. Nach dem Trocknen der Objektträger wurden die Schnitte für drei Stunden bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Prähybridisierungslösung inkubiert und anschließend in Hybridisierungslösung mit einer Sondenkonzentration von 2 - 5  $\mu\text{l/ml}$  für 12 - 15 h bei  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  hybridisiert. Die Sonden wurden wie in Abschnitt 3.2.3.10 beschrieben synthetisiert. Danach wurden die Schnitte zweimal 30 min mit 0,2 x SSC und dann dreimal

90 min mit 0,1 x SSC/50 % Formamid bei 55 °C gewaschen, um überschüssige und unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen. Anschließend wurden die Objektträger je 10 min in 0,2 x SSC und daraufhin in P<sub>1</sub>Dig bei Raumtemperatur (RT) gewaschen. Nach 30 min Blockieren in MBM erfolgte die Inkubation mit den Anti-Digoxigenin-AP-Fab-Fragmenten (1:500 in MBM) über Nacht bei 4 °C. Die Objektträger wurden dann zweimal 15 min mit P<sub>1</sub>Dig und 5 min mit P<sub>3</sub>Dig gewaschen. Die Farbentwicklung mit Entwicklungspuffer erfolgte im Dunkeln bei RT und wurde durch 15 min waschen in P<sub>4</sub>Dig gestoppt. Mit Fluoromount (Serva, Heidelberg) wurden die Schnitte eingebettet.

### 3.2.2.2 Auswertung der ISH

Die nicht-radioaktive ISH für *c-fos* und *arg3.1/arc* wurde durch Bestimmen der Anzahl gefärbter Zellen in verschiedenen limbischen und neokortikalen Arealen ausgewertet. Dazu wurden Hirnschnitte 0,34 mm (insularer Kortex, anteriorer cingulärer Kortex) und 1,82 mm caudal vom Bregma (posteriorer cingulärer Kortex, Gyrus Dentatus, parietaler Kortex, piriformer oder primär olfaktorischer Kortex, Amygdala) genommen (**Abb. 8**).



**Abb. 8 Schematische Darstellung der untersuchten Hirnareale**

Es wurden Hirnschnitte 0,34 mm (Bild a) und 1,82 mm (Bild b) caudal vom Bregma angefertigt. Auf diesen Schnitten wurde die Dichte der gefärbten Zellen in den Arealen anteriorer cingulärer Kortex (Ant Cing), insularer Kortex (Ins), posteriorer cingulärer Kortex (Cing), parietaler Kortex Schichten II-III (Par II-III) sowie Schichten IV-VI (Par IV-VI), Gyrus Dentatus (GD), piriformer Kortex (Piri) sowie in der Amygdala (A) bestimmt. (3. V - dritter Ventrikel, LV - lateraler Ventrikel, CC - Corpus Callosum oder Balken, aK - anteriore Kommissur)

Die Unterscheidung der verschiedenen Hirnregionen erfolgte nach dem Atlas von Paxinos & Franklin (2001). Unter Zuhilfenahme eines Mikroskops (Zeiss, Jena), ausgerüstet mit einem Neurolucida-System (Neurolucida, BioMetric Systems, Germany), wurde die Größe der definierten Areale ermittelt und die Anzahl der markierten Zellen erfaßt. Für jedes Tier wurden 4 Hirnschnitte ausgezählt und der Mittelwert markierter Zellen /mm<sup>2</sup> je Areal

bestimmt. Die Gruppenmittelwerte wurden wie in Abschnitt 3.2.2.5 beschrieben statistisch ausgewertet.

### 3.2.2.3 2-Deoxy-D-[1-<sup>14</sup>C]-Glukose Autoradiographie

Die Versuchstiere erhielten eine intraperitoneale Injektion von 2-Deoxy-D-[1-<sup>14</sup>C]-Glukose (2DG; Amersham Pharmacia, Freiburg) in physiologischer NaCl-Lösung (0,9 %, B.Braun, Melsungen) mit einer Konzentration von 0,17 µCi pro Gramm Körpergewicht. 30 min nach der Injektion wurden die Tiere dekapitiert, die Gehirne entnommen und in -40 °C kaltem 2-Methylbutan eingefroren. Von den Gehirnen wurden in einem motorisierten Cryostat (Leica, Wetzlar) bei -18 °C Frontalschnitte mit 14 µm Dicke angefertigt und auf Objektträger gezogen. Diese sind dann getrocknet und auf Hyperfilm-β-Max (Kodak, Rochester, NY, USA) für 8 Tage in einer Hypercassette™ (Amersham, Freiburg) exponiert worden. Die Filme wurden mit Entwickler D-19 (Kodak) und Hypam Schnellfixierer (Ilford Photo, Dreieich) nach Herstellerangaben manuell entwickelt. Nach Entwicklung und Auswertung der Autoradiogramme wurden die Gewebeschnitte mit Hämatoxilin gefärbt (Abschnitt 3.2.2.6) und in Entellan (Merck) eingebettet.

### 3.2.2.4 Auswertung der Autoradiogramme

Mit einem Arcus-II-Scanner (AGFA, Leverkusen) wurden die 2DG-Autoradiogramme digitalisiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software NIH Image 1,62b7 (NIH, Bethesda, USA). Unkalibrierte optische Dichten der gleichen limbischen und neokortikalen Hirnregionen wie in der ISH (siehe **Abb. 8**) wurden bestimmt und gegen die optische Dichte des Corpus Callosum als Referenz abgeglichen, um Variationen durch Filmhintergrund zu eliminieren. Die dadurch gewonnene relative optische Dichte (ROD) für jedes Areal wurde zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen verglichen.

### 3.2.2.5 Statistische Auswertung

Die Daten aus der ISH und 2DG-Studie wurden mittels einer 3-Wege-ANOVA (Statview 4.0, Abacus Concept, Inc.) mit Trinklösung (Trinklösung: ww, ss, ws), Zeit nach Stimulation (Zeitpunkt: 0,5 h; 1 h; 4,5 h; 6 h) sowie Genotyp (Wildtyp-Geschwister, CHL1/-

Geschwister) als Faktoren analysiert. Der Vergleich der Mittelwerte wurde als *post-hoc*-Test verwendet (Scheffe's *post-hoc*-Test).

### 3.2.2.6 Neutralrot- bzw. Hämatoxin-Färbung

<u>Neutralrot:</u>	1 % Neutralrot in H <sub>2</sub> O (Fluka)
<u>Hämatoxin:</u>	Hämatoxin-Lösung nach Mayer (Fluka)

Die Objektträger wurden 2 - 10 min in der Färbelösung belassen. Die Hämatoxin-gefärbten Schnitte wurden 10 min unter fließendem Wasser und zweimal in destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend erfolgte das Entwässern der Gewebeschnitte in aufsteigender Alkoholkonzentration. Die Neutralrot gefärbten Schnitte wurden direkt aus der Färbelösung kommend in selbiger Alkoholreihe entwässert. Danach wurden sowohl die Hämatoxin- als auch die Neutralrot-gefärbten Schnitte zweimal in Xylol gewaschen und anschließend in Entellan (Merck) eingebettet.

### 3.2.2.7 Immunhistochemie (IHC)

<u>Chloralhydrat:</u>	7 % Chloralhydrat (Merck) in physiologischer Kochsalzlösung
<u>Fixierlösung:</u>	4 % Paraformaldehyd in PBS; pH 7,4
<u>Inkubationspuffer:</u>	0,25 % BSA (Roth); 0,4 % Triton X-100; 0,05 % NaN <sub>3</sub> in PBS
<u>Blockierpuffer:</u>	5 % BSA in PBS
<u>Sucroselösung:</u>	30 % Sucrose in PBS

Für die Immunhistochemie (IHC) wurden die Versuchstiere durch eine intraperitoneale Injektion mit Chloralhydrat betäubt und mittels einer peristaltischen Pumpe (Ecos, Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim) über die linke Herzkammer zuerst mit PBS und anschließend mit Fixierlösung (1 ml/g Körpergewicht) perfundiert.

Für die Synaptophysin-IHC wurde das Gehirn herauspräpariert und erneut in Fixierlösung 24 h fixiert und gelagert. Dann wurden mit einem Vibratom (Leica) 40 µm dicke Sagittalschnitte angefertigt und in PBS aufgefangen. Für die IHC mit dem CHL1-Antikörper bzw. Lectin wurde das Gewebe nach der Entnahme 3 - 4 h fixiert und dann über Nacht in Sucroselösung inkubiert. Diese gefriereschützten Gehirne wurden in -40 °C kaltem 2-Methylbutan eingefroren. In einem Cryostat wurden 40 µm dicke Schnitte angefertigt und ebenfalls in PBS aufgefangen.

Zur Entwässerung des Gewebes und Permeabilisierung der Membran sind die Schnitte 15 min in Methanol/PBS und 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt worden. Danach erfolgte mehrmaliges Waschen mit PBS. Nach 1 h in Blockierpuffer bei RT wurde der erste Antikörper in Inkubationspuffer für 24 - 48 h bei 4 °C appliziert. Für die Synaptophysin-IHC war zusätzlich 0,4 % Triton X-100 und 0,05 % NaN<sub>3</sub> im Inkubationspuffer. Anschließend erfolgte 1 h Inkubation mit dem Biotin-gekoppelten zweiten Antikörper in einer Verdünnung 1:200 in PBS. Des Weiteren wurden die Schnitte 1 h mit dem ABC-Komplex inkubiert (Vectastain® Elite ABC Kit). Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurde die Farbreaktion mit Diaminobenzidin durchgeführt. Dazu wurde das Sigma Fast™ DAB-Tablet-Set verwendet. Gestoppt wurde die Farbreaktion mit PBS. Nach dem Aufziehen auf SuperFrost® Plus Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) wurden die getrockneten Schnitte in aufsteigender Alkoholkonzentration entfettet und nach zweimaligem Spülen in Xylol mit Entellan eingebettet.

Für die Entwicklung des fluoreszenten Signals bei der Synaptophysin-IHC wurde nach der Inkubation mit dem Biotin-gekoppelten Zweitantikörper für 45 min CyTM3-gekoppeltes Streptavidin in PBS (1:100, Dianova, Hamburg) im Dunkeln appliziert. Nach Entfernen des Streptavidins wurden die Schnitte dreimal 10 min mit PBS gewaschen, auf Menzel-Gläser aufgezogen, getrocknet und mit Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA) eingebettet.

### 3.2.2.8 TIMMs-Färbung

<u>Fixierlösung:</u>	4 % Paraformaldehyd in PBS; pH 7,4
<u>Natrium-Sulfid-Lösung:</u>	24,37 mM Na <sub>2</sub> S; 43,11 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<u>Entwickler:</u>	0,12 M Citronensäure-Monohydrat; 0,08 M Na <sub>3</sub> -citrat (wasserfrei); 1,2 mM Gummi Arabikum; 0,15 M Hydrochinon; 0,05 M AgNO <sub>3</sub>

Für TIMMs-Färbung wurden die Versuchstiere wie für die Immunhistochemie betäubt und zuerst mit PBS, im Anschluß daran mit Natrium-Sulfid-Lösung (1 ml/g Körpergewicht) und zuletzt mit Fixierlösung perfundiert. Die Gehirne wurde herauspräpariert und für 48 h in Fixierlösung belassen, anschließend in 15 % Sucrose/PBS überführt und dort bis zum Absinken inkubiert. In -40 °C kaltem 2-Methylbutan wurden die Gehirne eingefroren, in einem Cryostat 20 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträgern gesammelt und auf einer Heizplatte bei 45 °C getrocknet.

Zur Vorbereitung auf die Reaktion wurden die Gewebeschnitte 15 min in 96 %igem Ethanol, je 2 min in absteigender Alkoholreihe gespült und mehrmals in destilliertem H<sub>2</sub>O rehydriert. Die Farbreaktion erfolgte in frisch angesetztem Entwickler für 45 - 90 min bei RT im

Dunkeln. Nach 30 min Spülen unter Leitungswasser wurden die Schnitte 20 min in Fixierlösung (Hypamfix, Ilford, UK) fixiert. Dann wurden die Objektträger 30 min in 70 % Ethanol gespült. Anschließend wurden die Schnitte wie in Abschnitt 3.2.2.6 beschrieben mit Neutralrot gegengefärbt und in Entellan eingebettet.

### 3.2.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.3.1 DNA-Isolierung aus Gewebe

TC-Puffer: 0,5 % SDS; 0,1 M NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA pH 8,0

Für die Genotypisierung der Versuchstiere wurde ein etwa 0,5 cm großes Stück vom Schwanz genommen und in 400 µl TC-Puffer mit 8,5 µl ProteinaseK-Lösung (> 600 Einheiten je ml, Roche, Mannheim) zwischen 12 - 18 h bei 65 °C inkubiert. Zur Entfernung lipophiler Moleküle und des SDS aus der Mischung wurden 75 µl 8 M K-acetat (SDS wird zu nahezu unlöslichem KDS) sowie 400 µl CHCl<sub>3</sub> hinzugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz für mindestens eine halbe Stunde bei 4 °C gekühlt, ehe die Phasen durch Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C getrennt wurden. Auf die wässrige Phase wurde das 2,5fache Volumen absoluter Ethanol (4 °C) gegeben, um die genomische DNA durch Ethanol-Präzipitation zu fällen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das DNA-Pellet nochmals mit 70 % Ethanol gereinigt und zentrifugiert. Die bei 37 °C getrocknete DNA wurde in 150 µl 1 mM Tris-HCl pH 7,0 mit 1 µl RNase A (100 µg/ml, Boehringer, Mannheim) resuspendiert und bei 4 °C gelagert. Aus Hirngewebe wurde DNA in gleicher Weise isoliert und in einem Volumen von 50 µl resuspendiert.

#### 3.2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Nachweisreaktion	Primer/Richtung	Sequenz
CHL1-loxP	CGF5 (vorwärts)	5'-AGA ATT CAT TGG ACT GGC TCA T-3'
CHL1-loxP	CGR3 (rückwärts)	5'-TAT ATA CCC ACC CGA ACA CAC A-3'
CreER <sup>T</sup>	TK139 (vorwärts)	5'-ATT TGC CTG CAT TAC CGG TC-3'
CreER <sup>T</sup>	TK141 (rückwärts)	5'-ATC AAC GTT TTC TTT TCG GA-3'

Für die PCR wurde ein *Master-Mix* mit Komponenten des *Taq* PCR Core Kit hergestellt, wobei sowohl die Komponenten als auch der Mix bei 4 °C gekühlt wurden. Die

Endkonzentration der Komponenten im Reaktionsgefäß betrug: 1 x Qiagen-PCR-Puffer, 1 x Q-Solution, 200  $\mu$ M von jedem Desoxynukleotidtriphosphat (dNTP), je 0,1 - 0,5  $\mu$ M vom Vorwärts-Primer und Rückwärts-Primer und 2,5 Einheiten *Taq*-Polymerase.

Für die *CHL1-loxP*-Nachweisreaktion wurden die Primer CGF5 und CGR3 verwendet. Zum Schluß wurde 0,5  $\mu$ l DNA, aus Hirnregionen oder einer Schwanzbiopsie, zum Gesamtreaktionsvolumen von 25  $\mu$ l hinzugegeben und die Reaktion in einer PCR-Maschine (Gene Amp® PCR-Systems, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Nach einem 3minütigen Denaturierungsschritt bei 94 °C folgten 45 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 94 °C, 45 s Primerannealing bei 57 °C sowie 1 min Extension bei 72 °C. Zum Schluß schloß sich noch ein Extensionsschritt von 7 min bei 72 °C an.

Für die CreER<sup>T</sup>-PCR wurden die Primer TK139 und TK141 verwendet. Die Reaktion fand unter folgenden Bedingungen statt. Nach 5minütigem Denaturieren bei 94 °C folgten 35 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 94 °C und 30 s Primerannealing bei 55 °C. Nach Ablauf der Zyklen erfolgte ein Extensionsschritt von 3 min bei 72 °C.

Für die Größenauffrennung der DNA wurden 2 %ige Agarosegele verwendet (siehe 3.2.3.5).

### 3.2.3.3 Southern-Blotting

Hybridisierungslösung: 5 x Denhardt, 5 x SSPE, 0,5 % SDS

Zur Bestimmung des Genotyps der konventionellen *CHL1-knock-out*-Mäuse wurden 43  $\mu$ l (circa 1,5  $\mu$ g) der genomischen DNA mit je 1  $\mu$ l der Enzyme *EcoRV* und *BamHI* (10 Einheiten/ $\mu$ l, Boehringer, Mannheim) bei 37 °C geschnitten. Mittels Gelelektrophorese wurde die DNA in einem 0,7 % Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt (siehe 3.2.3.5). Danach wurde das Gel in 0,25 M HCl denaturiert, mit 0,4 M NaOH neutralisiert und anschließend die DNA durch Vakuumtransfer (15 Hg; BioRad, München) auf eine Nylonmembran (Hybond<sup>TM</sup>-N+, Amersham, Mannheim) übertragen. Der Blot wurde in 2 x SSC gewaschen, bevor er zur Hybridisierung mit den  $\alpha^{32}$ P-markierten DNA-Sonden eingesetzt wurde. Dazu wurde der Blot mit 10 ml Hybridisierungslösung und 40  $\mu$ l Heringssperma-DNA (10 mg/ml) für eine halbe Stunde bei 65 °C prähybridisiert. Die Sonde wurde mit dem High-Prime-Kit laut Herstellerprotokoll mit  $\alpha^{32}$ P-dCTP (Amersham Pharmacia, Mannheim) radioaktiv markiert (Montag-Sallaz *et al.*, 2002). Danach wurden die nicht eingebauten Nukleotide mit dem Qiaquick Nukleotid-Removal Kit entfernt. Die Sonde wurde in 20 ml Hybridisierungslösung gegeben. Vor der Verwendung wurde die Hybridisierungslösung mit Sonde 10 min bei 100 °C gekocht und dann 10 min auf Eis gelegt,

um die Doppelstränge der DNA-Sonde zur Hybridisierung mit der blotgebundenen DNA zu trennen. Die Hybridisierung erfolgte bei 65 °C über Nacht. Danach wurden die Blots weiterhin bei 65 °C zweimal 30 min mit 2 x SSPE/0,1 % SDS; 30 min mit 1 x SSPE/0,1 % SDS und zweimal 30 min mit 0,1 x SSPE/ 0,1 % SDS gewaschen. In Saran-Folie verpackt wurden sie in Filmkassetten mit Verstärkerfolien auf BioMax-MS<sup>TM</sup>-Film (Kodak, Rochester, NY, USA) bei -70 °C exponiert. Die Filme wurden maschinell entwickelt (Curix 60, AGFA, Leverkusen).

### 3.2.3.4 Herstellung chemokompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen für eine chemische Transformation wurden 5 ml LB-Medium mit einer Kolonie des *E.coli* Stammes JM109 angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Von dieser Übernachtskultur wurden 4 ml in 200 ml LB-Medium mit 2 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> gegeben. Dies wurde bis zu einer OD<sub>650</sub> von 0,3 - 0,4 bei 37 °C geschüttelt. Die Kultur wurde dann für 30 min bei 4 °C gekühlt und anschließend für 10 min mit 5000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 20 ml 4 °C kaltem 50 mM CaCl<sub>2</sub> gespült ohne es zu lösen. Dann wurde das Pellet mit 100 ml 4 °C kaltem 50 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und weitere 60 min bei 4 °C inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation mit 5000 rpm bei 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet vorsichtig in 20 ml 4 °C kaltem 50 mM CaCl<sub>2</sub> mit 20 % Glycerin gelöst. Die Zellsuspension wurde aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

### 3.2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

<u>Agarose:</u>	SeaKem LE agarose (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME, USA)
<u>Ethidiumbromid-Lösung:</u>	10 mg/ml in Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0
<u>10 x DNA-Probenpuffer:</u>	0,1 % Xylolcyanol; 0,1 % Bromphenolblau; 50 % Glycerin

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 0,7 – 2 %ige Agarose-Gele in 1 x TAE hergestellt. Zur späteren Visualisierung der DNA-Banden unter UV-Licht wurde das Gel mit 0,1 µl/ml Ethidiumbromid-Lösung versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der in 1 x DNA-Probenpuffer aufgetragenen Proben erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern (BioRad) bei einer Stromstärke von circa 10 V/cm. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet.

Die Größenabschätzung der DNA-Fragmente erfolgte im Vergleich mit einem 100 bp Fragmentlängenstandard (100 bp DNA Ladder, *extended*).

### 3.2.3.6 Elution von DNA aus Agarose-Gelen und Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde unter UV-Licht die gewünschte Bande mit einem Skalpel herausgeschnitten und die DNA mit dem Qiaex II Gelextraktions-Kit isoliert. Die Ligation von Fragmenten bzw. Vektoren erfolgte mit dem Rapid DNA-Ligation Kit. Als Vektor wurde der pBlueskript KS (-) verwendet (Stratagene, La Jolla, USA). Dieser Vektor bringt unter anderem eine Ampicillin-Resistenz mit und ermöglicht die Überprüfung des Ligationserfolgs über eine Blau-Weiß-Selektion.

### 3.2.3.7 Transformation von Bakterien

10 x TCM: 0,1 M MgCl<sub>2</sub>; 0,1 M Tris-HCl pH 7,5; 0,1 M CaCl<sub>2</sub>

Zur Transformation von Plasmid-DNA oder Ligationsansätzen wurden chemokompetente Zellen bei 4 °C aufgetaut. Anschließend wurden 10 µl Ligationsansatz oder Plasmid-DNA mit 20 µl 10 x TCM in einem Reaktionsvolumen von 75 µl zusammengegeben und für 5 min bei 4 °C gekühlt. Dann wurden 125 µl der kompetenten Zellen hinzugegeben und erneut für 45 min bei 4 °C inkubiert. Nach 2 min bei 42 °C in einem Wasserbad wurde der Ansatz in 1 ml LB-Medium gegeben und 30 min bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden die Bakterien auf LBamp-/X-Gal-Platten (imMedia<sup>TM</sup> Amp Blue, Invitrogen, Groningen, NL) ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.3.8 Plasmid-Präparation

<u>LBamp-Medium:</u>	100 mg/l Ampicillin (Sigma) in LB-Medium
<u>Puffer1-Qiagen:</u>	50 mM Tris-HCl; 10mM EDTA; pH 8,0; 100 µg/ml RNase A (4 °C)
<u>Puffer2-Qiagen:</u>	200 mM NaOH; 1 % SDS
<u>Puffer3-Qiagen:</u>	2,5 M Kaliumacetat; pH 4,8
<u>QBT-Puffer-Qiagen:</u>	750 mM NaCl; 50 mM MOPS; 15 % Ethanol; pH 7,0; 0,15 % Trition-X 100
<u>QC-Puffer-Qiagen:</u>	1 M NaCl; 50 mM MOPS; 15 % Ethanol; pH 7,0
<u>QF-Puffer-Qiagen:</u>	1,25 M NaCl; 50 mM MOPS; 15 % Ethanol; pH 8,2

Für eine Plasmid-Mini-Präparation wurden 3 ml LBamp-Medium mit einer transfizierten Einzelkolonie des JM109 Stammes von *Escherichia coli* angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C kultiviert. Von der Kultur wurden 1,5 ml für 5 min mit 14000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 300 µl Puffer1 gelöst. Es wurde 300 µl Puffer2 hinzugegeben und für 5 min inkubiert. Nach Auffüllen mit 300 µl Puffer3 erfolgte die Zentrifugation für 15 min bei 4 °C mit 14000 rpm. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Isopropanol aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Wiederum nach Zentrifugation wurde das Pellet in einer Speedvac (Univapo 100H, Uniequip, Martinsried) getrocknet und dann in 50 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,0 resuspendiert.

In Vorbereitung auf eine Plasmid-Maxi-Präparation wurden 200 ml LBamp-Medium mit einer transfizierten Einzelkolonie angeimpft und als Schüttelkultur über Nacht bei 37 °C angezogen. Die Präparation erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit. Das getrocknete Plasmid-Pellett wurde in 1 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,0 aufgenommen.

### 3.2.3.9 Sequenzierung und Sequenzvergleich

Für die Verifizierung und Bestimmung von Sequenzen wurden Plasmide mit DNA-*insert* aufgereinigt (Qiaprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) und mittels fluoreszent-markierter Didesoxynukleotide nach der Kettenabbruchmethode automatisch sequenziert. Die Sequenzierung wurde im IfN-Speziallabor ‚Molekularbiologische Techniken‘ durchgeführt (Dr. W. Tischmeyer). Die Sequenzdaten wurden anschließend mittels des GCG-Sequenzanalyse-Programmes (Genetics Computer Group, Inc., Madison, Wisconsin) analysiert und mit Sequenzdatenbanken verglichen.

### 3.2.3.10 Herstellung Digoxigenin-markierter cRNA-Sonden durch *in vitro*-Transkription

Sonde	Richtung	Plasmid	Enzym	RNA-Polymerase
<b>CHL1</b> (cDNA, extrazellulärer Teil)	<i>sense</i>	pBS/CHL1extra/sT7	<i>Not I</i>	T7
	<i>antisense</i>	pBS/CHL1extra/sT3	<i>Not I</i>	T7
<b>c-fos</b> (vollständige cDNA)	<i>sense</i>	c-fos1B	<i>BamH I</i>	SP6
	<i>antisense</i>	c-fos1A	<i>BamH I</i>	SP6
<b>arg3.1</b> (3,1 kb der cDNA)	<i>sense</i>	sSPORT-1	<i>Not I</i>	T7
	<i>antisense</i>	sSPORT-1	<i>Sal I</i>	SP6

Für die Generierung einer Digoxigenin-markierten cRNA-Sonde wurde das Plasmid mit der Ausgangs-DNA in einem Reaktionsvolumen von 100 µl mit den entsprechenden Enzymen für die *sense*- bzw. *antisense*-Sonde linearisiert. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde auf einem 0,8 %igem Agarosegel überprüft (siehe 4.2.3.5). Dann wurden 200 µl DEPC-H<sub>2</sub>O sowie 300 µl CHCl<sub>3</sub> hinzugegeben und der Ansatz für 2 min geschüttelt. Nach 5 min Zentrifugation mit 14000 rpm wurden 250 µl Überstand abgenommen mit 200 µl CHCl<sub>3</sub> erneut geschüttelt, zentrifugiert und 200 µl davon in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun wurde die erste Chloroformphase mit 100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O mit der eben beschriebenen Methode gewaschen. Von der wässrigen Phase wurden nun 100 µl auf die zweite Chloroformphase gegeben. Nach Vortexen und Zentrifugieren wurden dann 100 µl vom Überstand mit den ersten 200 µl vereinigt. Zu den 300 µl Chloroform-gereinigter DNA kamen 10 % 3 M Natriumazetat pH 5,2 und 1% 1 M MgCl<sub>2</sub>. Nach Fällen der DNA durch Ethanolpräzipitation mit dem 2,5fachen Volumen an kaltem EtOH wurde das Pellett getrocknet und in 20 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Die Konzentration der Lösung wurde durch Bestimmung der optischen Dichte bei 260 nm ermittelt. Für die *in vitro*-Transkription wurde etwa 1 µg linearisierte DNA in Transkriptionspuffer mit 5 µl 40mM DTT, 1 µl RNAsin, 2 µl 10fach DIG-RNA-Labeling Mix (3,75 mM DIG-UTP) sowie 1,5 µl RNA-Polymerase in einem Gesamtansatz von 20 µl für 3 Stunden bei 37 °C und nach Hinzufügen von nochmals 1 µl RNA-Polymerase über Nacht inkubiert. Die Ausgangs-DNA wurde durch 1 µl DNase (RNase-frei; Boehringer) innerhalb von 20 min bei 37 °C abgebaut. Nach Hinzugabe von 2,4 µl 4 M LiCl und 2 µl 0,5 M EDTA wurde das cRNA-Produkt durch Ethanol gefällt. Das trockene Pellet wurde in 100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Für die alkalische Hydrolyse wurden zu 100 µl RNA-Ansatz 100 µl 40 mM NaHCO<sub>3</sub>/60 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pipettiert und bei 65 °C inkubiert.

Zur Gewinnung etwa 0,3 kb großer RNA-Fragmente wurde die Inkubationsdauer in Minuten mit folgender Formel kalkuliert: [(Fragmentlänge in kb - gewünschte Fragmentlänge in kb) ÷ (Fragmentlänge x gewünschte Fragmentlänge x 0,11)]. Neutralisiert wurde die Reaktion mit 100 µl 0,1 N HCl. Die cRNA-Sonden wurden aliquotiert und bei -70 °C aufbewahrt.

### 3.2.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.2.4.1 Proteingewinnung aus Gewebe

<u>Homogenisierungspuffer:</u>	0,2 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; 0,2 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O; 1 mM NaHCO <sub>3</sub> ; pH 7,9; 1 mM Spermidin; 1 µg/ml Turkey egg-white trypsin inhibitor (TEW); 10 µg/ml Soja-Bohnen Trypsin Inhibitoren (SBTI); 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); 0,5 mM Jodacetamid (IAA)
<u>Solubilisierungspuffer:</u>	20 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 150 mM NaCl; pH 7,2

Zur Gewinnung von Protein wurden frisch entnommene Gehirne bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Das Gewebe wurde mit 1,2 ml/g Homogenisierungspuffer versetzt und mit einer Ultra-Turrax T8 (IKA Labortechnik) etwa 2 min mit 25000 rpm homogenisiert. Danach wurden die Zellkerne und -trümmer durch Zentrifugation für 10 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit 1500 rpm abgetrennt. Der Überstand wurde durch 15 min Zentrifugation bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit 13000 rpm in zytosolische und Membranfraktion getrennt. Das entstandene Pellet wurde in Solubilisierungspuffer rehomogenisiert und die Proben bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.4.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

<u>2 x Probenpuffer:</u>	135 mM Tris-HCl pH 6,8; 4 % SDS; 20 % Glycerin; 10 % 2-Mercaptoethanol; 0,016 % Bromphenolblau
<u>SDS-Laufpuffer:</u>	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 1 % SDS
<u>Coomassie-Färbelösung:</u>	0,125 % Coomassie-Brilliantblue R250; 50 % Methanol; 10 % Eisessig
<u>Entfärber:</u>	7 % Eisessig; 5 % Methanol
<u>Geltrocknungslösung:</u>	50 % Methanol; 5 % Glycerin

Die Auftrennung der Proteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels SDS-Page nach der Methode von Laemmli (1970). Es wurden 5 %ige Sammelgele und homogene 8 %ige Trenngele verwendet. Die zu analysierenden Proben wurden 1:1 mit Probenpuffer versetzt, für 10 min gekocht und dann auf das Sammelgel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einem BioRad-System mit 25 mA pro Gel bei 250 V in SDS-Laufpuffer durchgeführt. Die Proteingele wurden entweder geblottet (siehe 4.2.4.3) oder mit Coomassie-Färbelösung gefärbt (ca. 1 h bei RT). Durch Inkubation in Entfärber wurden die Banden im Gel sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurden gefärbte Gele in Geltrocknungslösung inkubiert und anschließend zwischen zwei Folien (Ersatz-Cellophan, Roth) getrocknet.

### 3.2.4.3 Western-Blotting und Antikörperdetektion

<u>Blotpuffer:</u>	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol
<u>Ponceau S:</u>	0,2 % Ponceau S; 3 % Trichloroacetic Acid (TCA)
<u>TBS-T:</u>	0,5 % Tween-20 in 1 x TBS
<u>MP-TBS-T:</u>	4 % Magermilchpulver in TBS-T

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen auf eine Nitrocellulose-Membran (Amersham) erfolgte elektrophoretisch. Zuerst wurde das SDS durch 10minütiges

Equilibrieren des Gels in Blotpuffer heraus gewaschen. Anschließend wurden die Gele in einer Trans-Blot-Cell (BioRad, München) in Blotpuffer für 1 h mit 100 V und maximal 350 mA bei 4 °C geblottet. Die Effizienz des Proteintransfers wurde durch Färben der Blotmembran mit Ponceau S (circa 15 min) überprüft.

Die Nitrozellulose-Membran wurde nach dem Transfer für eine Stunde mit MP-TBS-T blockiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper 1:5000 in MP-TBS-T erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde der Blot dreimal 15 min mit TBS-T gewaschen. Der Zweitantikörper wurde in einer Verdünnung 1:10000 in MP-TBS-T auf den Blot gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen der Antikörperlösung wurde die Membran dreimal 15 min mit TBS-T und einmal 10 min mit TBS gewaschen. Die Detektion der Antigene erfolgte indirekt über die Reaktion des an den zweiten Antikörper gekoppelten Enzyms Meerrettichperoxidase (HRP) (Umsetzung von Substraten und Emission von Chemolumineszenz, ECL-Detektionssystem, Amersham). Dazu wurde ECL-Lösung-A mit ECL-Lösung-B 1:1 gemixt, auf den Blot gegeben und für 60 s inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurde ein ECL-Hyperfilm (Amersham) aufgelegt und dieser dann mit einer Entwicklermaschine entwickelt.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Verhaltensbiologische Charakterisierung der konventionell CHL1-defizienten Maus

Die CHL1-defiziente Maus zeigt Veränderungen in der Terminierung der Moosfaseraxone auf die CA3-Neurone des Hippocampus (Montag-Sallaz *et al.*, 2002). Auch im olfaktorischen Bulbus wurden Fehler in der axonalen Verschaltung gefunden. Zusätzlich zeigen CHL1-defiziente Tiere im Offenfeld-Test, *Water-Maze* und erhobenen Plus-Labyrinth subtile Veränderungen im Verhalten. Die beschriebenen morphologischen Defekte könnten die Ursache für eine veränderte Informationsverarbeitung in CHL1-defizienten Tieren sein, was wiederum zu den Veränderungen im Verhalten führte. Aus diesem Grund wurden verschiedene Verhaltensversuche mit den CHL1-Mutanten durchgeführt. Diese Tests sollten Aussagen über das Lernen und Erinnern von verschiedenen Stimuli zulassen (*Taste-Novelty-Paradigma*, Geruchs-Kennenlern-Test, Offenfeld-Lochbrett-Test). Außerdem wurden eine Angst-Konditionierung sowie der Heiße-Platte-Analgesie-Test durchgeführt, um das Angst-verarbeitende System bzw. die Schmerzrezeption in CHL1-defizienten Tieren zu überprüfen. Mit dieser Arbeit sollten mögliche Veränderungen in der Informationsverarbeitung CHL1-defizienter Tiere aufgezeigt werden.

#### 4.1.1 *Taste-Novelty-Paradigma*

Die Erkennung und Verarbeitung von *Novelty* (Neuigkeit) ist ein lebenswichtiger Prozeß, der ein Tier in einer dynamischen Umwelt befähigt, adäquat auf Reize und Situationen zu reagieren. Da bei CHL1-defizienten Tieren Fehler in der axonalen Projektion festgestellt wurden, war es von großem Interesse zu erfahren, wie das neuronale Netzwerk auf *Novelty*-Stimulation reagiert. Abweichungen in der neuronalen Aktivierung nach Stimulation mit neuen oder vertrauten Reizen könnten Rückschlüsse auf eine veränderte Informationsverarbeitung in CHL1-defizienten Tieren zulassen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde das *Taste-Novelty-Paradigma* angewendet (Montag-Sallaz *et al.*, 1999). Wie für die mRNA von *c-fos* und *arg3.1/arc* gezeigt wurde, ergibt sich im Gehirn von Wildtyp-Mäusen, in Abhängigkeit von verschiedenen Trinklösungen, ein komplexes Antwortmuster auf die Stimulation. Mit dem *Taste-Novelty-Paradigma* ist es möglich, Tiere in ihrer vertrauten Umgebung (Heimkäfig) kontrolliert und gezielt zu stimulieren. Störende Seiteneffekte durch Stressoren, wie eine neue Umgebung oder das Anfassen (*Handling*), und damit einhergehende gesteigerte motorische Aktivität

können nahezu ausgeschlossen werden. Die Versuchstiere wurden in verschiedene Stimulationsgruppen aufgeteilt. Diese Gruppen wurden sechs Tage an den Versuchsablauf habituiert und bekamen täglich für eine halbe Stunde entweder Wasser oder Saccharin als Trinklösung präsentiert (Abschnitt 3.2.1.1: **Abb. 4**). Am siebten Versuchstag wurde ihnen dann Wasser als neutraler Geschmack, Saccharin als neuer Geschmack oder Saccharin als vertrauter Geschmack verabreicht. An jedem der sieben Versuchstage begannen die Tiere innerhalb von 30 s zu trinken. Es gab keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen in der Menge der pro Stimulationssitzung konsumierten Flüssigkeiten (ca. 1,5 ml bis 1,6 ml). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulationsbeginn (0,5 h, 1 h, 4,5 h, 6 h) wurden dann die Tiere dekapitiert und die Gehirne entnommen. Mittels nicht-radioaktiver *in situ*-Hybridisierung wurde die mRNA-Expression zweier Aktivitätsmarker (IEGs: *c-fos* und *arg3.1/arc*) in den Gehirnen von je 54 Wildtypen und CHL1<sup>-/-</sup> Tieren erfaßt. Zusätzlich wurde mittels 2DG-Autoradiographie an 27 Wildtypen und 26 CHL1-defizienten Tieren die metabolische Aktivität des *Novelty*-verarbeitenden Netzwerkes aus limbischen und neokortikalen Hirnarealen untersucht. Es wurden der anteriore cinguläre Kortex, der insulare Kortex, der posteriore cinguläre Kortex, die Amygdala, der Gyrus Dentatus, der piriforme Kortex und die äußeren und inneren Schichten des parietalen Kortex untersucht (Abschnitt 3.2.2.2: **Abb. 8**). Die Verwendung von *in situ*-Hybridisierung und 2DG-Autoradiographie erlaubt die Kartierung der in diesem Paradigma durch eine veränderte Transkription oder veränderten Glukose-Verbrauch gekennzeichneten Hirnareale.

Die Mittelwerte der Versuchsgruppen wurden mittels einer 3-Wege-ANOVA mit den Faktoren Genotyp, Trinklösung und Zeitpunkt statistisch ausgewertet. Zum Vergleich der Versuchsgruppen, sowohl innerhalb eines Genotyps (Wildtypen, CHL1<sup>-/-</sup>) als auch von korrespondierenden Gruppen zwischen den Genotypen (ww, ws, ss), wurde ein 1-Wege-ANOVA mit anschließendem Scheffe's *post-hoc*-Test angewandt. Aufgrund der Datenfülle und zur besserem Übersichtlichkeit werden ausschließlich signifikante Unterschiede der ANOVA und der Scheffe's *post-hoc*-Vergleiche angegeben.

Für jeden der drei Marker werden zuerst die Ergebnisse für die Wildtypen dargestellt (1-Wege-ANOVA, Scheffe's *post-hoc*-Test) und anschließend die Resultate der CHL1-Mutanten im Vergleich zu den Wildtypen präsentiert. Es werden signifikante Effekte der Faktoren Genotyp, Trinklösung und Zeitpunkt angegeben, gefolgt von Interaktionen zwischen Genotyp und Trinklösung und/oder Zeitpunkt nach Arealen getrennt. Für jedes Areal mit signifikanten Interaktionen zwischen Genotyp und Trinklösung und/oder Zeitpunkt werden zusätzlich signifikante Gruppenunterschiede zwischen Wildtypen und CHL1<sup>-/-</sup> angegeben.

Durch den Vergleich dieser Methoden sollten Unterschiede in der Aktivierung der untersuchten Hirnareale zwischen CHL1-/- und Wildtypen aufgezeigt werden, was Hinweise auf eine veränderte Informationsverarbeitung geben würde.

#### **4.1.1.1 2-Deoxy-Glukose-Anreicherung nach Stimulation im *Taste-Novelty-Paradigma***

Zur Kartierung metabolisch aktiver Hirnareale fand die von Sokoloff (1977) beschriebene 2-Deoxyglukose-Methode (2DG) Anwendung. Den Versuchstieren wurde intraperitoneal eine Injektion mit 2-Deoxy-D-[1-<sup>14</sup>C]-Glukose in steriler NaCl-Lösung verabreicht. Dieses Molekül wird von den Körperzellen in gleicher Weise wie Glukose aufgenommen und dort von der Hexokinase phosphoryliert. Im Gegensatz zu Glukose-6-Phosphat kann 2-Deoxyglucose-6-Phosphat aber nicht weiter verstoffwechselt werden und reichert sich in metabolisch aktiven Regionen an. Nach Stimulation wurden die Gehirne entnommen, geschnitten und auf radiosensitivem Film exponiert und die entstandenen Autoradiogramme ausgewertet. Durch Bestimmung der optischen Dichte der Hirnareale und deren Abgleich mit der optischen Dichte des Corpus Callosum (Balken) können Unterschiede in der Filmschwärzung und in der absolut aufgenommenen Menge von 2DG ausgeglichen werden, da im Corpus Callosum keine aktivitätsbedingte 2DG-Anreicherung auftritt. Die so gewonnenen relativen optischen Dichten (ROD) wurden zwischen den Gruppen verglichen. Diese Untersuchung sollte metabolisch aktive Regionen, die nicht unbedingt auch durch eine veränderte Genexpression gekennzeichnet sein müssen, sowie Unterschiede in der metabolischen Aktivierung zwischen Wildtypen und Mutanten aufzeigen. Montag-Sallaz *et al.* (1999) haben mittels *in situ*-Hybridisierung gezeigt, daß 0,5 h und 4,5 h Stunden nach Stimulation mit Wasser und Saccharin als neuem oder vertrautem Geschmack signifikante Unterschiede in der IEG-Expression der untersuchten Hirnareale der Maus auftreten. Deswegen wurden in der vorliegenden Studie diese beiden Zeitpunkte mit der 2DG-Autoradiographie-Methode untersucht.

##### **4.1.1.1.1 2DG-Anreicherung in Wildtyp-Tieren**

In Wildtyp-Geschwistern kam es 0,5 h nach Stimulation mit einem vertrauten Geschmack im Vergleich zu Wasser in der Amygdala ( $F_{(1,7)} = 7,540$ ;  $p = 0,0287$ ) und dem Gyrus Dentatus ( $F_{(1,7)} = 6,213$ ;  $p = 0,0412$ ) zu einer signifikanten Anreicherung von 2DG (**Abb. 9**). Dagegen führt ein neuer Stimulus im Vergleich zu Wasser im anterioren cingulären Kortex ( $F_{(1,7)} =$

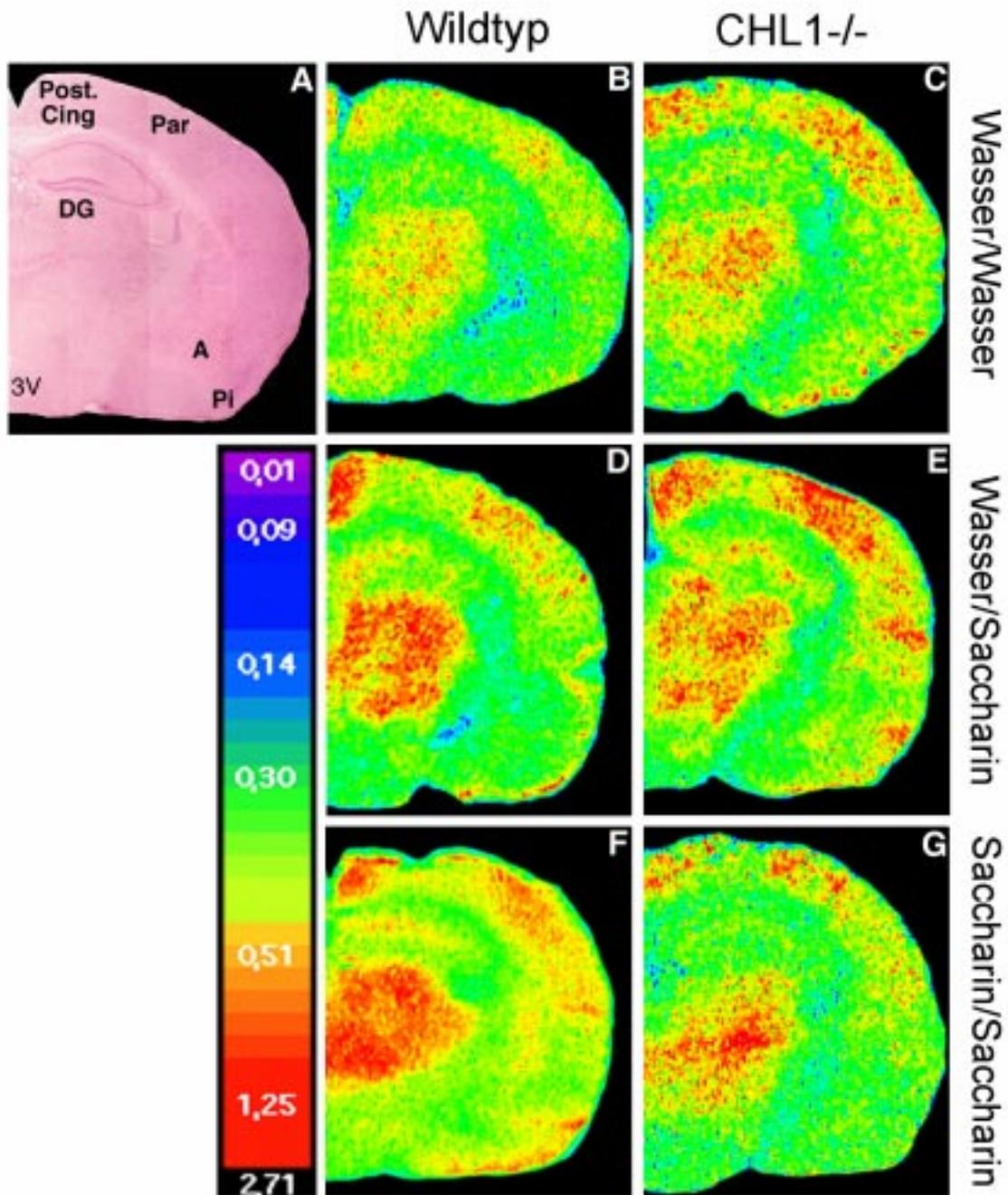
12,378;  $p = 0,0098$ ) nach 4,5 h zu einer signifikant höheren ROD. In allen anderen untersuchten Arealen kam es zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den Stimulationsgruppen. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Stimulation von Wildtypen mit den drei Trinklösungen in den meisten untersuchten Arealen zu keinen großen Unterschieden in der metabolischen Aktivität zwischen den Versuchsgruppen geführt hat.

#### 4.1.1.1.2 Vergleich der 2DG-Anreicherung in CHL1-defizienten Tieren und Wildtypen

Es gab keinen signifikanten Effekt des Genotyps oder der Trinklösungen auf die Anreicherung von 2DG. Für den insularen Kortex wurde ein Effekt des Zeitpunktes für die Anreicherung von 2DG gefunden (Zeitpunkt:  $F_{(1,41)} = 4,590$ ;  $p = 0,0456$ ). Das heißt, in CHL1-/- und Wildtyp-Tieren kam es zu einer *Novelty*- und geschmacksunabhängigen Verringerung der 2DG-Aufnahme in Abhängigkeit von der Überlebenszeit. Im insularen Kortex war die ROD 0,5 h nach Stimulation höher als 4,5 h nach Stimulation. Für die anderen untersuchten Areale konnte kein Einfluß der Zeit auf die 2DG-Anreicherung gefunden werden.

Amygdala: Die 2DG-Anreicherung variierte zwischen den Versuchsgruppen in Abhängigkeit vom Genotyp und der Trinklösung (Interaktion zwischen Genotyp und Trinklösung:  $F_{(2,41)} = 4,087$ ;  $p = 0,0241$ ). Für CHL1-/- Tiere, die Saccharin als neue Lösung bekamen, wurde im Vergleich zu Wildtypen eine signifikant höhere Anreicherung von 2DG 0,5 h nach Stimulation festgestellt ( $F_{(1,8)} = 5,393$ ;  $p = 0,0487$ ) (**Abb. 9** und **Abb. 12**). Auch für CHL1-Mutanten, die Wasser als Trinklösung bekamen, war eine signifikante Anreicherung 0,5 h nach Stimulation zu beobachten ( $F_{(1,7)} = 12,916$ ;  $p = 0,0088$ ) (**Abb. 9** und **Abb. 12**). Das bedeutet, bei den CHL1-defizienten Tieren war 0,5 h nach Stimulation eine veränderte 2DG-Anreicherung bedingt durch die Art der Trinklösung zu beobachten.

anterioren cingulärer Kortex: Es gab eine differenzierte Anreicherung in den Versuchsgruppen abhängig vom Genotyp, der Trinklösung und dem Zeitpunkt der Dekapitation (Interaktion zwischen Genotyp, Trinklösung und Zeitpunkt:  $F_{(2,41)} = 7,322$ ;  $p = 0,0019$ ). In CHL1-Mutanten war die 2DG-Anreicherung in Abhängigkeit von der gegebenen Trinklösung und dem Zeitpunkt verändert. Im Vergleich zu Wildtypen wurde in CHL1-/- 0,5 h nach Stimulation mit Wasser ( $F_{(1,7)} = 5,837$ ;  $p = 0,0464$ ) und 4,5 h nach Stimulation mit Saccharin als neuem Geschmack ( $F_{(1,7)} = 6,484$ ;  $p = 0,0383$ ) eine geringere ROD gemessen (**Abb. 12**).



**Abb. 9: Falschfarbendarstellung von 2DG-Autoradiogrammen 0,5 h nach Stimulation**

A) Die untersuchten Areale sind in einem Hämatoxylin-gefärbten Frontal-Schnitt angegeben (Post.Cing – posteriorer cingulärer Kortex, Par – parietaler Kortex, DG – Gyrus Dentatus, A – Amygdala, Pi – piriformer Kortex). Autoradiogramme von Wildtypen (B, D, F) und CHL1<sup>-/-</sup> (C, E, G) nach Einnahme von Wasser (Wasser/Wasser), Saccharin als neuem (Wasser/Saccharin) und Saccharin als vertrautem Geschmack (Saccharin/Saccharin) sind gegenübergestellt. (3V – dritter Ventrikel)

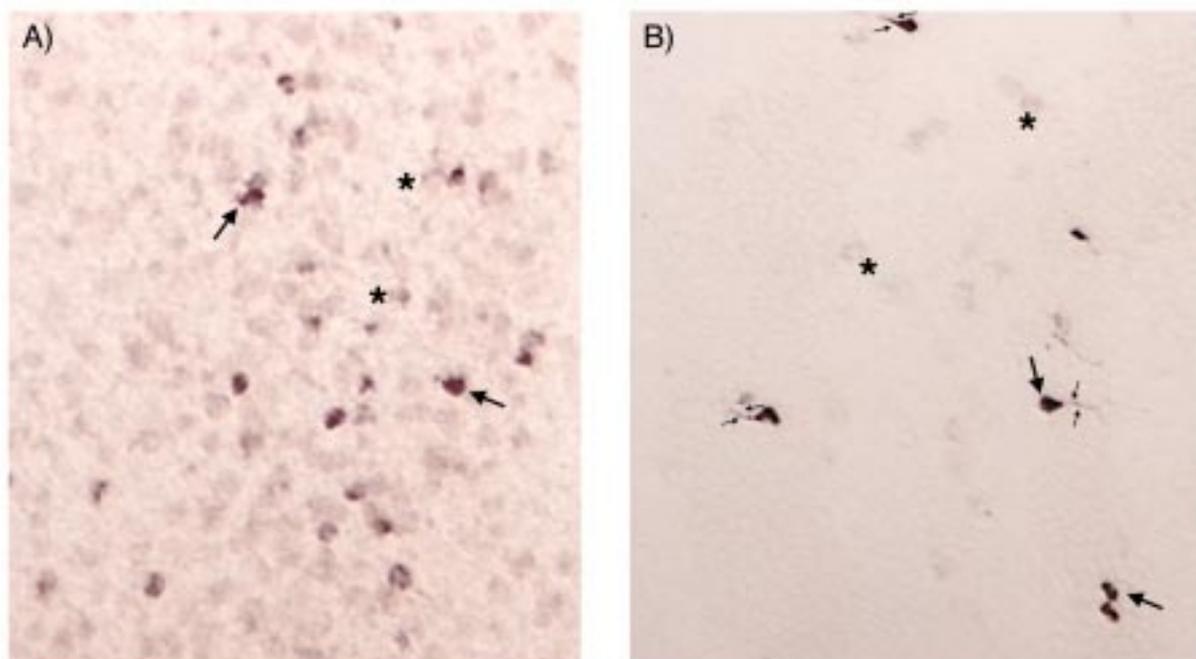
In allen weiteren untersuchten Arealen erreichte die Interaktion zwischen Genotyp und Zeitpunkt niemals Signifikanz, was darauf hindeutet, daß das zeitliche Muster der 2DG-Anreicherung nicht signifikant verändert war in Abwesenheit von CHL1. Auch konnte in keinem anderen untersuchten Areal eine Interaktion zwischen Genotyp und Trinklösung

nachgewiesen werden. Die Anreicherung von 2DG, induziert durch die verschiedenen Trinklösungen, war in diesen Arealen in CHL1-defizienten Tieren nicht verändert.

Es wurde gezeigt, daß die Stimulation mit den verschiedenen Trinklösungen in Wildtyp-Mäusen zu keinen starken Veränderungen in der metabolischen Aktivität der untersuchten Hirnareale führte. Auch in den CHL1-defizienten Tieren kam es durch dieses Stimulationsparadigma zu keinen starken metabolischen Unterschieden. Lediglich die Stimulation von CHL1-defizienten Tieren mit einem neutralen Geschmack führte nach 0,5 h in der Amygdala zu einer signifikant stärkeren und im anterioren cingulären Kortex zu einer signifikant geringeren ROD im Vergleich zu Wildtypen.

#### 4.1.1.2 *in situ*-Hybridisierung nach Stimulation im *Taste-Novelty-Paradigma*

Zur Lokalisierung der mRNA für die *Immediate-Early*-Gene (IEG) *c-fos* und *arg3.1/arc* wurden Digoxigenin-markierte cRNA-Sonden durch *in vitro*-Transkription hergestellt. Mit diesen cRNA-Sonden wurde die *in situ*-Hybridisierung durchgeführt (Montag-Sallaz *et al.*, 1999; Montag-Sallaz & Buonviso, 2002).



**Abb. 10: Bilder nicht-radioaktiver *in situ*-Hybridisierungen für *c-fos* (A) und *arg3.1/arc* (B)**  
Große Pfeile kennzeichnen Beispiele für markierte, Sternchen verdeutlichen beispielhaft unmarkierte Zellen. Die mRNA von *arg3.1/arc* ist auch in Dendriten zu finden (kleine Pfeile).

Die Zahl der gefärbten Zellen in den verschiedenen limbischen und neokortikalen Regionen wurde ausgezählt. Die Areale sind in der **Abb. 8** im Abschnitt 3.2.2.3 grafisch dargestellt. Um

Ungenauigkeiten durch interindividuelle Unterschiede sowie Präparationsartefakte in der Größe von Hirnarealen zu vermeiden, wurde die Anzahl der gefärbten Zellen auf die Größe des Areals bezogen. Die so erhaltene Zelldichte pro  $\text{mm}^2$  der verschiedenen Areale wurde zwischen den Versuchsgruppen verglichen. Die beobachtete basale Expression von *c-fos* und *arg3.1/arc* in einem unstimulierten Gehirn entsprach den Angaben aus der Literatur (Morgan & Curran, 1991; Link *et al.*, 1995). Die **Abb. 10** dokumentiert den Unterschied zwischen markierten und unmarkierten Zellen nach *in situ*-Hybridisierung mit *c-fos* bzw. *arg3.1/arc* cRNA-Sonden. Es wurden dunkelbraun- oder schwarz-markierte Zellen als positiv gezählt, während hellbraune Zellen als unspezifisch gefärbt betrachtet wurden und nicht in die Analyse eingingen.

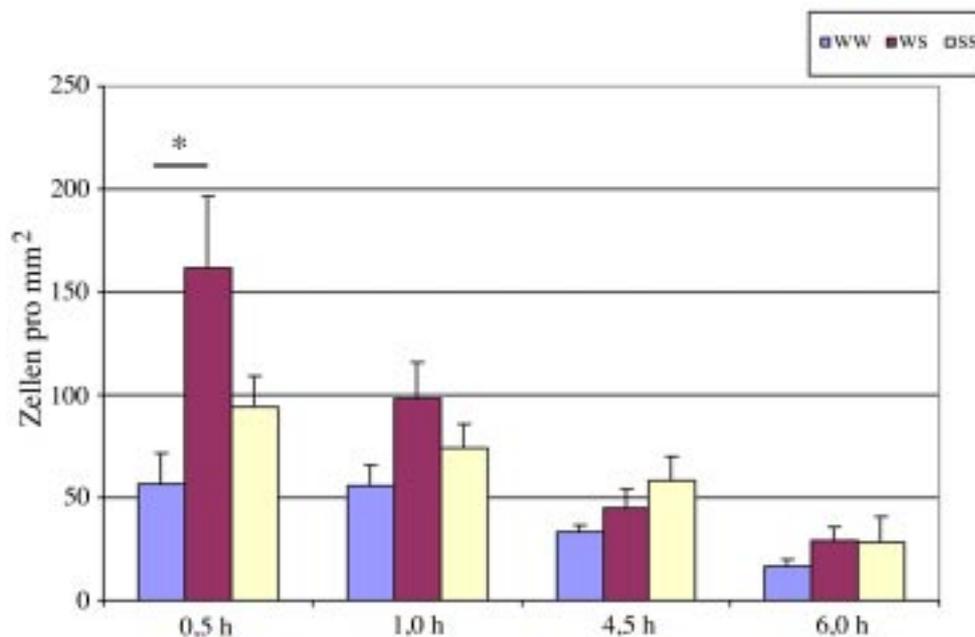
#### 4.1.1.2.1 *c-fos*-mRNA-Expression

*c-fos* ist einer der bestuntersuchten regulatorischen Transkriptionsfaktoren und steuert die Expression weiterer Gene. Somit stellt es einen idealen Marker für Plastizitätsvorgänge im Gehirn auf der Ebene sekundärer Botenstoffe dar. Wie Montag-Sallaz *et al.* (1999) beschrieben haben, führt die Stimulation mit einem neuen Geschmack in C57BL/6-Mäusen 0,5 h nach Stimulationsbeginn zu einer signifikant erhöhten Expression von *c-fos*-mRNA.

##### 4.1.1.2.1.1 *c-fos*-Expression in Wildtyp-Geschwister-Tieren

In den Wildtyp-Kontrollen konnten 0,5 h nach Stimulation mit einem neuen Geschmack im Vergleich zu Wasser im parietalen Kortex Schichten I-III ( $F_{(1,7)} = 8,418$ ;  $p = 0,0229$ ) sowie Schichten IV-VI ( $F_{(1,7)} = 9,836$ ;  $p = 0,0165$ ), insularen Kortex ( $F_{(1,7)} = 8,104$ ;  $p = 0,0248$ ), anterioren cingulären Kortex ( $F_{(1,7)} = 6,281$ ;  $p = 0,0406$ ; **Abb. 11**) und im posterioren cingulären Kortex ( $F_{(1,7)} = 7,306$ ;  $p = 0,0305$ ) eine signifikant höhere Dichte *c-fos*-positiver Zellen gezählt werden. In diesen Arealen war die Expression 0,5 h nach Stimulation mit Saccharin als neuem Geschmack signifikant erhöht gegenüber Wasser. Auch in der Amygdala gab es eine erhöhte *c-fos*-Expression nach einem neuen Geschmack, der Unterschied zu Wasser erreichte aber keine Signifikanz. Dagegen wurde in der Amygdala 0,5 h nach Stimulation durch eine neue Lösung im Vergleich zu einer vertrauten Lösung signifikant mehr *c-fos* exprimiert ( $F_{(1,8)} = 5,342$ ;  $p = 0,0496$ ). In nahezu allen untersuchten Arealen induzierte die Stimulation mit einem vertrauten Geschmack im Vergleich zu Wasser keine signifikant stärkere *c-fos*-Expression. Lediglich im posterioren cingulären Kortex gab es

neben dem *Novelty*-induzierten auch durch einen vertrauten Geschmack induziertes Expressionsmaximum. Eine bereits vertraute Saccharinlösung induzierte dort im Vergleich zu Wasser eine signifikant stärkere Expression von *c-fos* ( $F_{(1,7)} = 5,850$ ;  $p = 0,0462$ ). Die **Abb. 11** zeigt beispielhaft für den anterioren cingulären Kortex das Expressionsprofil von *c-fos* in Wildtypen nach Stimulation im Taste-*Novelty*-Paradigma. Lediglich 0,5 h nach Stimulation sind signifikante Gruppenunterschiede zu finden.



**Abb. 11:** *c-fos*-Expression im anterioren cingulären Kortex von Wildtyp-Mäusen

Die Zahl der markierten Zellen pro  $\text{mm}^2$  mit Standardfehler zu den vier verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation ist angegeben. ww – neutraler Geschmack, ws – Saccharin als neuer Geschmack, ss – Saccharin als vertrauter Geschmack (Gruppenvergleich mit Scheffé's *post-hoc*-Test: \*  $p < 0,05$ )

Das bedeutet, in Wildtypen führte die Stimulation mit einem neuen Geschmack im Vergleich zu Wasser in allen untersuchten Arealen außer dem Gyrus Dentatus, dem piriformen Kortex und der Amygdala nach 0,5 h, aber nicht zu den anderen untersuchten Zeiten, zu einer signifikant erhöhten *c-fos* Expression. Dabei war es die Eigenschaft ‚neu‘ der Trinklösung und nicht der Geschmack des Saccharins, der eine erhöhte *c-fos*-Expression zur Folge hatte.

#### 4.1.1.2.1.2 Vergleich der *c-fos*-Expression in CHL1-defizienten Mäusen und Wildtypen

Ein genereller Effekt des Genotyps mit einer erhöhten Expression von *c-fos* in CHL1-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen wurde in allen untersuchten Arealen außer dem Gyrus Dentatus gefunden (**Tab. 1**).

Areal	F- und p-Werte	Scheffe's <i>post-hoc</i> -Test
anteriorer cingulärer Kortex	$F_{(1,81)} = 19,196; p < 0,0001$	$p < 0,0001$
insularer Kortex	$F_{(1,80)} = 10,229; p = 0,0020$	$p = 0,0027$
posteriorer cingulärer Kortex	$F_{(1,82)} = 21,556; p < 0,0001$	$p < 0,0001$
Amygdala	$F_{(1,80)} = 18,588; p < 0,0001$	$p < 0,0001$
parietaler Kortex Schichten I-III	$F_{(1,83)} = 9,258; p = 0,0031$	$p = 0,0095$
parietaler Kortex Schichten IV-VI	$F_{(1,83)} = 23,561; p < 0,0001$	$p < 0,0001$
piriformer Kortex	$F_{(1,80)} = 10,405; p = 0,0018$	$p = 0,0067$
Gyrus Dentatus	$F_{(1,83)} = 1,034; n.s.$	n.s.

**Tab. 1: Varianzanalyse (ANOVA) für die Ergebnisse der *c-fos*-Expression**

Für die angegebenen Areale wurde ein Einfluß des Genotyps auf die *c-fos*-Expression gefunden. n.s. – nicht signifikant

Das Fehlen von CHL1 führte in diesen Hirnarealen zu einer verstärkten *c-fos*-Expression im Vergleich zu Wildtypen unabhängig von der Art der Trinklösung und dem Zeitpunkt der Dekapitation.

Areal	Trinklösung	Zeitpunkt
anteriorer cingulärer Kortex	$F_{(2,81)} = 7,982; p = 0,0007$	$F_{(3,81)} = 34,187; p < 0,0001$
insularer Kortex	$F_{(2,80)} = 9,873; p = 0,0001$	$F_{(3,80)} = 33,896; p < 0,0001$
posteriorer cingulärer Kortex	$F_{(2,82)} = 10,963; p < 0,0001$	$F_{(3,82)} = 31,004; p < 0,0001$
Amygdala	$F_{(2,80)} = 8,999; p = 0,0003$	$F_{(3,80)} = 25,713; p < 0,0001$
parietaler Kortex Schichten I-III	$F_{(2,83)} = 5,292; p = 0,0069$	$F_{(3,83)} = 18,813; p < 0,0001$
parietaler Kortex Schichten IV-VI	$F_{(2,83)} = 11,974; p < 0,0001$	$F_{(3,83)} = 28,084; p < 0,0001$
piriformer Kortex	$F_{(2,80)} = 1,309; n.s.$	$F_{(3,80)} = 25,028; p < 0,0001$
Gyrus Dentatus	$F_{(2,83)} = 1,095; n.s.$	$F_{(3,83)} = 1,617; n.s.$

**Tab. 2: ANOVA für die *c-fos*-Expression**

Es wurde ein Einfluß der Faktoren Trinklösung und Zeitpunkt auf die Expression von *c-fos* in Wildtypen und CHL1-defizienten Tieren gefunden. n.s. – nicht signifikant

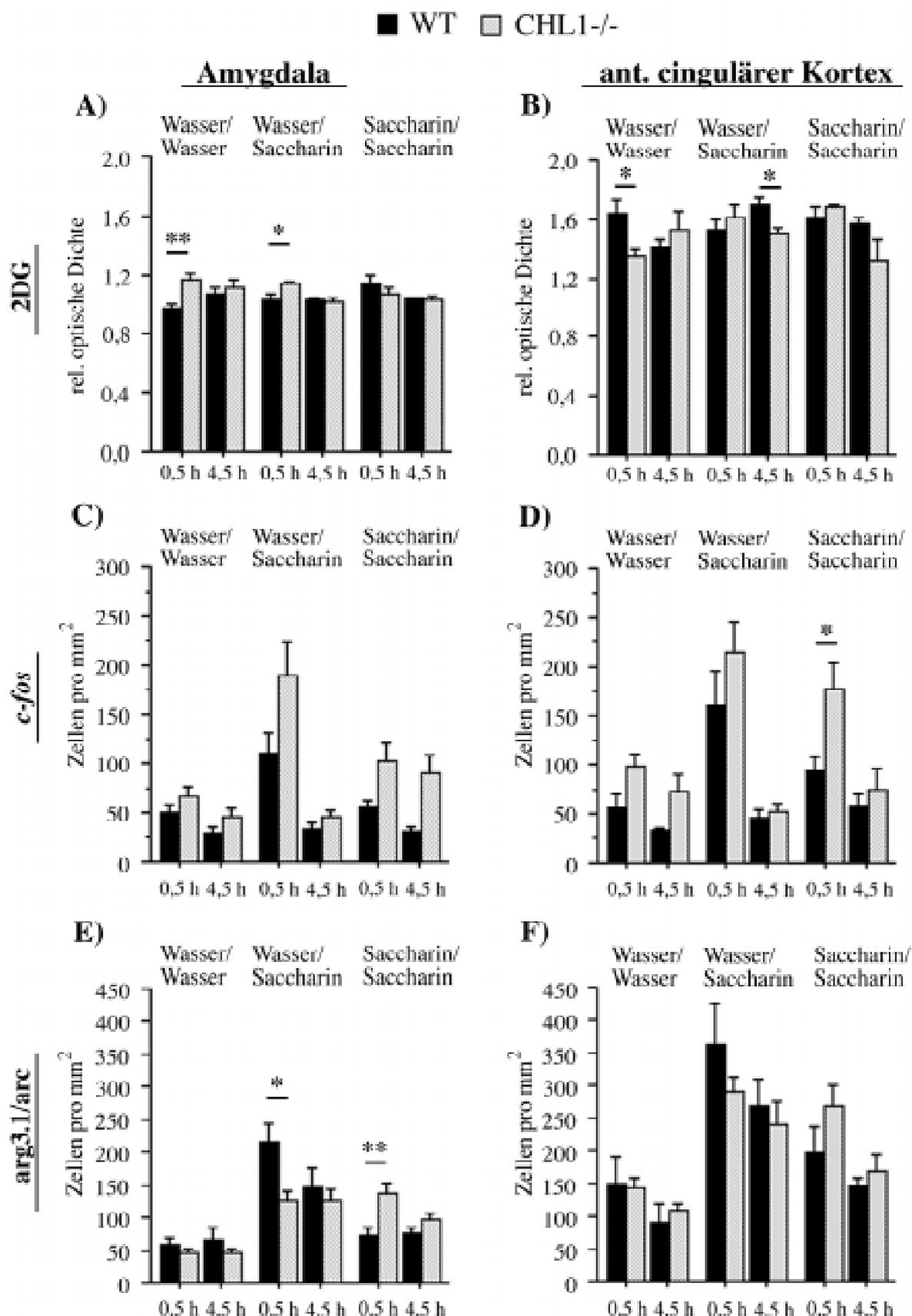
Auch für die Faktoren Trinklösung und Zeitpunkt konnte für die meisten untersuchten Areale ein Einfluß auf die Expression von *c-fos* gefunden werden (**Tab. 2**). Das deutet an, daß das zeitliche Expressionsprofil von *c-fos* nicht grundlegend verschieden ist zwischen Wildtypen und CHL1-defizienten Tieren. Außerdem ist die Expression von *c-fos* nicht generell nach Stimulation mit einer bestimmten Trinklösung verändert, was der Einfluß des Faktors Trinklösung auf die *c-fos*-Expression sowohl in Wildtypen als auch CHL1-/- vermuten läßt. Der *Novelty*-induzierte Expressionshöhepunkt 0,5 h nach Stimulation konnte in CHL1-Mutanten in allen untersuchten Arealen, außer dem Gyrus Dentatus, gefunden werden. Das

heißt, es gab eine signifikant stärkere Expression von *c-fos* 0,5 h nach Stimulation mit einem neuen Geschmack gegenüber Wasser im anterioren cingulären Kortex ( $F_{(1,7)} = 9,126$ ;  $p = 0,0194$ ), posterioren cingulären Kortex ( $F_{(1,7)} = 20,728$ ;  $p = 0,0026$ ), Amygdala ( $F_{(1,7)} = 9,890$ ;  $p = 0,0163$ ), parietalen Kortex Schichten I-III ( $F_{(1,7)} = 6,630$ ;  $p = 0,0367$ ), parietalen Kortex Schichten IV-VI ( $F_{(1,7)} = 6,963$ ;  $p = 0,0335$ ), piriformen Kortex ( $F_{(1,7)} = 6,081$ ;  $p = 0,0431$ ) und im insularen Kortex ( $F_{(1,7)} = 10,267$ ;  $p = 0,0150$ ). Zusätzlich kam es zu einer signifikant erhöhten Dichte an *c-fos* exprimierenden Zellen 0,5 h nach Stimulation mit einem bereits vertrauten Geschmack im Vergleich zu Wasser im parietalen Kortex Schichten IV-VI ( $F_{(1,7)} = 11,601$ ;  $p = 0,0113$ ), posterioren cingulären Kortex ( $F_{(1,7)} = 9,467$ ;  $p = 0,0179$ ) sowie anterioren cingulären Kortex ( $F_{(1,7)} = 6,566$ ;  $p = 0,0374$ ). Auch in den CHL1-Mutanten kam es, wie in den Wildtypen, zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den Stimulationsgruppen 1 h, 4,5 h oder 6 h nach Stimulationsbeginn.

Im Vergleich zu Wildtypen zeigten CHL1-defiziente Tiere 0,5 h nach Stimulation mit Saccharin als vertrautem Geschmack signifikant mehr *c-fos* positive Zellen im parietalen Kortex Schichten IV-VI ( $F_{(1,8)} = 5,982$ ;  $p = 0,0402$ ), posterioren cingulären Kortex ( $F_{(1,8)} = 6,561$ ;  $p = 0,0336$ ) sowie anterioren cingulären Kortex ( $F_{(1,8)} = 8,001$ ;  $p = 0,0222$ ; **Abb. 12**). In diesen Arealen führte die Stimulation mit Saccharin als neuem oder vertrautem Geschmack zu ähnlich erhöhten Dichten an *c-fos*-positiven Zellen.

Amygdala: Die *c-fos* Expression differierte zwischen den Versuchsgruppen abhängig vom Genotyp und dem Zeitpunkt der Dekapitation (Interaktion zwischen Genotyp und Zeitpunkt  $F_{(3,80)} = 2,881$ ;  $p = 0,0410$ ). Das deutete an, daß in CHL1-defizienten Mäusen das zeitliche Expressionsmuster von *c-fos* verändert war (**Abb. 12**). Dieser Effekt kam hauptsächlich durch eine erhöhte Dichte an *c-fos* exprimierenden Zellen in CHL1<sup>-/-</sup>, verglichen mit Wildtypen, 0,5 h nach Präsentation von Saccharin als neuem sowie 0,5 h und 4,5 h nach Präsentation als bereits bekanntem Geschmack zustande. Diese Unterschiede erreichten allerdings kein Signifikanzniveau. Das ist ein Hinweis darauf, daß in der Amygdala das Fehlen des CHL1-Moleküls zu einer verstärkten *c-fos*-Expression induziert durch Saccharin als neuem und bereits vertrautem Geschmack führte.

In allen anderen untersuchten Hirnarealen konnte weder eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Zeitpunkt noch zwischen Genotyp und Trinklösung gefunden werden. Das legt den Schluß nahe, daß in CHL1-defizienten Tieren die differenzierte Expression von *c-fos* nach Stimulation mit den drei Trinklösungen und auch das zeitliche Expressionsprofil in diesen Arealen nicht verändert war.



**Abb. 12: Ergebnisse der Taste-Novelty für Amygdala und frontalem cingulären Kortex**

Vergleich zwischen Amygdala (A, C, E) und anteriorem cingulären Kortex (B, D, F). Die Gruppe der Wildtypen (WT) ist in schwarz und die der CHL1-defizienten Tiere (CHL1<sup>-/-</sup>) in grau dargestellt. (\*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ )

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß CHL1-defiziente Tiere nach gustatorischer Stimulation in den meisten untersuchten Hirnarealen signifikant mehr *c-fos* exprimierten als Wildtypen. CHL1-defiziente Tiere zeigten wie Wildtypen 0,5 h nach Stimulation ein *Novelty*-induziertes Expressionsmaximum von *c-fos*. Zusätzlich wiesen CHL1-defiziente Tiere in den cingulären Kortizes vergleichbare Dichten an *c-fos*-exprimierenden Zellen 0,5 h nach Stimulation mit einer neuen oder einer vertrauten Saccharinlösung auf.

#### 4.1.1.2.2 *arg3.1/arc*-mRNA-Expression

Das IEG *arg3.1/arc* gehört zur Gruppe der Effektor-Gene, bei denen eine direkte Beteiligung an Vorgängen synaptischer Plastizität vermutet wird. Wie Montag-Sallaz *et al.* (1999) zeigen konnten, kann eine signifikant erhöhte Expression des IEG *arg3.1/arc* durch einen neuen Geschmack in C57BL/6-Mäusen induziert werden.

##### 4.1.1.2.2.1 *arg3.1/arc*-Expression in Wildtyp-Geschwister-Tieren

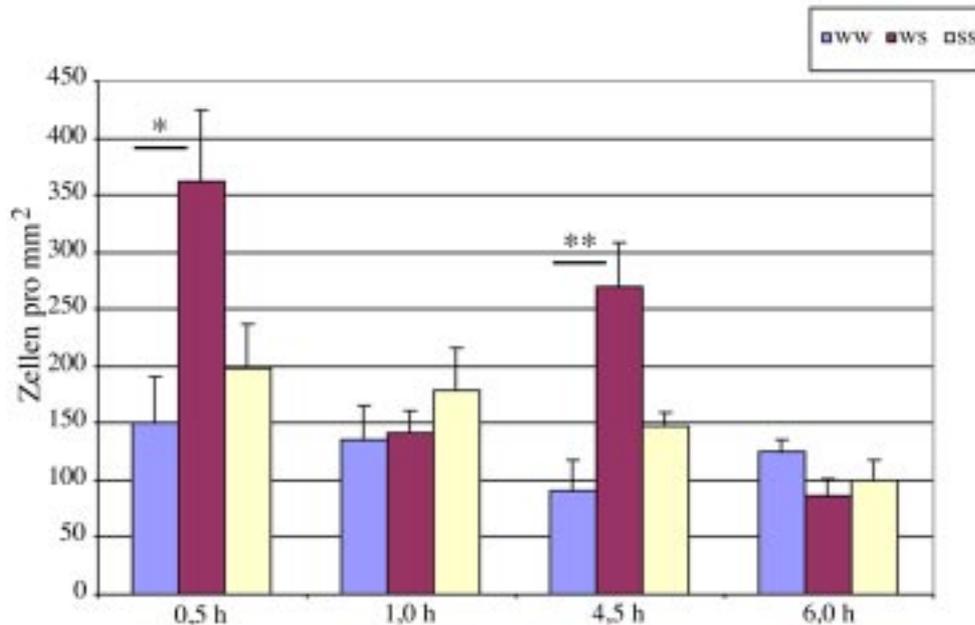
In Wildtyp-Mäusen zeigte sich nach gustatorischer Stimulation ein charakteristischer Expressionsverlauf. 0,5 h und 4,5 h nach Stimulation mit Saccharin als neuem Geschmack konnte ein Expressionsmaximum von *arg3.1/arc*-mRNA detektiert werden, bevor die Expression wieder zurückging.

Areal	0,5 h	4,5 h
Gyrus Dentatus	$F_{(1,7)} = 8,552; p = 0,0222$	$F_{(1,8)} = 7,933; p = 0,0226$
anteriöer cingulärer Kortex	$F_{(1,7)} = 6,976; p = 0,0334$	$F_{(1,8)} = 14,370; p = 0,0053$
posteriöer cingulärer Kortex	$F_{(1,7)} = 4,285; n.s.$	$F_{(1,8)} = 10,836; p = 0,0110$
Amygdala	$F_{(1,7)} = 18,990; p = 0,0033$	$F_{(1,8)} = 5,973; p = 0,0403$
parietaler Kortex Schichten I-III	$F_{(1,7)} = 4,808; n.s.$	$F_{(1,8)} = 13,764; p = 0,0060$
parietaler Kortex Schichten IV-VI	$F_{(1,7)} = 10,030; p = 0,0158$	$F_{(1,8)} = 14,446; p = 0,0052$
piriformer Kortex	$F_{(1,7)} = 5,095; n.s.$	$F_{(1,8)} = 1,601; n.s.$
insularer Kortex	$F_{(1,7)} = 6,146; p = 0,0423$	$F_{(1,8)} = 15,161; p = 0,0046$

**Tab. 3: Gruppenvergleich der *arg3.1/arc*-Expression in Wildtypen**

Der Vergleich der Gruppen, die mit Wasser oder Saccharin als neuer Lösung stimuliert wurden, hat mit einer ANOVA und dem Scheffé's *post-hoc*-Test signifikante Unterschiede 0,5 h und 4,5 h nach Stimulation, nicht aber nach 1 h und 6 h, aufgezeigt. Die Stimulation mit Saccharin als neuem Geschmack induziert signifikant mehr *arg3.1/arc* als Wasser. n.s. – nicht signifikant

Diese *Novelty*-typischen Expressionsmaxima 0,5 h und 4,5 h nach Stimulation im Vergleich zur Wasser-Gruppe konnten für Wildtyp-Geschwister der CHL1-defizienten Tiere in den meisten untersuchten Hirnarealen gefunden werden (**Tab. 3**). In diesen Arealen war die Expression 0,5 h und 4,5 h nach Stimulation mit Saccharin als neuem Geschmack signifikant stärker als nach Gabe von Wasser. In keinem der untersuchten Areale gab es zu den vier verschiedenen Zeitpunkten einen signifikanten Unterschied in der *arg3.1/arc* Expression zwischen der Stimulation mit einem vertrauten Geschmack oder Wasser.



**Abb. 13: *arg3.1/arc*-Expression im anterioren cingulären Kortex von Wildtyp-Mäusen**

Die Zahl der durchschnittlich markierten Zellen pro  $\text{mm}^2$  mit Standardfehler zu den vier verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation ist angegeben. ww – neutraler Geschmack, ws – Saccharin als neuer Geschmack, ss – Saccharin als vertrauter Geschmack (Gruppenvergleich mit Scheffe's *post-hoc*-Test: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ )

Die **Abb. 13** zeigt beispielhaft für den anterioren cingulären Kortex, wie das Expressionsprofil von *arg3.1/arc* in Wildtypen nach Stimulation im *Taste-Novelty*-Paradigma aussieht. Ausschließlich 0,5 h und 4,5 h nach Stimulation konnten signifikante Gruppenunterschiede gefunden werden. Dies bedeutet, nicht der Geschmack von Saccharin induziert eine erhöhte *arg3.1/arc* Expression sondern die Qualität ‚neu‘. Ein vertrauter Geschmack hat keine erhöhte Expression von *arg3.1/arc* zur Folge.

#### 4.1.1.2.2 Vergleich der *arg3.1/arc* Expression in CHL1-defizienten Mäusen und Wildtypen

Es konnte ein signifikanter Effekt des Genotyps auf die Expression von *arg3.1/arc* in der Amygdala gefunden werden (Genotypeffekt:  $F_{(1,83)} = 4,054$ ;  $p = 0,0473$ ; *post-hoc*  $p =$

0,0311). CHL1-defiziente Tiere exprimierten im *Taste-Novelty*-Paradigma weniger *arg3.1/arc* als Wildtypen unabhängig von der Stimulation und dem Zeitpunkt. Auch im piriformen Kortex hatte der Genotyp einen Effekt auf die Expression von *arg3.1/arc*, so daß in CHL1-defizienten Tiere weniger *arg3.1/arc*-positive Zellen registriert werden konnten (Genotyp:  $F_{(1,82)} = 17,936$ ;  $p < 0,0001$ ; *post-hoc*  $p < 0,0001$ ). In allen weiteren untersuchten Arealen konnte kein Effekt des Genotyps auf die *arg3.1/arc*-Expression gefunden werden.

Die ANOVA erbrachte außerdem einen signifikanten Effekt der Trinklösung und einen Einfluß des Zeitpunktes auf die Expression von *arg3.1/arc* (**Tab. 4**). Das deutet an, daß der generelle zeitliche Expressionsverlauf von *arg3.1/arc* ist in WT und CHL1-defizienten Tieren gleich war und kein Effekt einer bestimmten Trinklösung auf die Induktion von *arg3.1/arc* vorlag.

Areal	Trinklösung	Zeitpunkt
anteriorer cingulärer Kortex	$F_{(2,84)} = 15,522$ ; $p < 0,0001$	$F_{(3,84)} = 17,061$ ; $p < 0,0001$
insularer Kortex	$F_{(2,84)} = 28,569$ ; $p < 0,0001$	$F_{(3,84)} = 13,268$ ; $p < 0,0001$
posteriorer cingulärer Kortex	$F_{(2,83)} = 28,259$ ; $p < 0,0001$	$F_{(3,83)} = 19,332$ ; $p < 0,0001$
Amygdala	$F_{(2,83)} = 26,539$ ; $p < 0,0001$	$F_{(3,83)} = 12,232$ ; $p < 0,0001$
parietaler Kortex Schichten I-III	$F_{(2,83)} = 16,316$ ; $p < 0,0001$	$F_{(3,83)} = 20,822$ ; $p < 0,0001$
parietaler Kortex Schichten IV-VI	$F_{(2,84)} = 16,544$ ; $p < 0,0001$	$F_{(3,84)} = 28,906$ ; $p < 0,0001$
piriformer Kortex	$F_{(2,82)} = 3,645$ ; $p = 0,0304$	$F_{(3,82)} = 7,696$ ; $p = 0,0001$
Gyrus Dentatus	$F_{(2,84)} = 1,315$ ; n.s.	$F_{(3,84)} = 0,991$ ; n.s.

**Tab. 4: Varianzanalyse (ANOVA) für die Ergebnisse der Expression von *arg3.1/arc***

Eine ANOVA erbrachte für fast alle untersuchten Areale einen signifikanten Einfluß der Faktoren Trinklösung und Zeitpunkt auf die Expression von *arg3.1/arc*. n.s. – nicht signifikant

piriformer Kortex: Der oben beschriebene Einfluß des Genotyps auf die verringerte *arg3.1/arc*-Expression in den Mutanten im Vergleich zu den Wildtypen erreichte Signifikanz 0,5 h ( $F_{(1,8)} = 5,865$ ;  $p = 0,0417$ ) nach Gabe eines neuen und 1 h ( $F_{(1,8)} = 9,379$ ;  $p = 0,0155$ ) nach Gabe eines vertrauten Geschmacks. Der Hauptunterschied zwischen CHL1-Mutanten und Wildtypen war das Fehlen der beiden *Novelty*-induzierten *arg3.1/arc*-Expressionsmaxima in den Mutanten.

Amygdala: Die *arg3.1/arc* Expression war in Abhängigkeit vom Genotyp des Tieres, der Trinklösung sowie dem Zeitpunkt der Dekapitation unterschiedlich (Interaktion zwischen Genotyp, Trinklösung und Zeitpunkt:  $F_{(6,83)} = 3,040$ ;  $p = 0,0097$ ). Das heißt, die Abwesenheit von CHL1 veränderte die durch Gabe der verschiedenen Trinklösungen induzierte *arg3.1/arc*-Expression. Der größte Unterschied zwischen CHL1-Mutanten und Wildtypen war die

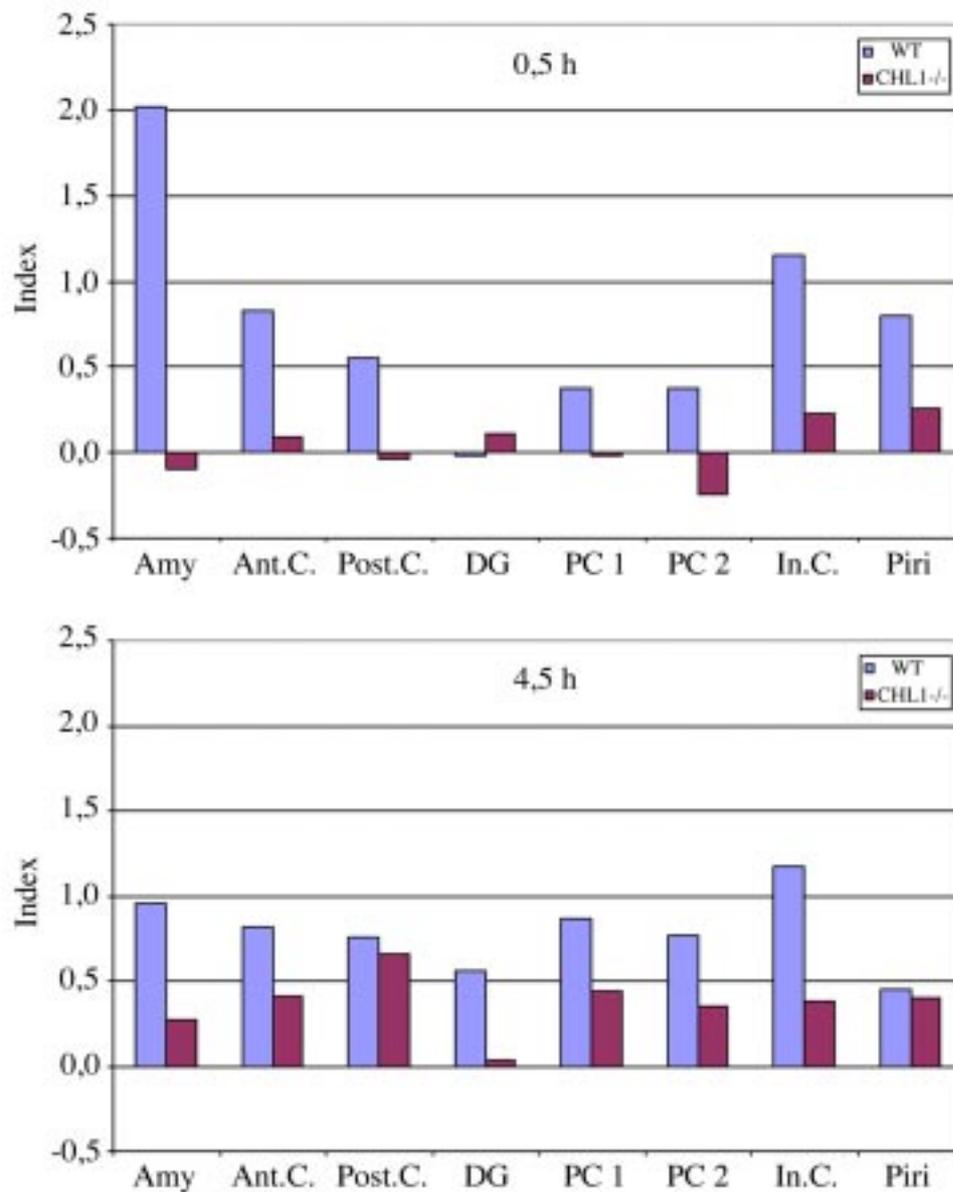
verstärkte *arg3.1/arc*-Expression in den Mutanten 0,5 h nach Stimulation mit einer vertrauten Lösung ( $F_{(1,8)} = 12,953$ ;  $p = 0,0070$ ) sowie die verringerte Expression in den Mutanten 0,5 h ( $F_{(1,8)} = 6,873$ ;  $p = 0,0306$ ) nach Gabe des neuen Geschmacks (**Abb. 12**). Die *arg3.1/arc*-Expression war in den CHL1-defizienten Tieren auch 4,5 h nach Stimulation mit einem vertrauten Geschmack erhöht, erreichte aber kein Signifikanzniveau.

In der Amygdala war das zeitliche Expressionsmuster von *arg3.1/arc* in den CHL1-Mutanten nach Präsentation von Saccharin als vertrautem Geschmack vergleichbar mit dem Expressionsmuster nach Präsentation von Saccharin als neuem Geschmack.

Schichten IV-VI des parietalen Kortex: Das Fehlen von CHL1 hat das Expressionmuster von *arg3.1/arc* als Antwort auf die verschiedenen Trinklösungen zu den verschiedenen Zeitpunkten verändert (Genotyp x Trinklösung x Zeit:  $F_{(2,84)} = 3,995$ ;  $p = 0,0220$ ). In der Gruppe der vertraut gemachten CHL1<sup>-/-</sup> Tiere war die *arg3.1/arc* mRNA Expression erhöht, in der *Novelty*-Gruppe leicht verringert und unverändert in der Wassergruppe. Diese Effekte erreichten aber keine Signifikanz.

Vergleichbare Expressionslevel von *arg3.1/arc* in CHL1<sup>-/-</sup> 0,5 h nach Stimulation mit einem neuen oder vertrauten Geschmack illustriert auch die Darstellung der relativen Induktion (**Abb. 14**). Dazu wurde das Verhältnis (Summe markierter Zellen nach neuem Geschmack ÷ Summe markierter Zellen nach vertrautem Geschmack - 1) berechnet. Ein Index > 0 zeigt eine höhere Induktion durch einen neuen Geschmack an, während ein Index ≤ 0 keine oder eine identische Induktion durch einen neuen oder vertrauten Geschmack angibt. Für Wildtyp-Geschwister war 0,5 h nach Stimulation in allen Arealen außer dem Gyrus Dentatus ein positiver Index zu finden. Dagegen lag der Index bei den CHL1-defizienten Tieren in allen Arealen in der Nähe vom Nullpunkt. Während in Wildtypen der positive Index eine höhere Expression nach *Novelty*-Stimulation anzeigt, gab es in CHL1-defizienten Tieren eine gleichförmige Expression von *arg3.1/arc*. Diese Unterschiede fehlten 4,5 h nach Stimulation oder waren nicht mehr so deutlich ausgeprägt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, in CHL1-defizienten Tieren induzierte Saccharin als vertrauter Geschmack erhöhte *arg3.1/arc*-mRNA-Expressionen nach 0,5 h und 4,5 h in allen untersuchten Arealen, mit Ausnahme des Gyrus Dentatus und des piriformen Kortex. Durch die gleichzeitige Reduktion der *Novelty*-induzierten Expressionsmaxima im Vergleich zu Wildtypen waren in CHL1-defizienten Tieren nach Stimulation mit Saccharin als neuem oder als vertrautem Geschmack ähnliche *arg3.1/arc*-Expressionsmaxima zu beobachten.



**Abb. 14: Relative Induktion von *arg3.1/arc* in CHL1-defizienten Tieren (CHL1<sup>-/-</sup>) und Wildtypen (WT) 0,5 h und 4,5 h nach Stimulation.**

Amy – Amygdala, Ant.C. – anteriorer cingulärer Kortex, Post.C. – posteriorer cingulärer Kortex, DG – Gyrus Dentatus, PC 1 – parietaler Kortex Schichten I-III, PC 2 – parietaler Kortex Schichten IV-VI, In.C. – insularer Kortex, Pi – piriformer Kortex

#### 4.1.1.3 Zusammenfassung der Taste-Novelty-Ergebnisse

Die *Taste-Novelty*-Studie hat einige Unterschiede in der Ausprägung der verwendeten Aktivitätsmarker zwischen Wildtypen und CHL1-defizienten Tieren aufgezeigt. Die 2DG-Anreicherung zeigte in diesem Paradigma keine sehr starken Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Nach Stimulation mit einem neutralen Geschmack wiesen die Amygdala und der anteriore cinguläre Kortex der Mutanten aber eine signifikant höhere bzw. niedrigere

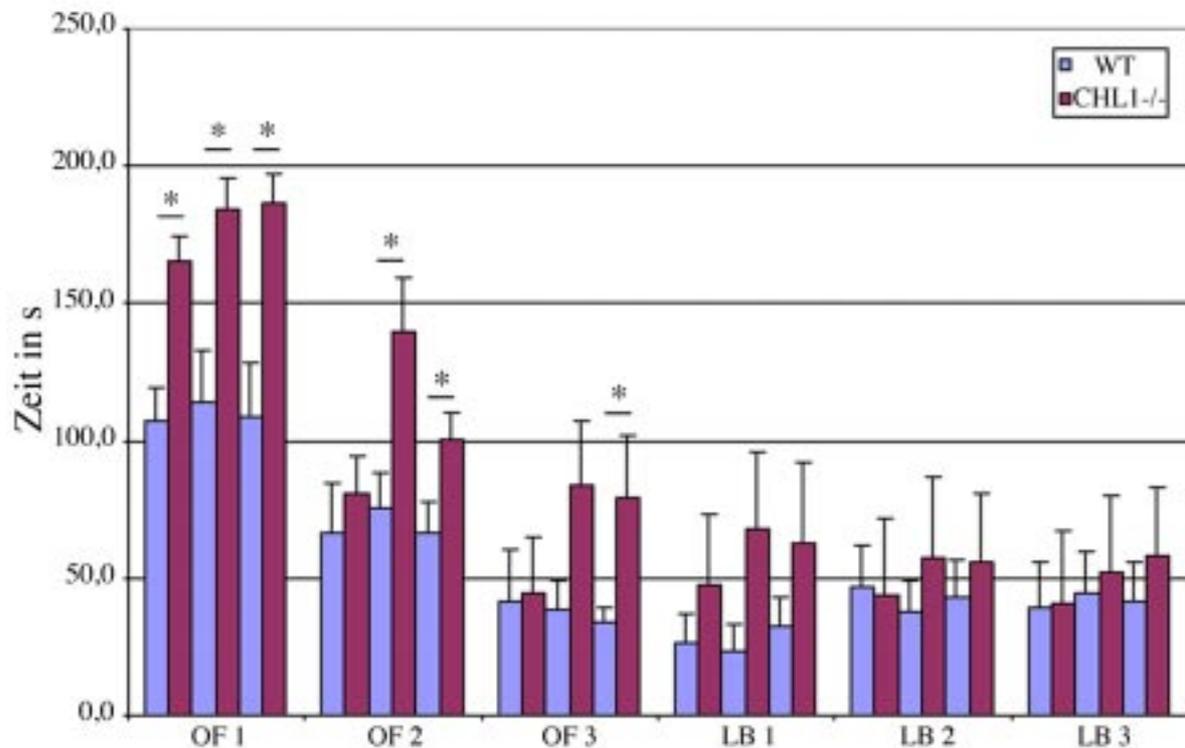
Anreicherung gegenüber Wildtypen auf. Die mRNA von *c-fos* war nach gustatorischer Stimulation in CHL1<sup>-/-</sup> signifikant stärker exprimiert als in Wildtypen (außer im Gyrus Dentatus). Zusätzlich gab es in den cingulären Kortizes CHL1-defizienter Tiere ähnliche Expressionen nach Stimulation mit Saccharin als neuem oder vertrautem Geschmack. Die Expression der mRNA von *arg3.1/arc* war in CHL1-defizienten Tieren in den meisten untersuchten Arealen, mit Ausnahme des piriformen Kortex und des Gyrus Dentatus, vergleichbar hoch nach Stimulation mit einem neuen oder einem vertrauten Geschmack. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß in CHL1-defizienten Tieren Prozesse der Informationsverarbeitung verändert sind. Dies könnte zu einer gestörten Erkennung von neuen bzw. vertrauten Stimuli führen.

#### 4.1.2 Offenfeld-Lochbrett-Test

Die Ergebnisse der *Taste-Novelty* ließen eine möglicherweise gestörte Verarbeitung bzw. Erkennung von neuen oder vertrauten Reizen in CHL1-defizienten Tieren vermuten. Zur Überprüfung dieser Theorie wurden Versuche durchgeführt, bei denen Verhaltensäußerungen erfaßt werden können, die Rückschlüsse auf Unterschiede im Erkennen und Erinnern neuer und vertrauter Reize zulassen. Der Offenfeld-Lochbrett-Test ist eine Möglichkeit das Verhalten von Mäusen in einer zuerst neuen und später vertrauten Umgebung zu untersuchen (File, 2001). Dabei spielen sowohl Habituation, die schnelle Adaption der Verhaltensantwort, sowie Familiarisierung, das Lernen und spätere Wiedererkennen von distinkten Reizen, eine Rolle. Beim Offenfeld-Lochbrett handelt es sich um eine quadratische Box, dessen Boden durch eine Platte mit 16 Löchern ersetzt werden kann. Für den Test wurden 12 Wildtypen und 10 CHL1-defiziente Tiere drei Tage je 15 min in das Offenfeld und anschließend drei Tage je 15 min auf das Lochbrett gesetzt. Dabei sollte herausgefunden werden, ob in CHL1-Mutanten durch ein verändertes Verhalten auf Defizite oder Veränderungen im Kennenlernen und Wiedererkennen von Habitaten geschlossen werden kann. Dazu wurde der gesamte Test auf VHS aufgenommen und verschiedene Verhaltensparameter, wie Aktivität und Weglängen, erfaßt und statistisch ausgewertet. Zum einen wurde eine ANOVA mit Genotyp und Tag als Faktor durchgeführt und zum anderen wurden die Gruppenmittelwerte mit einer 1-Wege-ANOVA und dem Scheffe's *post-hoc*-Test verglichen.

Für den Offenfeld-Lochbrett-Test wurde ein Effekt des Genotyps auf die verbrachte Zeit im Zentrum der Arena gefunden ( $F_{(1,120)} = 10,301$ ;  $p = 0,0017$ ; *post-hoc*  $p = 0,0017$ ). Die CHL1<sup>-/-</sup> hielten sich über die gesamten Versuchstage während der 15 min Versuchszeit

signifikant länger im Zentrum der Versuchsbox auf als ihre Wildtyp-Geschwister. Dieser Unterschied wurde für den ersten Versuchstag signifikant ( $F_{(1,20)} = 14,865$ ;  $p = 0,0010$ ).

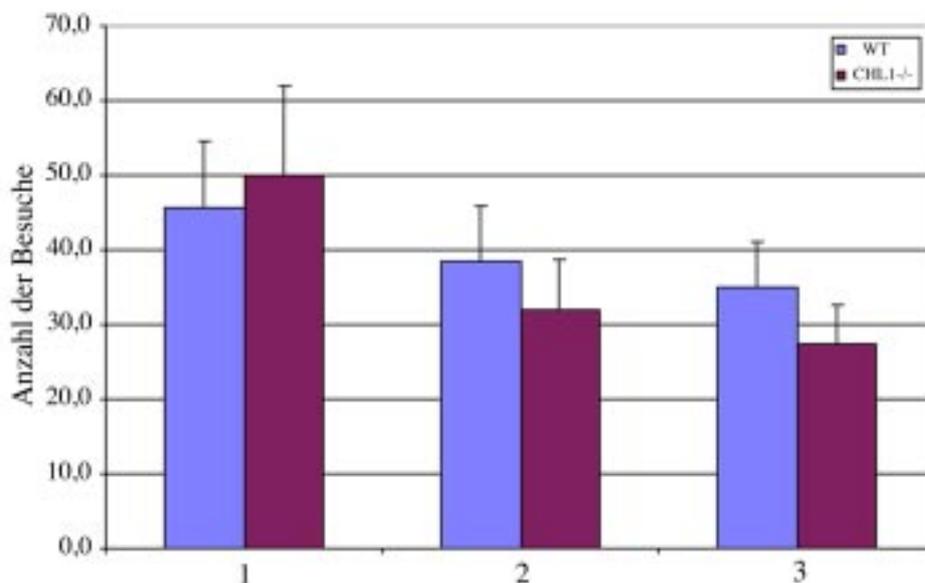


**Abb. 15: Verbrachte Zeit im Zentrum des Offenfeld-Lochbretts**

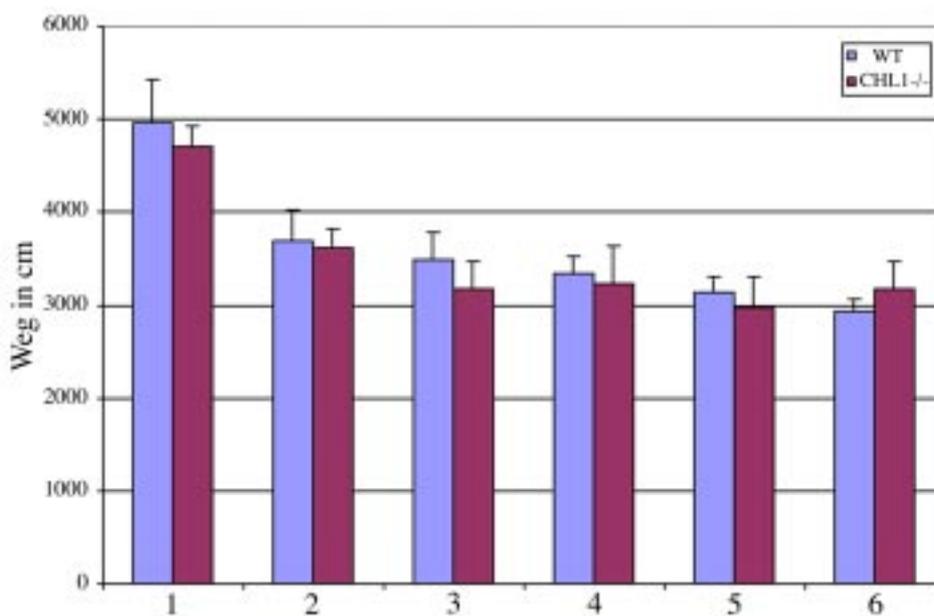
Die Zeit im Zentrum des Offenfeld-Lochbretts in Sekunden mit Standardfehler ist für Wildtypen (WT) und CHL1-Mutanten (CHL1-/-) angegeben. Die CHL1-Mutanten haben mehr Zeit im Zentrum verbracht als die Wildtypen. Der Versuchszeitraum pro Tag (15 min) ist in 5-Minuten-Schritte (0-5 min; 5-10 min; 10-15 min) unterteilt. OF – Offenfeld, LB - Lochbrett

Auch die Unterteilung der 15 min Versuchszeit pro Tag in 5 min Abschnitte verdeutlicht diesen Unterschied zwischen CHL1-defizienten Tieren und Wildtypen (**Abb. 15**). An den ersten drei Versuchstagen gibt es signifikante Unterschiede beim Vergleich der Versuchsgruppen. Die CHL1-defizienten Tiere verbrachten mehr Zeit im Zentrum der Offenfeld-Box als ihre Wildtyp-Geschwister.

Alle weiteren untersuchten Parameter, z.B. Häufigkeit und Zeit der Untersuchung der Löcher, zeigten entweder keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf (**Abb. 16**), oder die gefundenen Unterschiede waren darauf zurückzuführen, daß die Mutanten mehr Zeit im Zentrum als am Rand des Offenfeld verbrachten. So legten die Mutanten bei gleicher Gesamtweglänge wie die Wildtypen (**Abb. 17**) signifikant mehr Weg im Zentrum des Offenfeld zurück (Genotyp:  $F_{(1,120)} = 9,588$ ;  $p = 0,0024$ ; *post-hoc*  $p = 0,0024$ ). Außerdem konnte ein Effekt des Tages auf die Gesamtweglänge gefunden werden (Tag:  $F_{(5,120)} = 10,346$ ;  $p = 0,0024$ ; *post-hoc*  $p < 0,0001$ ). Sowohl Wildtypen als auch CHL1-Mutanten zeigten mit zunehmender Vertrautheit der Arena eine geringere Grundaktivität in Form von Laufen (**Abb. 17**).



**Abb. 16: Häufigkeit der Loch-Inspektionen im Lochbrett**  
Darstellung der Häufigkeit der Loch-Inspektionen mit Standardfehler während der drei Versuchstage im Lochbrett-Test. Wildtypen (WT); CHL1-defiziente Tiere (CHL1-/-)



**Abb. 17: Gesamtweglänge mit Standardfehler im Offenfeld-Lochbrett-Test.**  
Es gab keine signifikanten Unterschiede in der in 15 min zurückgelegten Wegstrecke zwischen CHL1-defizienten Tieren (CHL1-/-) und Wildtypen (WT).

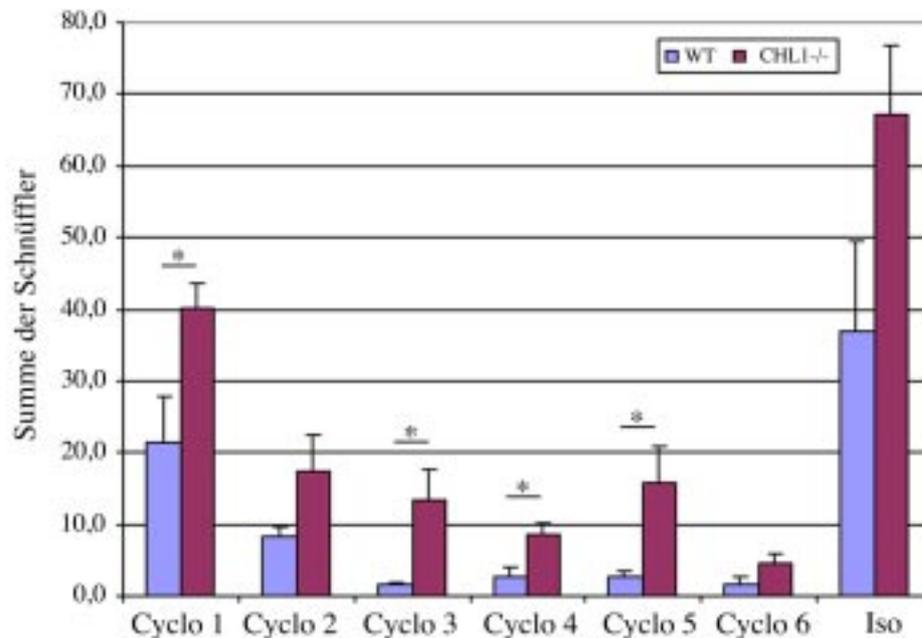
Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die CHL1-Mutanten bei gleicher Grundaktivität mehr Zeit im Zentrum des Offenfeld-Lochbretts verbrachten als die Wildtypen. Dieser Unterschied wurde für den ersten Tag signifikant. Sowohl Wildtypen als auch CHL1-defiziente Tiere haben mit zunehmender Vertrautheit der Box eine geringere Grundaktivität gezeigt. Das impliziert, daß beide Gruppen in der Lage sind, eine zuerst neue Umgebung bei wiederholter Exposition als bekannt zu erkennen. Somit scheint in einem räumlichen

multimodalen Lerntest keine Störung in der *Novelty*-Erkennung bzw. Familiarisierung bei CHL1-Defizienz vorzuliegen.

#### 4.1.3 Geruchs-Kennenlern-Test

Die *Taste-Novelty* ist sehr gut geeignet, molekulare und metabolische Veränderungen im Gehirn nach Stimulation mit neuen bzw. vertrauten Reizen zu erfassen. Dieser Test erlaubt aber keine Rückschlüsse auf die Lernleistung der Tiere, da keine Verhaltensäußerungen der Versuchsobjekte gemessen werden können. Zur Überprüfung der *Novelty*-Erkennung eines einzelnen Stimulus wurde ein Geruchs-Kennenlern-Test entwickelt. Dieser Test erlaubt es, das Verhalten der Tiere auf die Geruchsstimulation zu erfassen. Der Test orientierte sich am Zeitverlauf des *Taste-Novelty*-Tests. Das heißt, die 6 Wildtypen und 5 CHL1-/- bekamen für sechs Tage je 30 min einen bestimmten Geruch (Cyclohexanon; Amaretto-Mandel-Geruch) präsentiert. Am siebten Versuchstag wurden die Tiere dann mit einem anderen Geruch (Isoamylacetat: fruchtiger Geruch nach Banane) stimuliert. Das Verhalten der Tiere wurde mittels VHS aufgenommen und dann analysiert. Dazu wurden verschiedene Parameter untersucht, wie die zurückgelegte Wegstrecke, die Anzahl des Aufrichtens, der Aufenthalt in bestimmten Zonen des Käfigs, sowie die Häufigkeit des Schnüffeln an der Geruchsquelle. Es wurde eine ANOVA mit Genotyp und Sitzung als Faktoren durchgeführt, der Scheffé's *post-hoc*-Test angewendet und die Gruppenmittelwerte mit einer 1-Wege-ANOVA verglichen. Damit sollte festgestellt werden, ob die Veränderungen in der IEG-Expression sowie 2DG-Anreicherung in verschiedenen Hirnarealen nach Stimulation neuer und vertrauter Stimuli sich auch in einer Verhaltensäußerung erfassen lassen, die eine gestörte Erkennung von neuen oder vertrauten Einzelstimuli dokumentieren.

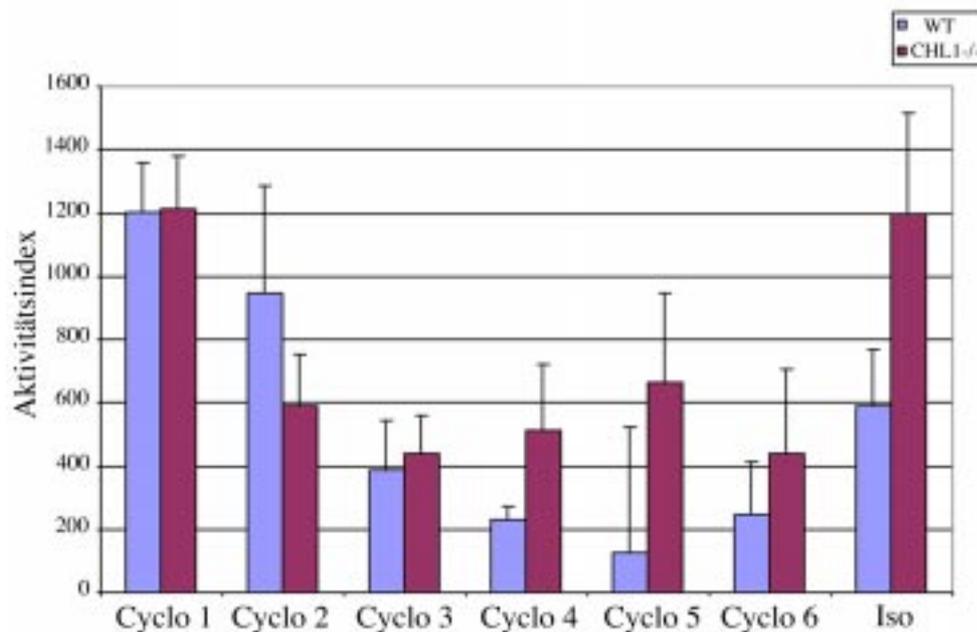
Für den Geruchs-Kennenlern-Test wurde ein Effekt des Genotyps auf die Anzahl des Schnüffeln an der Geruchsquelle festgestellt (Genotyp:  $F_{(1,54)} = 13,945$ ;  $p = 0,0047$ ; *post hoc*  $p = 0,0047$ ). Das heißt, die CHL1-defizienten Tiere haben häufiger geschnüffelt, als ihre Wildtyp-Geschwister. Dieser Effekt wurde signifikant für den ersten ( $F_{(1,9)} = 6,035$ ;  $p = 0,0364$ ), dritten ( $F_{(1,9)} = 9,636$ ;  $p = 0,0126$ ), vierten ( $F_{(1,9)} = 9,760$ ;  $p = 0,0122$ ) und fünften ( $F_{(1,9)} = 7,613$ ;  $p = 0,0221$ ) Tag der Stimulation mit Cyclohexanon (**Abb. 18**). Es wurde unabhängig vom Genotyp ein Effekt des Tages auf die Anzahl des gezielten Schnüffeln gefunden ( $F_{(6,54)} = 25,021$ ;  $p < 0,0001$ ) (**Abb. 18**). Das bedeutet, beide Gruppen haben bei wiederholter Präsentation von Cyclohexanon immer weniger Interesse in Form von Schnüffeln gezeigt. Bei Präsentation eines neuen Geruchs nahm das Schnüffeln wieder zu.



**Abb. 18: Häufigkeit der Schnüffler im Geruchs-Kennlern-Test**  
 Die mittlere Summe der Schnüffler in den ersten 5 min nach Beginn der Stimulation mit Standardfehler ist für die 7 Versuchstage angegeben. Die Mutanten (CHL1<sup>-/-</sup>) haben meist häufiger am Geruch geschnüffelt als ihre Wildtyp-Geschwister (WT). Cyclo – Cyclohexanone, Iso - Isoamylacetat

Die zurückgelegte Gesamtweglänge an den 7 Versuchstagen unterschied sich bei den Versuchsgruppen weder in den ersten 5 min der Stimulation noch in einem längeren Zeitraum (15 min). Das heißt, die Grundaktivität scheint in Abwesenheit von CHL1 nicht verändert zu sein. Auch der Aufenthalt in bestimmten Zonen des Käfigs war zwischen den Gruppen nicht unterschiedlich.

Die mittels Motilitätsplattformen erfaßten Aktivitäten zeigten ebenfalls keinen Unterschied zwischen den Mutanten und den Wildtypen. Durch Bestimmen des Aktivitätsindex (Summe der Messwerte 5 min nach - Summe der Meßwerte 5 min vor Stimulation) konnte sowohl für Wildtypen als auch für CHL1-defiziente Tiere ein Einfluß des Tages gefunden werden (Tag:  $F_{(6,54)} = 6,784$ ;  $p < 0,0001$ ). Ein positiver Index zeigt an, daß die Tiere während der Stimulation aktiver waren als vor Beginn der Geruchspräsentation (**Abb. 19**). Das heißt, das zeitliche Muster der Aktivität in Abhängigkeit vom Tag der Geruchspräsentation war für beide Gruppen gleich und durch die Abwesenheit des CHL1-Moleküls nicht beeinflußt. Beide Versuchsgruppen zeigten eine Familiarisierungskurve. Das bedeutet, nach Präsentation eines neuen Geruchs sind die Tiere interessierter und zeigen eine höhere Aktivität, als nach Präsentation eines über mehrere Tage vertraut gemachten Geruchs. Ein neuer Geruch an Tag 7 induzierte dann wiederum eine stärkere Aktivität.



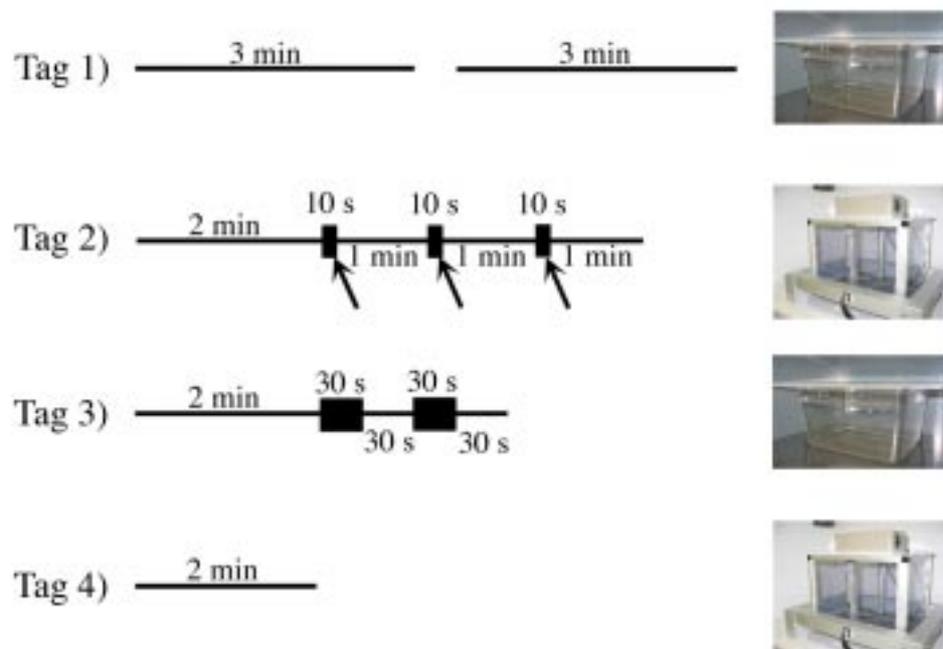
**Abb. 19: Aktivitätsindex im Geruchs-Kennenlern-Test**  
 Der Aktivitätsindex mit Standardfehler (Summe der Aktivität 5 min nach Beginn minus Summe der Aktivität 5 min vor Beginn der Stimulation), bestimmt mit Motilitätsplattformen, ist für die sieben Versuchstage aufgetragen. Cyclo: Cyclohexanon, Iso: Isoamylacetat.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Abwesenheit von CHL1 in einem Geruchs-Kennenlern-Test zu häufigerem Schnüffeln führt, die Grundaktivität und auch die Lernleistung scheinen aber unbeeinflusst zu sein. Weder Offenfeld-Lochbrett-Test noch Geruchs-Kennenlern-Test stützen die Theorie der gestörten *Novelty*-Erkennung CHL1-defizienter Tiere, welche aus den Ergebnissen der *Taste-Novelty* formuliert wurde.

#### 4.1.4 Angst-Konditionierung

Die größere Offenfeld-Präferenz CHL1-defizienter Tiere im Vergleich zu Wildtypen lassen Veränderungen emotionaler Prozesse vermuten, die besonders von der Amygdala gesteuert werden. In der Amygdala waren zudem besonders deutliche Unterschiede in der Ausprägung der Aktivitätsmarker im *Taste-Novelty*-Paradigma gefunden worden. Ob diese Unterschiede auf eine gestörte Funktion der Amygdala zurückzuführen sind, sollte die Durchführung einer Angst-Konditionierung klären. Bei der Angst-Konditionierung wird ein neutraler Stimulus (CS: z.B. Ton), der keine meßbare Reaktion beim Tier hervorruft, mit einem aversiven Stimulus (US: z.B. elektrischer Fußreiz), der eine starke Angstreaktion induziert, gepaart. Dabei wird der neutrale Stimulus mit der negativen Erfahrung assoziiert, so daß späterhin der ehemals neutrale Stimulus eine Angstreaktion hervorruft. Sowohl die Amygdala als auch der Hippocampus sind zentrale Elemente für diese Lernleistung. Für die Integration multimodaler sensorischer Inputs spielt der Hippocampus eine wichtige Rolle (McNish *et al.*, 1997;

Fanselow, 1998; Anagnostaras *et al.*, 2001; Maren, 2001; Otto *et al.*, 2001). Aufgrund der gefundenen Veränderungen in der Moosfaserregion von CHL1-Mutanten sollte überprüft werden, ob die Hippocampus-involvierende kontextabhängige Angst-Konditionierung in den Mutanten verändert ist. Auf der anderen Seite wurde überprüft, ob die Assoziation von CS-US in den Mutanten in gleichem Maße stattfindet wie in den Wildtypen, da veränderte IEG-Expressionen in der *Taste-Novelty* auf eine möglicherweise veränderte Funktionsweise der Amygdala hindeuteten. Zu diesem Zweck wurden 9 CHL1<sup>-/-</sup> und 10 ihrer Wildtyp-Geschwister diesem Paradigma unterzogen (**Abb. 20**).



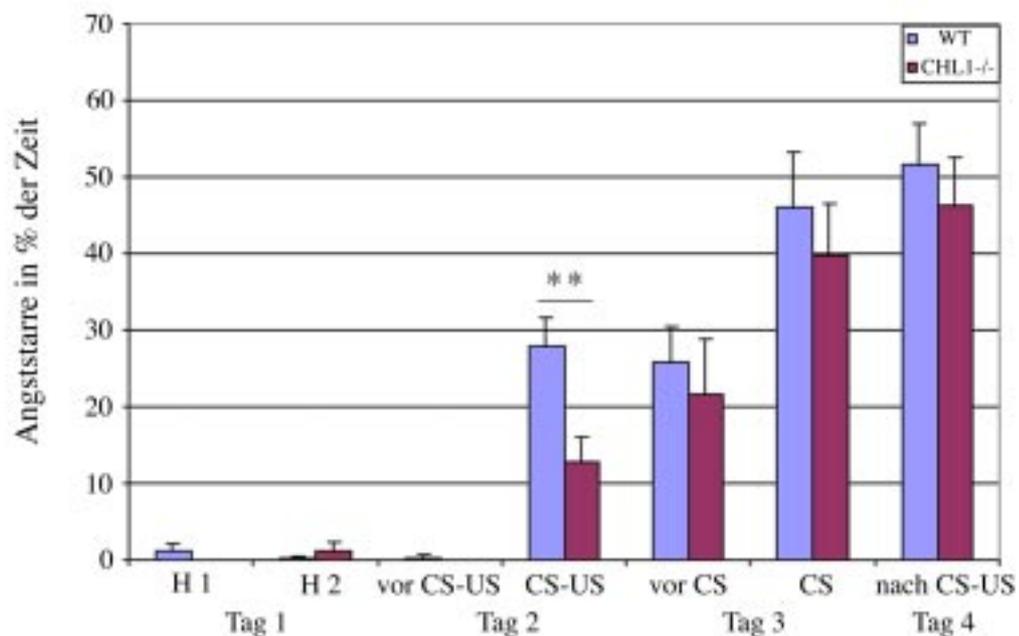
**Abb. 20: Stimulationsprotokoll der Angst-Konditionierung**

Die Konditionierung wurde an Tag 1 und 3 im neutralen Kontext und an Tag 2 und 4 im Schockkontext durchgeführt. Schwarze Boxen geben die Tonpräsentation (75 dB) an. Am zweiten Tag wurde in der letzten Sekunde der Tonpräsentation ein Fußreiz (Pfeile) mit 1 s Dauer und 0,7 mA Intensität verabreicht.

Als Parameter für Angst wurde die so genannte Angststarre mit mindestens 3 s Dauer erfaßt. Angegeben wurde dann der prozentuale Anteil Angststarre an der erfaßten Zeit. Es wurde eine ANOVA (Faktoren: Genotyp und Sitzung) durchgeführt und die Mittelwerte mit dem Scheffe's *post-hoc*-Test verglichen.

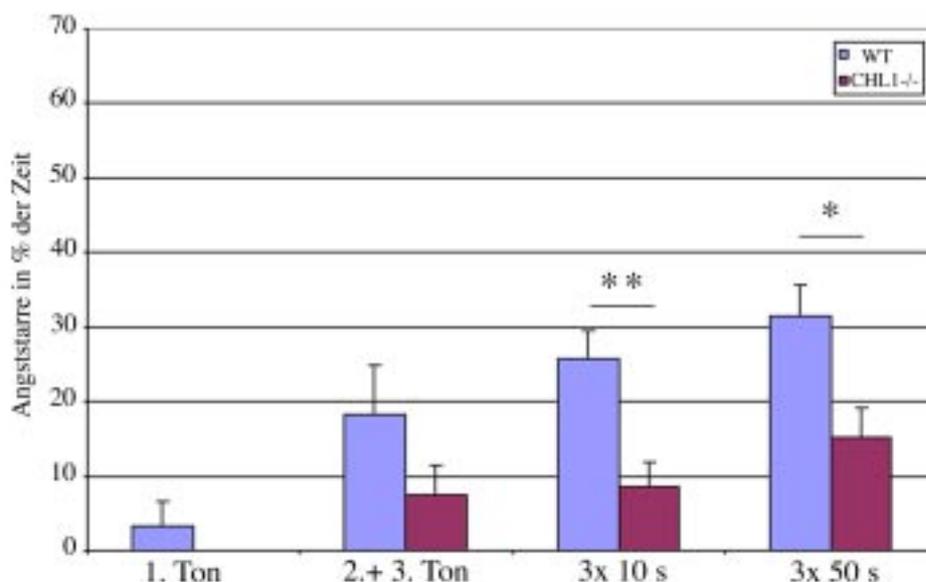
Die untersuchten CHL1-defizienten Tiere und ihre Wildtyp-Geschwister zeigten zum Versuchsbeginn nahezu keine Angststarre, weder im neutralen (**Abb. 20**: Tag 1) noch im Schockkontext (**Abb. 20**: Tag 2) (**Abb. 21**). Beide Gruppen entwickelten diese Verhaltensantwort erst nach Präsentation des Tones zeitlich gepaart mit einem Fußschock. Nach Fußschockerfahrung haben die Versuchstiere auch im neutralen Kontext Angststarre gezeigt (20 - 25 % der erfaßten Zeit), die Dauer dieser Reaktion aber während der erneuten

Präsentation des Tones annähernd verdoppelt (40 – 45 % der Zeit). Auch die erneute Exposition des Schock-Kontext am vierten Tag induziert Angststarre bei beiden Versuchsgruppen (**Abb. 21**). Für den gesamten Versuch gab es eine Tendenz der CHL1-defizienten Tiere weniger Angststarre zu zeigen als ihre Wildtyp-Geschwister (Genotypeneffekt:  $F_{(1,153)} = 4,013$ ;  $p = 0,0613$ ). Am Tag der Verknüpfung von CS-US war bei CHL1-defizienten Tieren signifikant weniger Angststarre zu erkennen als bei Wildtypen ( $F_{(1,17)} = 9,440$ ;  $p = 0,0069$ ) (**Abb. 21**).



**Abb. 21:** **Angststarre während der 4 Versuchstage in der Angst-Konditionierung**  
Der prozentuale Anteil Angststarre mit Standardfehler an der erfaßten Zeit ist für Wildtypen (WT) und CHL1-defiziente Tiere (CHL1<sup>-/-</sup>) angegeben. H1 und H2 –neutraler Kontext, vor CS-US – Schock-Kontext ohne CS oder US, CS-US – Paarung von CS-US, vor CS –neutraler Kontext ohne CS oder US, CS –neutraler Kontext und CS, nach CS-US –Schock-Kontexts ohne CS oder US (\*\*  $p < 0,01$ )

Aufgrund der signifikanten Unterschiede wurde die Konditionierungssitzung mit dreimaliger Präsentation von Ton und Schock mit Interstimulusintervalen genauer analysiert. Dazu wurden die Zeit der Tonpräsentation, die ersten 10 s nach dem Fußschock sowie die restlichen 50 s des Interstimulusintervals ausgewertet. Dabei konnte sowohl während der ersten 10 s nach Fußschock ( $F_{(1,17)} = 10,747$ ;  $p = 0,0044$ ) als auch in den restlichen 50 s Interstimulusintervall ( $F_{(1,17)} = 7,998$ ;  $p = 0,0116$ ) signifikant weniger Angststarre bei CHL1-defizienten Tieren als bei Wildtypen registriert werden (**Abb. 22**). Auch während der Ton-Präsentation zeigten die CHL1<sup>-/-</sup> weniger Angststarre. Dieser Unterschied erreichte aber weder für die Ton-Präsentation, vor dem ersten Schock, noch für die Summe der beiden folgenden Ton-Präsentationen, nach Schock-Erfahrung, Signifikanz.

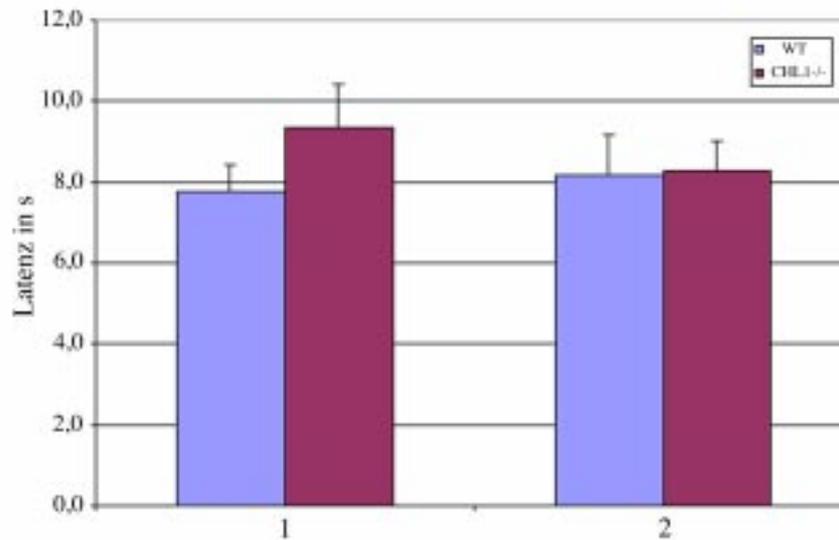


**Abb. 22: Angststarre während der Konditionierungssitzung am 2. Tag**  
 Der prozentuale Anteil Angststarre an der erfaßten Zeit mit Standardfehler ist für die drei Phasen während der Konditionierungssitzung angegeben. 10 s – ersten 10 Sekunden des Interstimulusintervals, 50 s – die letzten 50 Sekunden des Interstimulusintervals (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ )

Die Angst-Konditionierung hat gezeigt, daß sowohl Wildtypen als auch ihre CHL1-defizienten Geschwister in der Lage waren, eine Assoziation zwischen einem neutralen Ton und einem aversiven Fußschock herzustellen. Zudem konnten sich beide Versuchsgruppen an den Kontext erinnern, in dem diese Verknüpfung stattfand. Die CHL1-defizienten Tiere zeigten allerdings signifikant weniger Schock-induzierte Angststarre. Somit scheinen sowohl der Hippocampus als auch die Amygdala CHL1-defizienter Tiere nicht grundlegend in ihrer Funktion gestört und eine normale Angst-Konditionierung zu ermöglichen.

#### 4.1.5 Heiße-Platte-Analgesie-Test

Die reduzierte Schock-induzierte Angststarre bei CHL1-defizienten Tieren im Vergleich zu Wildtypen hat die Frage aufgeworfen, ob CHL1-defiziente Mäuse eine möglicherweise verminderte Schmerzwahrnehmung haben. Aus diesem Grund wurde der Heiße-Platte-Analgesie-Test durchgeführt. Dazu wurden die gleichen Tiere, die auch in der Angst-Konditionierung waren (8 CHL1-/-; 10 WT), auf eine 56,6 °C warme Platte gesetzt. Es wurde die Latenzzeit gestoppt, nach der die Tiere eine Reaktion auf die unangenehme Hitze an den Füßen zeigten. Der Versuch wurde nach einer Woche wiederholt. Die Gruppenmittelwerte wurden mit einem t-Test statistisch ausgewertet.



**Abb. 23: Reaktionszeit der Versuchsgruppen im Heiße-Platte-Analgesie-Test**  
Die Latenzzeit bis zur spezifischen Reaktion auf die heiße Platte mit Standardfehler ist für Wildtypen (WT) und Mutanten (CHL1<sup>-/-</sup>) angegeben. Weder im ersten noch im zweiten Versuch konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden.

Für die Wildtypen und CHL1-defizienten Tiere konnten keine signifikanten Unterschiede in der Reaktion auf die heiße Platte festgestellt werden (**Abb. 23**). Beide Gruppen zeigten die Reaktion auf die heiße Platte nach 7 - 9 Sekunden. Die Ergebnisse des Heiße-Platte-Analgesie-Tests lassen darauf schließen, daß CHL1-defiziente Tiere keine Beeinträchtigung in der Schmerzwahrnehmung haben. Somit scheint es unwahrscheinlich, daß die Unterschiede in der Schock-induzierten Angststarre auf eine veränderte Schmerzwahrnehmung zurückzuführen sind.

#### 4.1.6 Zusammenfassung der Analyse der CHL1-defizienten Tiere

Die Analyse der CHL1-defizienten Tiere hat zum einen gezeigt, daß molekulare Prozesse der Informationsverarbeitung im Gehirn anders ausgeprägt sind als in Wildtypen. Die anschließende verhaltensbiologische Analyse konnte keine Defizite in der Verarbeitung neuer oder vertrauter Stimuli feststellen. Auch die grundlegende Funktion von Amygdala und Hippocampus scheinen in CHL1-defizienten Tieren nicht gestört, da eine Angst-Konditionierung möglich ist.

## 4.2 Charakterisierung der induzierbar CHL1-defizienten Linien

Wie Montag-Sallaz *et al.* (2002) und die vorliegende Arbeit gezeigt haben, kommt es in konventionell CHL1-defizienten Mäusen zu hirnmorphologischen und verhaltensbiologischen Veränderungen. Dies wird durch das kontinuierliche Fehlen des CHL1-Moleküls hervorgerufen. Aber auch Kompensationsmechanismen könnten einen modifizierenden Einfluß auf die Ausprägung dieser Effekte haben, da z.B. eine erhöhte Expression von NCAM180-mRNA gefunden werden konnte (Montag-Sallaz *et al.*, 2002). Diese Problematik könnte mit konditionellen CHL1-*knock-out*-Mutanten umgangen werden. Zur Herstellung konditioneller CHL1-defizienter Mäuse wurden in Intronbereichen, die das erste der CHL1-kodierenden Exons (ATG-Exon) umgeben, *loxP*-Elemente eingefügt (Dr. D.Montag, nicht publiziert). Die Cre-Rekombinase des P1-Phagen von *E. coli* kann an diesen *loxP*-Elementen enzymatisch schneiden und die dazwischen liegenden Sequenzbereiche aus dem Genom entfernen (Metzger *et al.*, 1995; Feil *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998; Kellendonk *et al.*, 1999; Mansuy *et al.*, 1999).

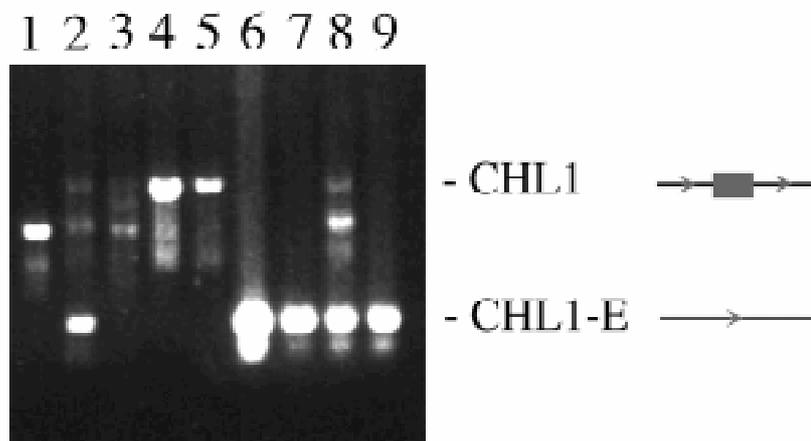
Ziel dieses Teils der vorliegenden Arbeit war die initiale Charakterisierung zweier konditionell CHL1-defizienter Linien. Zum einen sollte die Funktionalität des *loxP*-Cre-Systems zur Erzeugung eines CHL1-defizienten Organismus nachgewiesen werden. Des weiteren sollte untersucht werden, ob die Ausnutzung eines *loxP*-Cre-System zur Deletion von CHL1 zu den gleichen morphologischen Veränderungen im Gehirn führt, wie der konventionelle genetische CHL1-*knock-out*.

### 4.2.1 Die konstitutiv aktive CMV-Cre-Rekombinase-Linie

Die CMV-Cre-Rekombinase sollte durch den Promoter des Cytomegalovirus (CMV) ubiquitär im Organismus exprimiert sein und in proliferierenden Zellen aktiv werden (Nagy, 2000). Für die Analyse des *loxP*-CMV-Cre-Systems wurden Geschwistertiere eingesetzt, die ausschließlich homozygot für das mit *loxP*-Elementen versehene CHL1-Gen waren (gefloxt) oder zusätzlich die CMV-Cre-Rekombinase trugen. Diese *loxP*-CMV-Cre-Tiere sollten Aufschluß darüber geben, ob die Ausnutzung des *loxP*-Cre-Systems zu CHL1-defizienten Tieren führt. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob die Deletion von CHL1 mit diesem System zu vergleichbaren morphologischen Defekten führt wie in der konventionellen CHL1-defizienten Maus. Das könnte Aussagen darüber zulassen, ob kompensatorische Effekte oder äquivalente Mutationen im CHL1-Gen Ursache der Defekte sind.

#### 4.2.1.1 Nachweis der CHL1-Excision auf genomischer Ebene

Für die Charakterisierung der *loxP*-CMV-Cre-Rekombinase-Tiere war es wichtig, die Aktivität der Cre-Rekombinase nachzuweisen. Das geschah durch Nachweis der Excision des ATG-Exons im Genom. Dazu wurden PCR-Primer benutzt (CGF5, CGR3), die jeweils 5‘ beziehungsweise 3‘ von den das CHL1-Exon flankierenden *loxP*-Elementen lagen. Nach Isolation genomischer DNA aus Schwanz- bzw. Hirngewebe konnte durch eine PCR-Reaktion und anschließender Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel die Excision nachgewiesen werden. Das wildtypische CHL1-Fragment ist etwa 734 bp und das gefloxt CHL1 970 bp groß. Nach Excision zwischen den *loxP*-Elementen durch die Cre-Rekombinase entsteht ein PCR-Fragment von 380 bp.



**Abb. 24:** PCR für den Nachweis der Excision in der DNA von Schwanz-Biopsien

1) Wildtyp-Tier (CHL1 ohne *loxP*-Elemente); 2) bis 5) und 8) Tiere mit *loxP*-Elementen ohne CMV-Cre-Rekombinase; 6), 7), 9) – Tiere mit *loxP*-Elementen und CMV-Cre-Rekombinase

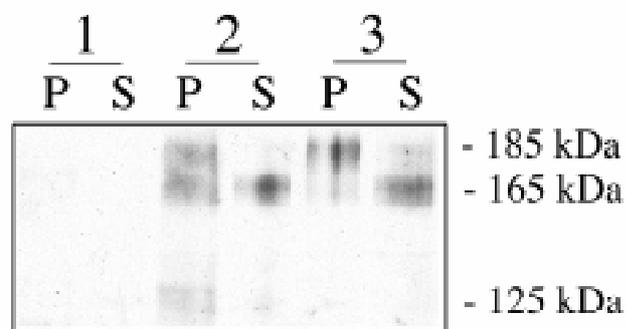
Die PCR mit *loxP*-CHL1-spezifischen Primern auf der DNA verschiedener Tiere zeigte, in Abhängigkeit von der Anwesenheit der Cre-Rekombinase im Genom fanden Excisionen an den *loxP*-Elementen statt (**Abb. 24**). Dabei konnte in *loxP*-CMV-Cre Tieren ausschließlich die Excisionsbande von 380 bp nachgewiesen werden (**Abb. 24**: Nr. 6, 7, 9). Bei Tieren ohne CMV-Cre-Rekombinase gab es zwei Populationen. Die DNA in Nr. 2 und 8 (**Abb. 24**) wies partielle Excision auf, beide PCR-Produkte waren zu sehen. Dies erklärt sich durch das Paarungsschema. Ein Elternteil trägt ausschließlich das gefloxt CHL1-Gen. Das andere Elterntier trägt zusätzlich zum gefloxt CHL1-Gen die CMV-Cre-Rekombinase. Bei diesem Elterntier muß es zu Excisionen in der Keimbahn gekommen sein. Es handelte sich somit bei den Nachkommen in Bahn Nr. 2 und 8 um heterozygote Tiere. Dagegen zeigte die DNA in Bahn Nr. 4 und 5, dies waren ebenfalls Tiere ohne CMV-Cre-Rekombinase, keine Excisionen. Hier kam es zu keiner Excision in der Keimbahn eines Elterntieres. Bei diesen

Tieren ist ausschließlich das PCR-Produkt mit ATG-Exon nachzuweisen. Diese Tiere wurden als Wildtyp-Kontrollen für weitere Versuche eingesetzt.

Diese Ergebnisse belegen die Aktivität der CMV-Cre-Rekombinase, die zu einer genomischen Deletion des ATG-Exons von CHL1 führte.

#### 4.2.1.2 Nachweis des Proteins von CHL1 mittels Western-Blot und CHL1-Immunhistochemie (IHC)

Mittels PCR konnte nachgewiesen werden, daß in den *loxP*-CMV-Cre-Tieren das zwischen den *loxP*-Elementen befindliche Fragment des CHL1-Gens herausgeschnitten wurde. Die nächste Frage war, ob eine Veränderung in der Proteinexpression in diesen Tieren stattgefunden hat. Dazu wurden Proteinextrakte von CHL1-defizienten, *loxP* ohne Cre und *loxP*-CMV-Cre-Tieren aus Gesamthirn-Homogenat gewonnen und durch Zentrifugation nach Membranfraktion und löslicher Protein-Fraktion getrennt. Diese Extrakte wurden mittels SDS-Page nach Molekülgröße aufgetrennt und auf eine Blot-Membran transferiert. Ein Western-Blot zeigte mit einem spezifischen Antikörper gegen CHL1 deutlich Immunreaktivität in der erwarteten Höhe (**Abb. 25**).



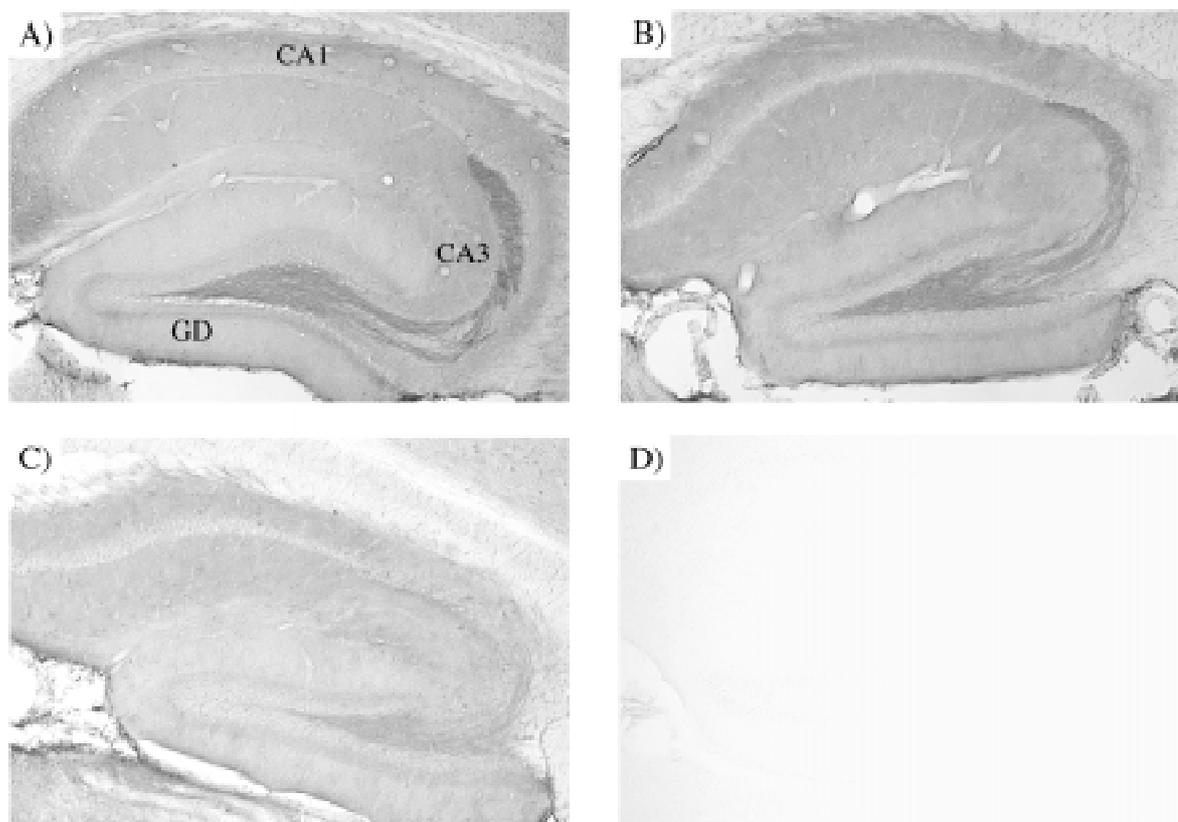
**Abb. 25:** Western-Blot zum Nachweis des CHL1-Proteins in Hirnextrakten

Ein Western-Blot mit jeweils 44 µg Protein wurde mit einem polyklonalen CHL1-spezifischen Antikörper immungefärbt. 1) Extrakt eines konventionell CHL1-defizienten Tieres (CHL1<sup>-/-</sup>), 2) Extrakt eines *loxP*-Tieres ohne CMV-Cre-Rekombinase, 3) Extrakt eines *loxP*-CMV-Cre-Tieres; P – Membranfraktion, S – lösliche Fraktion

Im Extrakt eines konventionellen CHL1-defizienten Tieres (**Abb. 25**: Spur 1) konnte kein CHL1 nachgewiesen werden. Der Extrakt eines Tieres mit *loxP*-Elementen ohne Cre-Rekombinase (**Abb. 25**: Spur 2) zeigte in der Fraktion mit Membran-assoziierten Proteinen alle drei CHL1-typischen Banden, 185 kDa, 165 kDa und 125 kDa. In der Fraktion löslicher Proteine konnte nur die 165 kDa Form von CHL1 detektiert werden. Der Vergleich zwischen einem Tier mit *loxP*-Elementen ohne Cre-Rekombinase (**Abb. 25**: Spur 2) und einem Tier mit

*loxP*-CMV-Cre-Rekombinase (**Abb. 25**: Spur 3) könnte eine Reduktion zumindest der 165 kDa und 125 kDa Banden in der Membran-Fraktion im *loxP*-CMV-Cre-Tier andeuten. Damit konnte eine Reduktion des CHL1-Proteins in Gehirn-Extrakten von *loxP*-CMV-Cre-Tieren im Western-Blot nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Ob es zu einer vielleicht lokal begrenzten Reduktion von CHL1 im Gehirn von *loxP*-CMV-Cre-Tieren gekommen ist, sollte der immunhistochemische Nachweis von CHL1 auf Hirnschnitten zeigen. Diese Methode hat den Vorteil, daß Gehirnstrukturen und eine räumliche Auflösung der Proteinexpression erhalten bleiben.



**Abb. 26: IHC-Färbung der hippocampalen Region mit anti-CHL1-Antikörper**

Die IHC mit einem CHL1-spezifischen Peptidantikörper zeigt deutlich die Moosfasern im Wildtypen (A). In den Bildern B und C ist je ein *loxP*-Tier ohne Cre-Rekombinase zu sehen. Der *loxP*-CMV-Cre-*knock-out* zeigt keine Immunantwort (D). Die Regionen CA1, CA3 und GD (Gyrus Dentatus) sind angegeben.

Die IHC mit einem Peptid-Antikörper gegen das murine CHL1-Molekül zeigte auf Hirnschnitten von Tieren mit *loxP*-Elementen und mit oder ohne Cre-Rekombinase sichtbare Unterschiede (**Abb. 26**). Im Hippocampus eines C57BL/6-Tieres (**Abb. 26**: A) waren deutlich die Moosfasern angefärbt, die von den Körnerzellen des Gyrus Dentatus in die CA3-Region des Hippocampus projizieren. Die Tiere mit *loxP*-Elementen aber ohne CMV-Cre (**Abb. 26**: B, C) zeigten eine vergleichbare Verteilung des CHL1-Proteins in der hippocampalen Region. Allerdings gab es eine deutliche Reduktion in der Intensität der Färbung in dem, per PCR

bestimmten, heterozygoten Tier (**Abb. 26: C**) gegenüber dem homozygoten Wildtyp-Tier (**Abb. 26: B**). Die Färbung im heterozygoten Tier war merklich schwächer, die Moosfasern waren nicht mehr deutlich zu erkennen. In diesem Tier war vermutlich die Proteinmenge pro Zelle reduziert. Dagegen war die hippocampale Region im *loxP*-CMV-Cre-Tier (**Abb. 26: D**), wie bei einem konventionellen CHL1-defizienten Tier (Daten nicht gezeigt), ohne spezifische Färbung. Das CHL1-Protein konnte im Hippocampus dieser Tiere mit einer immunhistochemischen Färbung nicht detektiert werden.

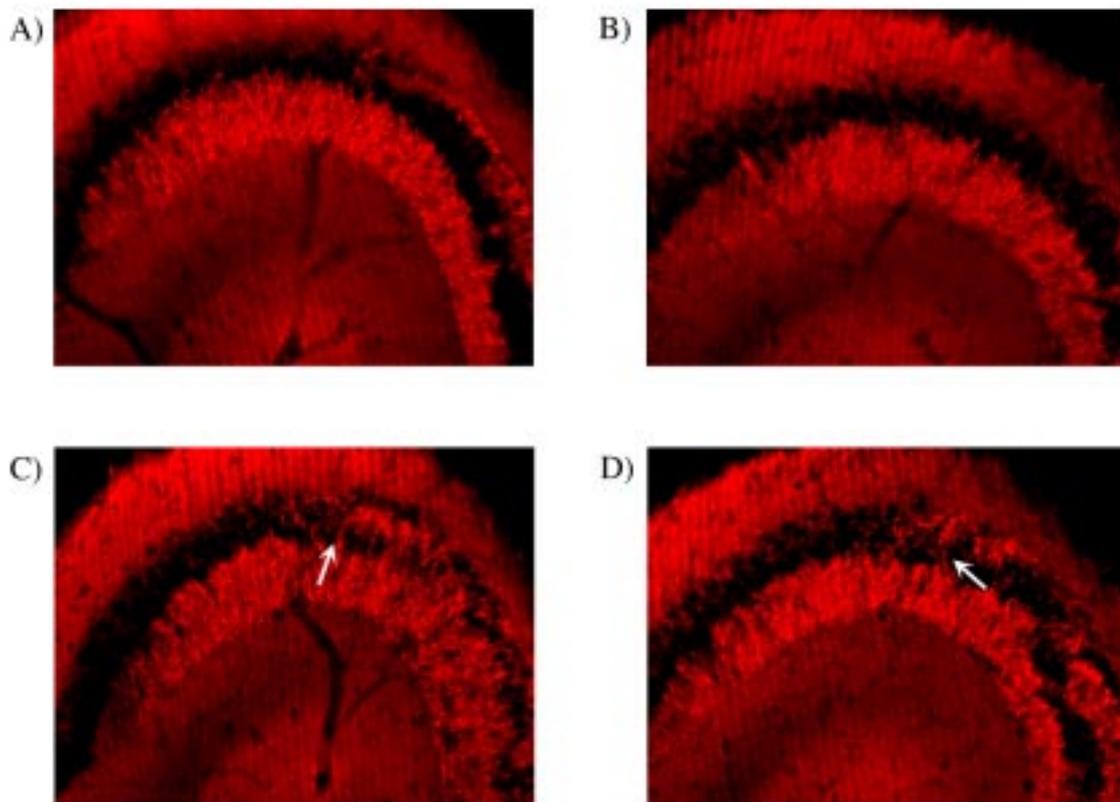
Es konnte im Gehirn von *loxP*-CMV-Cre-Tieren keine Reduktion des CHL1-Moleküls auf Proteinextrakten nachgewiesen werden. Dagegen zeigte die IHC mit einem CHL1-Antikörper eine Reduktion des Proteins in der hippocampalen Region. Dort konnte keine Immunantwort gefunden werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß es im Gehirn adulter *loxP*-CMV-Cre-Tiere zu lokal begrenzten Reduktionen in der CHL1-Expression gekommen ist. Die Konsequenz wäre ein sogenanntes Mosaik-Tier, in dem bestimmte Zellen oder Regionen eine CHL1-Deletion aufweisen und andere nicht.

#### **4.2.1.3 Visualisierung der Moosfaserendigungen im Hippocampus durch anti-Synaptophysin-IHC sowie TIMMs-Färbung in *loxP*-CMV-Cre-Tieren**

CHL1 spielt vermutlich als neurales Zelladhäsionsmolekül in der Entwicklung des Gehirns eine wichtige Rolle (Chen *et al.*, 1999; Hillenbrand *et al.*, 1999). Die Analyse der konventionellen *knock-out*-Maus hat Veränderungen in der Moosfaserregion des Hippocampus ergeben (Montag-Sallaz *et al.*, 2002). Die Moosfasern der Körnerzellen des Gyrus Dentatus CHL1-defizienter Tiere terminieren nicht nur auf den apikalen dendritischen Bereich der CA3-Pyramidenzellen des Hippocampus sondern auch auf die Somata dieser Neurone. Ob dieser Effekt durch eine äquivalente Mutation im CHL1-Gen herbeizuführen ist und ob die lokale Reduktion von CHL1 für die Ausprägung des CHL1-Phänotyps ausreicht, sollte die morphologische Analyse der *loxP*-CMV-Cre-Linie zeigen. Dazu wurden zum einen Tiere als Kontrollen eingesetzt, die *loxP*-Elemente enthielten und ohne CMV-Cre-Rekombinase keine Excisionen zeigten. Zum anderen wurden Tiere eingesetzt, die *loxP*-CMV-Cre-Rekombinase positiv waren und ausschließlich das Excisions-Produkt in der PCR zeigten.

Als einer der Hauptbestandteile synaptischer Vesikel wurden mit einem Antikörper gegen Synaptophysin spezifisch die Moosfaserendigungen markiert, die reich an synaptischen Vesikeln sind (Cremer *et al.*, 1997). Durch die lokale Häufung der synaptischen

Verschaltungen der Axone der Körnerzellen des Gyrus Dentatus auf die Dendriten der Pyramidenzellen der CA3-Region des Hippocampus kann diese Region angefärbt werden.



**Abb. 27: Synaptophysin-Immunhistochemie in der CA3-Region des Hippocampus**

Während in Wildtypen (A, B) die Moosfaserendigungen im dendritischen Bereich der Pyramidenzellen terminieren, sind in den *loxP-CMV-Cre*-Tieren (C, D) auch Endigungen im Bereich der Somata der CA3-Pyramidenzellschicht zu erkennen (Markierung mit Pfeilen).

Die Moosfaserterminalien in der CA3-Region des Hippocampus waren im Wildtypen in Schichten organisiert (**Abb. 27**). Nur vereinzelte Terminalien konnten innerhalb der Pyramidenzellschicht der CA3-Region detektiert werden. Die Pyramidenzellschicht konnte deutlich vom Stratum lucidum unterschieden werden. In den CHL1-Mutanten ging diese Schichtung verloren. Hier konnten Terminalien über die gesamte Zellkörperschicht der CA3-Region gefunden werden, wo sie zum Teil die Somata der Pyramidenzellen säumten. Dies suggeriert, daß sich die Synapsen nicht nur am proximalen Teil der Dendriten sondern auch am Zellkörper der Pyramidenzellen ausgebildet haben.

Die zinkreichen axonalen Terminalien der Moosfasern lassen sich auch durch die Umwandlung des Zinks in Zinksulfid mittels Silbernitrat nachweisen. Unter Verwendung dieser Färbemethode kann man eine deutliche Darstellung der Terminalregion der Moosfaseraxone, die auf die CA3-Pyramidenzellen verschalten, erhalten (Pleskacheva *et al.*, 2000; Ivanco & Greenough, 2002).



**Abb. 28: TIMMs-Färbung mit Neutralrot-Gegenfärbung der hippocampalen Region**

A) und C) *loxP*-Tiere ohne CMV-Cre, B) und D) *loxP*-CMV-Cre-Tier. Die schwarz markierten Moosfaserendigungen sind in der CA3-Region des Hippocampus deutlich zu erkennen. Durch Pfeile markiert sind beim *loxP*-CMV-Cre-Tier Terminalien im Bereich der Somata der CA3-Pyramidenzellen zu erkennen, während im Kontrolltier die Endigungen fast ausschließlich im dendritischen Bereich der Pyramidenzellen zu finden sind.

Der Vergleich der *loxP*-CMV-Cre-Rekombinase-Tiere mit Wildtyp-Geschwistern ohne Cre-Rekombinase und ohne genomische Excision im CHL1-Gen zeigte, daß die Moosfaserendigungen im Hippocampus eines Wildtypen wesentlich organisierter auf die Pyramidenzellen terminierten als in der Mutante. In Wildtyp-Geschwistern waren die Terminalien parallel zur Zellschicht der Pyramidalzellen angeordnet (**Abb. 28**). Dagegen waren in den *loxP*-CMV-Cre-Rekombinase-Tieren die Moosfaserterminalien zwar noch parallel zur CA3-Pyramidalzellschicht angeordnet, allerdings fanden sich zusätzlich Anhäufungen von Endigungen inmitten der Zellkörperschicht der Pyramidalzellen. Dies deckt sich mit den Befunden, die Montag-Sallaz *et al.* (2002) für die konventionellen CHL1-*knock-out*-Mutanten beschrieben haben. Somit reicht die lokale Reduktion von CHL1 im Hippocampus aus, den CHL1-Phänotyp zu reproduzieren.

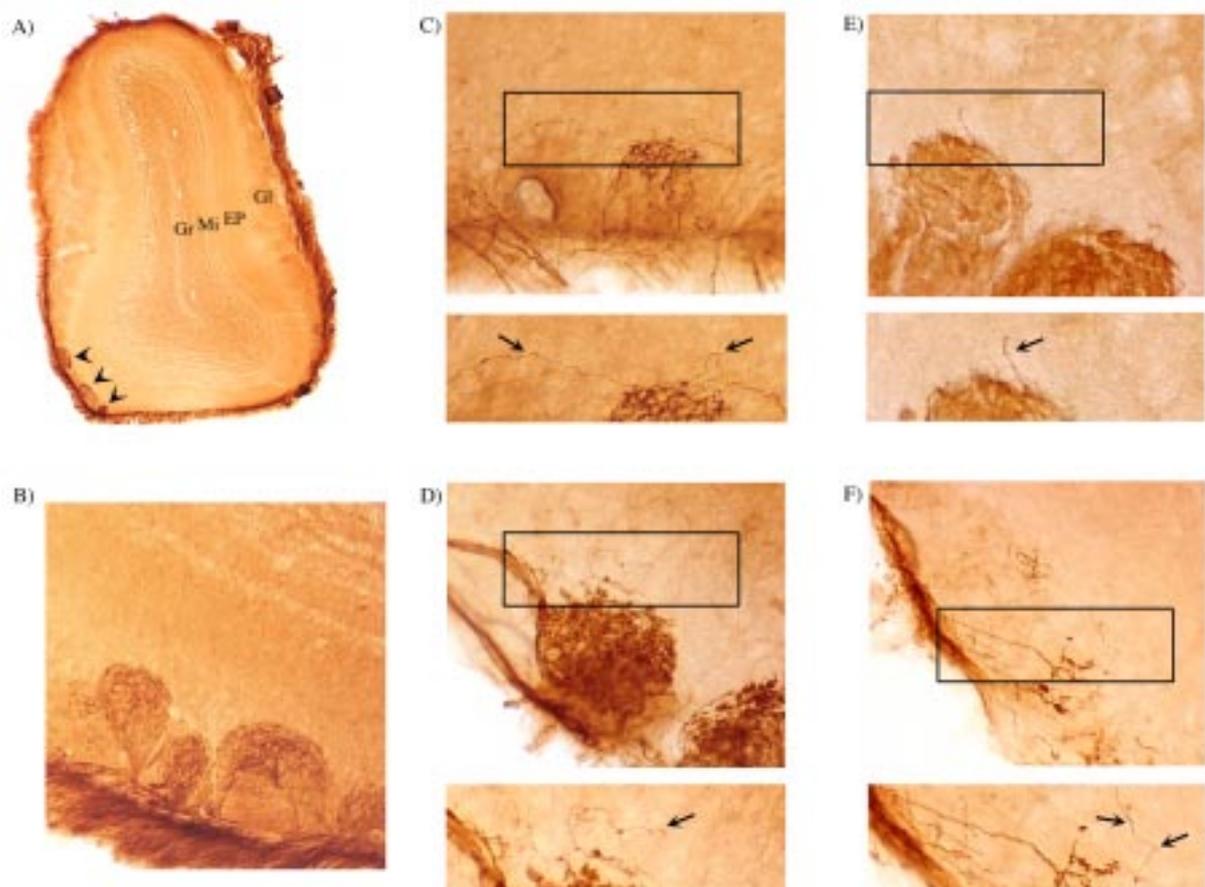
#### 4.2.1.4 Lectin-Färbung der olfaktorischen Bulbi in der *loxP*-CMV-Cre-Maus

Die Deletion von CHL1 mit dem *loxP*-CMV-Cre-System führte im Hippocampus zu den gleichen Effekten wie ein konventioneller *knock-out*. Ob auch im olfaktorischen Bulbus von *loxP*-CMV-Cre-Tieren eine Phänokopie des CHL1-*knock-outs* erreicht werden kann, sollte die *Dolichos biflorus agglutinin*-(DBA) Methode zeigen.

Während der Entwicklung des Gehirns wachsen die Axone der Rezeptorneurone des Riechepithels in den olfaktorischen Bulbus der Maus ein. Dort terminieren sie in Glomeruli genannten Strukturen, verästeln sich in diesen und bilden Synapsen aus. Während des axonalen Einwachsens in den olfaktorischen Bulbus können bis zum fünften postnatalen Tag Fehler beobachtet werden. Dabei wachsen die Fasern in die tieferliegende externe plexiforme Schicht des Bulbus ein oder pendeln zwischen mehreren Glomeruli. In Wildtyp-Tieren älter als Tag 5 kommen solche Fehler nicht mehr vor. Dann ist das molekulare oder auch chemische Milieu etabliert, so daß die auch im adulten Tier weiterhin einwachsenden Axone fehlerlos ihr Ziel finden. *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA) ist ein Glykoprotein einer indischen Leguminose mit hoher Affinität zu N-acetyl- $\alpha$ -D-Galaktosaminen. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, daß mit diesem Lectin eine Subpopulation der in die Glomeruli projizierenden Fasern im olfaktorischen Bulbus der Maus angefärbt werden kann (Bailey *et al.*, 1999; Tenne-Brown & Key, 1999; Valverde, 1999; Lipscomb *et al.*, 2002; Royal *et al.*, 2002). Mittels der DBA-Methode sollte überprüft werden, ob die von Montag-Sallaz *et al.* (2002) im konventionellen CHL1-*knock-out* gefundenen Veränderungen auch bei den *loxP*-CMV-Cre-Tieren zu finden sind.

Unter Verwendung der DBA-Färbemethode wurden in adulten *loxP*-CMV-Cre-Rekombinase-Tieren Veränderungen im olfaktorischen Bulbus gefunden, die den oben beschriebenen Entwicklungsfehlern entsprechen. In der **Abb. 29** ist zu erkennen, daß im Wildtypen (B) die Axone gezielt in einem Glomerulus terminierten und dort Verknüpfungen bildeten. In *loxP*-CMV-Cre-Tieren konnte wiederholt beobachtet werden, daß die Fasern in die tiefer gelegene externe plexiforme Schicht eingewachsen waren (**Abb. 29**: C bis F). Außerdem kam es während des Einwachsens der Axone in tiefere Schichten zu Richtungsänderungen (**Abb. 29**: C und F).

Die DBA-Methode hat gezeigt, daß nicht alle Axone der Rezeptorneurone des Riechepithels in *loxP*-CMV-Cre-Rekombinase CHL1-defizienten Tieren in der Lage sind, fehlerlos ihr Ziel im olfaktorischen Bulbus zu finden. Dies konnte wiederum die morphologischen Defekte der konventionellen CHL1-defizienten Tiere nachbilden (Montag-Sallaz *et al.*, 2002).



**Abb. 29: DBA-Färbung von Frontal-Schnitten olfaktorischer Bulbi**

A) Schnitt eines olfaktorischen Bulbus eines Wildtyp-Tieres. Pfeilköpfe zeigen auf gefärbte Glomeruli. Es sind die Glomeruli-Schicht (Gl), die externe plexiforme Schicht (EP), die Mitralzellschicht (Mi) und Körnerzellschicht (Gr) angegeben. B) Vergrößerung gefärbter Glomeruli eines Wildtyp-Tieres. C) bis F) Gefärbte Glomeruli und vergrößerte Ausschnitte von *loxP*-CMV-Cre-Rekombinase-Tieren. Pfeile weisen auf falsch ausgewachsene Axone hin.

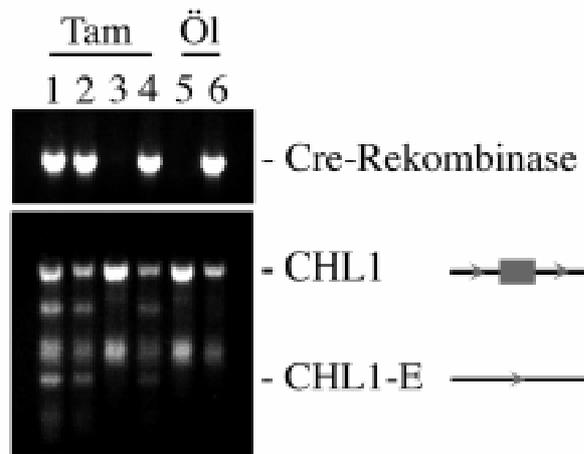
Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Axone sowohl der Körnerzellen des Gyrus Dentatus als auch der Rezeptorzellen des Riechepithels durch die Excision des CHL1-Gens und der daraus resultierende Reduktion des CHL1-Proteins in ihrer Terminierung gestört sind, was zu nachweisbaren Veränderungen in den Zielgebieten dieser Neurone führt. Damit konnten die Befunde aus der konventionellen CHL1-defizienten Maus für die *loxP*-CMV-Cre-Maus reproduziert werden. Dies spricht dafür, daß eine äquivalente Mutation des CHL1-Gens zu den gleichen Auswirkungen führt wie die konventionelle *knock-out*-Methode.

#### 4.2.2 Die konditionell aktive CMV-CreER<sup>T</sup>-Rekombinase-Linie

In den bisherigen Versuchen zu den Auswirkungen einer CHL1-Defizienz wurden Tiere untersucht, die während der ontogenetischen Entwicklung kein CHL1 besaßen oder es vermutlich frühzeitig verloren haben. Für weitergehende Versuche wäre eine induzierbare Cre-Rekombinase hilfreich, bei dem die Excision von CHL1 frei wählbar initiiert werden könnte.

Durch die Fusionierung der Cre-Rekombinase mit einer veränderten Ligandenbindungsstelle des Östrogenrezeptors wurde die Cre-Rekombinase durch Tamoxifen aktivierbar (Indra *et al.*, 1999). Endogenes Östrogen kann diese modifizierte Cre-Rekombinase (CreER<sup>T</sup>-Rekombinase) nicht aktivieren. Die Applikation von Tamoxifen bewirkt, durch Bindung an die veränderte Ligandenbindungsstelle, eine Translokation der CMV-CreER<sup>T</sup>-Rekombinase in den Zellkern. Erst dort findet die CMV-CreER<sup>T</sup>-Rekombinase ein geeignetes Substrat (*loxP*-Elemente) und kann enzymatisch aktiv werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Funktionalität dieses Systems für die Erzeugung von CHL1-defizienten Tieren untersucht werden. Für die Analyse des *loxP*-CMV-CreER<sup>T</sup>-Systems wurden Tiere aus der Zuchtlinie mit dem *loxP*-Elementen versehenen CHL1-Gen mit Tieren verpaart, welche Träger der CMV-CreER<sup>T</sup>-Rekombinase waren. Zur Analyse wurden Geschwistertiere eingesetzt, die entweder ausschließlich homozygot das mit *loxP*-Elementen versehene CHL1-Gen besaßen oder zusätzlich die CMV-CreER<sup>T</sup>-Rekombinase trugen. Diesen Tieren wurde fünf Tage intraperitoneal 1mg Tamoxifen in Sonnenblumenöl oder reines Sonnenblumenöl injiziert. Anschließend wurde überprüft, ob und in welchen Tieren es zu Excisionen gekommen ist. Dazu wurde zum einen DNA aus Schwanzbiopsien und zum anderen aus verschiedenen Hirnregionen gewonnen.

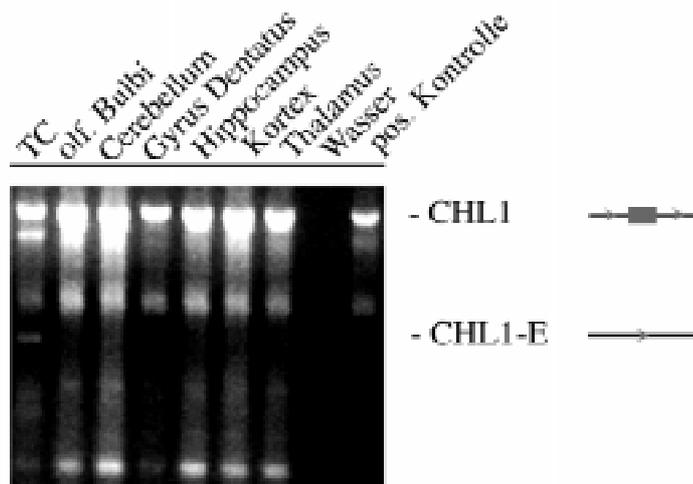
Die PCR mit einerseits *loxP*-CHL1 und andererseits CMV-CreER<sup>T</sup>-Rekombinase spezifischen Primern auf genomischer DNA aus einer Schwanzbiopsie verschiedener Tiere zeigte, daß in Abhängigkeit der Cre-Rekombinase und fünftägiger Tamoxifen-Injektionen Excisionen an den *loxP*-Elementen stattfanden (**Abb. 30**: Spalte 1 bis 4). Lediglich in den Spalten, die ein positives CMV-CreER<sup>T</sup>-Signal zeigen (**Abb. 30**: 1, 3, 4), kann auch das Fragment mit Excision nachgewiesen werden.



**Abb. 30:** PCR für CreER<sup>T</sup>-Rekombinase und CHL1 auf DNA aus Schwanzbiopsien  
Die PCR mit spezifischen Primern für die CreER<sup>T</sup>-Rekombinase bzw. für CHL1 zeigt in Abhängigkeit einer 5-tägigen Tamoxifen-Injektion Excisionen im Genom. CHL1 – Gen mit *loxP*-Elementen, CHL1-E – Excision im CHL1-Gen, Tam – Tamoxifen

Die Applikation eines Vehikels (Sonnenblumenöl) hatte keinen aktivierenden Effekt auf die CreER<sup>T</sup>-Rekombinase und es kann nur das mit *loxP*-Elementen versehene CHL1-Fragment nachgewiesen werden (**Abb. 30**: Spalte 5 und 6). Diese Ergebnisse konnten mehrfach mit verschiedenen Tieren reproduziert werden. Damit konnte gezeigt werden, daß die CMV-CreER<sup>T</sup>-Rekombinase ausschließlich durch Injektion von Tamoxifen aktiviert wird.

Eine PCR auf DNA verschiedener Hirnregionen konnte keine Excision im Gehirn nachweisen (**Abb. 31**). Lediglich in der Schwanzbiopsie der Tiere konnten Excisionen gesehen werden (**Abb. 31**: TC).



**Abb. 31:** PCR für CHL1 auf DNA eines *loxP*-CMV-CreER<sup>T</sup>-Tieres  
Eine PCR auf DNA einer Schwanzbiopsie (TC) und verschiedenen Hirnregionen eines *loxP*-CMV-CreER<sup>T</sup>-Tieres nach fünftägiger Tamoxifen-Induktion. Eine Reaktion mit Wasser hat kein PCR-Produkt ergeben. Die PCR der positiv-Kontrolle, DNA eines Tieres aus der Zuchtlinie mit *loxP*-Elementen, konnte ausschließlich das CHL1-Produkt mit *loxP*-Elementen amplifizieren. CHL1 – CHL1-Gen mit *loxP*-Elementen, CHL1-E – Excision des Start-Exons

Somit führt die Verwendung der ligandenabhängigen CMV-CreER<sup>T</sup>-Rekombinase zur Excision des ATG-Exons von CHL1. Die Excision läßt sich allerdings nur in einer Schwanzbiopsie aber nicht im Gehirn nachweisen.

Die erste Analyse des *loxP*-CMV-CreER<sup>T</sup>-Systems zeigt die Abhängigkeit der CMV-CreER<sup>T</sup>-Rekombinase vom Liganden. Ohne Tamoxifen ist diese Cre-Rekombinase nicht in der Lage in wahrnehmbarem Umfang eine Excision des CHL1-Gens vorzunehmen. Allerdings konnte kein Nachweis der Aktivität dieser Rekombinase im Gehirn erbracht werden.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Verhaltensbiologische Charakterisierung der konventionell CHL1-defizienten Maus

Die kürzlich publizierte CHL1-defiziente Maus war als lebensfähig beschrieben worden (Montag-Sallaz *et al.*, 2002). Allerdings wurden morphologische Defekte in der Moosfaserregion des Hippocampus sowie im olfaktorischen Bulbus dieser Maus gefunden, die einen Einfluß des CHL1-Moleküls auf die Etablierung neuronaler Netzwerke nahe legen. Des weiteren wurden Veränderungen im Explorationsverhalten neuer Umgebungen beschrieben, die eine veränderte Informationsverarbeitung bei CHL1-defizienten Tieren vermuten lassen. Der erste Teil der vorliegenden Arbeit befaßt sich mit der Frage, ob das Fehlen von CHL1 einen Einfluß auf Prozesse der Informationsverarbeitung hat. Dazu wurde ein Versuch durchgeführt, der Unterschiede in der Aktivierung bestimmter Hirnareale nach gustatorischer Stimulation aufzeigen sollte, was ein Hinweis auf Veränderungen in der Informationsverarbeitung bei CHL1-defizienten Tieren wäre. Des weiteren wurden verhaltensbiologische Tests angewandt, um Unterschiede im Verhalten der Tiere zu erfassen, deren Ursache eine veränderte Informationsverarbeitung sein könnte.

#### 5.1.1 *Taste-Novelty* und plastizitätsrelevante Ereignisse im CHL1-defizienten Gehirn

Die Erkennung und Verarbeitung neuer Stimuli (*Novelty*) ist ein biologisch bedeutsamer Mechanismus, der ein Netzwerk von Hirnarealen aktiviert. Dieser Vorgang ermöglicht es Tieren, in einer dynamischen Umwelt, adäquat auf Ereignisse zu reagieren. Eine CHL1-Defizienz scheint einen Einfluß auf die korrekte Vernetzung des neuronalen Netzwerkes zu haben. Ob dies Auswirkungen auf die Verarbeitung neuer bzw. vertrauter Stimuli hat, sollte mit dem *Taste-Novelty*-Paradigma untersucht werden. Mit diesem Paradigma und drei Markern (*c-fos*, *arg3.1/arc*, 2DG) zur Kartierung neuronal aktiver Hirnareale sollte untersucht werden, ob Unterschiede in der Aktivierung von anteriorem cingulären Kortex, insularem Kortex, posteriorem cingulären Kortex, Amygdala, Gyrus Dentatus, piriformen Kortex und parietalem Kortex Schichten I-III und Schichten IV-VI zwischen CHL1-defizienten Tieren und ihren Wildtyp-Geschwistern vorliegen. Dazu wurden die Versuchstiere mit Wasser, Saccharin als vertrautem Geschmack oder Saccharin als neuem Geschmack stimuliert. Wie gezeigt wurde, ist dieses Paradigma besonders gut geeignet, Veränderungen in der Expression schnell aktivierbarer und kurzlebiger Moleküle wie den *Immediate-Early*-Genen (IEG) zu untersuchen (Montag-Sallaz *et al.*, 1999). Durch das spezielle Untersuchungsdesign können

der Stimulus und der Zeitpunkt der Stimulation präzise bestimmt werden, was im Hinblick auf die Kurzlebigkeit der IEG besonders wichtig ist. So ist die mRNA von *c-fos* nur etwa 10 bis 15 Minuten stabil (Caputto & Guido, 2000). Hinzu kommt die fast vollständige Ungestörtheit der Versuchstiere und deren Habituation über sechs Tage. Am siebten Tag zeigen die Tiere praktisch keine streßinduzierte erhöhte Aktivität. In der Tat ist es wahrscheinlich, daß *Novelty*-Streß und anderer Streß die IEG-Expression oder auch die Freisetzung von Neurotransmittern beeinflussen. Verschiedene Untersuchungen zeigen, daß streßvolle Ereignisse potente Faktoren für die Induktion von IEG sind (Honkaniemi *et al.*, 1992; Cullinan *et al.*, 1995; Emmert & Herman, 1999; Yokoyama & Sasaki, 1999). In der vorliegenden Studie kann durch den speziellen Aufbau nahezu ausgeschlossen werden, daß Veränderungen in der Genexpression oder der metabolischen Aktivität auf störende Nebeneffekte zurückzuführen sind. Die nicht-radioaktive *in situ*-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden gewährt eine zelluläre Auflösung (Montag-Sallaz & Buonviso, 2002). Dabei werden Zellen mit einer hohen Konzentration der untersuchten mRNA farblich markiert. Diese Methode zeigt Differenzen in der Zahl gefärbter Zellen in einem bestimmten Areal an, und es wurde deren Zelldichte pro mm<sup>2</sup> bestimmt. Quantitative Unterschiede der mRNA pro Zelle können mit dieser Methode nicht detektiert werden. In kürzlich veröffentlichten Studien wurde gezeigt, daß die hier verwendete Art der Quantifizierung verlässliche und vergleichbare Daten liefert (Montag-Sallaz *et al.*, 1999; Yokoyama & Sasaki, 1999; Montag-Sallaz & Buonviso, 2002). Mit der 2DG-Autoradiographie werden axonale Endigungen markiert, die funktionell aktiv waren. Dagegen werden mit der *in situ*-Hybridisierung für *c-fos* und *arg3.1/arc* die Somata der Zellen markiert, die Veränderungen auf transkriptioneller Ebene zeigen. Durch den Vergleich dieser drei Marker können zusätzliche Erkenntnisse über die Art der neuronalen Aktivität nach Stimulation gewonnen werden. Somit ist dieser kombinierte Ansatz besonders gut geeignet, Hinweise auf Veränderungen neuronaler Prozesse auch in mutanten Mäusen zu erhalten, die der Informationsverarbeitung, Lernen und Gedächtnisformierung zu Grunde liegen.

#### **5.1.1.1 Der lokale Glukoseumsatz nach gustatorischer Stimulation**

Die 2-Deoxy-D-[1-<sup>14</sup>C]-Glukose (2DG) -Autoradiographie ist geeignet, metabolisch aktive Regionen zu detektieren. Die Verwendung dieser Methode hat keine starken Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen aufgezeigt. Es wurde aber in der Amygdala CHL1-defizienter Tiere eine signifikant größere relative optische Dichte gemessen als in Wildtypen. Dagegen

war im anterioren cingulären Kortex CHL1-defizienter Tiere 30 Minuten nach Stimulation mit Wasser eine signifikant geringere Anreicherung von 2DG zu finden als in Wildtypen. Die verwendete Autoradiographie-Methode hat Limitierungen, die bei der Interpretation der Ergebnisse in Betracht gezogen werden müssen. Dynamische Veränderungen des Glukoseverbrauchs reflektieren hauptsächlich elektrische Aktivität axonaler Terminalien sowohl exzitatorischer als auch inhibitorischer Art (Dewar & McCulloch, 1992). Zusätzlich wird diskutiert, ob nicht auch gliale Elemente am Glukoseumsatz beteiligt sind (Sharp *et al.*, 1993). Im allgemeinen wird in Studien eine Überlebenszeit von 45 Minuten nach Injektion der 2DG genutzt (Sokoloff *et al.*, 1977; Jourdan *et al.*, 1980). In Vorversuchen konnte kein Unterschied in der 2DG-Akkumulation zwischen 30 und 45 Minuten Überlebenszeit gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden 30 Minuten als Überlebenszeit verwendet, um die Daten mit der IEG-Expression direkt vergleichen zu können. Da Unterschiede in der *c-fos* bzw. *arg3.1/arc*-Expression 30 Minuten bzw. 4,5 Stunden nach Stimulation zwischen den Versuchsgruppen auftraten, wurden diese Zeitpunkte mit der metabolischen Kartierung untersucht. Da nur wenige Unterschiede zwischen CHL1-Mutanten und Wildtypen in der 2DG-Anreicherung gefunden wurden, scheint es unwahrscheinlich, daß die Unterschiede in der *c-fos* und *arg3.1/arc*-Expression mit starken Unterschieden in der neuronalen Aktivität *per se* verbunden waren. Des weiteren muß erwähnt werden, daß keine starken Unterschiede in der 2DG-Akkumulation nach einem neuen oder vertrauten Stimulus weder in den Mutanten noch in den Wildtypen aufgetreten sind. Somit reflektieren die gefundenen Expressionsmaxima der mRNA von *c-fos* und *arg3.1/arc* wohl zelluläre Vorgänge synaptischer Plastizität, die der Gedächtnisbildung zu Grunde liegen und nicht einfach nur erhöhter Aufmerksamkeit oder Streß.

#### **5.1.1.2 Die mRNA-Expression von *c-fos* nach gustatorischer Stimulation**

Im *Taste-Novelty*-Paradigma ist die mRNA des Aktivitätsmarkers *c-fos* in CHL1-defizienten Tieren unabhängig von der Stimulation in nahezu allen Arealen signifikant höher exprimiert als in Wildtypen. Nur im Gyrus Dentatus wurde dieser Effekt nicht gefunden. In den cingulären Kortizes CHL1-defizienter Mäuse wurde 30 Minuten nach Stimulation nicht nur durch Saccharin als neuem Geschmack sondern auch als vertrautem Geschmack signifikant mehr *c-fos* exprimiert als in Wasser-stimulierten Tieren oder den korrespondierenden Wildtyp-Tieren.

Die Expression von *c-fos* ist sehr oft als Marker für intrazelluläre Aktivität auf der Ebene sekundärer Botenstoffe von Neuronen eingesetzt worden. Die unterschiedlichsten Stimuli

wurden zur Induktion von *c-fos* eingesetzt, wie z.B. akuter Streß, Wachstumsfaktoren, Peptide, Neurotransmitter, krampfauslösende (z.B. Kainat, Bicucullin) oder sensorische Stimuli. Aber auch im Rahmen von Wachstums- und Regenerationsprozessen sowie bei Prozessen von Lernen und Gedächtnis kommt es zu einer transienten Expression von *c-fos* (Übersichtsartikel: Morgan & Curran, 1991; Herrera & Robertson, 1996; Herdegen & Leah, 1998; Tischmeyer & Grimm, 1999). Zwei Studien konnten zeigen, wie die Expression von Fos, Jun und Krox in verschiedenen thalamischen Kernen durch die simultane Aktivierung verschiedener Eingänge durch Schmerzreize stark modifiziert wurde, während Einzelstimuli zum Teil gar keine IEG-Expression induzieren konnten (Pearse *et al.*, 2001a; Pearse *et al.*, 2001b). Das verdeutlicht die Wichtigkeit verschiedener Informationseingänge für die IEG-Expression eines Areals. Als regulatorischer Transkriptionsfaktor bildet das Proteinprodukt von *c-fos* zusammen mit Mitgliedern der Jun-Familie (ebenfalls Transkriptionsfaktoren) Heterodimere, die als AP1-DNA-Bindungskomplex die eigene Transkription (*c-fos*) und die weiterer Gene, wie zum Beispiel anderer Transkriptionsfaktoren, kontrollieren (Übersichtsartikel: Morgan & Curran, 1991; Hooper *et al.*, 1994; Herdegen & Leah, 1998). Als zentrale Elemente dieser Signalkaskade könnten *c-fos* und andere IEG direkten Einfluß auf synaptische Plastizität bzw. Lernen und Gedächtnis haben. Zusätzlich wird aber auch ein eher indirekter Einfluß auf Lernvorgänge diskutiert. Es wird spekuliert, daß *c-fos* und andere IEG einen metaplastischen Zustand in aktivierten Neuronen herstellen, der eine verbesserte Gedächtnisbildung zu einem späteren Zeitpunkt ermöglicht (Guzowski, 2002). Auch als Koinzidenzdetektoren, die mit intrinsischen modulatorischen Systemen interagieren, werden *c-fos* und andere IEG gesehen (Übersichtsartikel: Guzowski, 2002). Von dieser Theorie ausgehend hätte eine erhöhte *c-fos*-Expression alleine keine Bedeutung für das Neuron. Erst im Zusammenspiel mit zusätzlichen Informationseingängen, entweder von extern (Metaplastizität) oder von intern hinzukommend (Koinzidenzdetektion), würde eine Bedeutung im Sinne von Informationsverarbeitung und Plastizität entstehen. Somit würde das Neuron für die Verarbeitung bzw. Speicherung kommender Signale vorbereitet. Dadurch würden vorhergehende Erfahrungen die Speicherung kommender Ereignisse beeinflussen. Wie in C57 Wildtyp-Mäusen mit dem *Taste-Novelty*-Paradigma gezeigt, reagieren Mäuse 30 Minuten nach Stimulation mit einem neuen Geschmack durch eine signifikant erhöhte Expression von *c-fos*-mRNA in verschiedenen Hirnregionen (Montag-Sallaz *et al.*, 1999). Die Wildtyp-Geschwister der CHL1-defizienten Tiere reagierten in gleicher Weise auf die *Novelty*-Erfahrung. Die Stimulation mit Wasser oder einem vertrauten Geschmack hatte eine signifikant niedrigere *c-fos*-Expression zur Folge. Auch CHL1-defiziente Tiere zeigten, genau wie Wildtypen, eine signifikant erhöhte *c-fos*-Expression nach Gabe von Saccharin als neuem

Geschmack. Die Dichte der positiv markierten Zellen war generell nach gustatorischer Stimulation im Vergleich zu Wildtypen signifikant erhöht. Saccharin induzierte 30 Minuten nach Stimulation, ob als neuer oder vertrauter Geschmack, in jedem Fall mehr *c-fos* in den Mutanten als Wasser. Die, unabhängig von der Stimulation, signifikant höhere Dichte an *c-fos*-markierten Zellen in den CHL1-defizienten Tieren könnte die Konsequenz erhöhter synaptischer Aktivität sein (Guzowski, 2002). Lediglich der Gyrus Dentatus blieb von diesem Effekt ausgeschlossen. Die Menge der konsumierten Flüssigkeiten differierte nicht zwischen den Versuchsgruppen. Somit scheint eine Reaktion der Mutanten auf die Wasserdeprivation unwahrscheinlich. Da die erhöhte *c-fos*-Expression nicht in allen Fällen mit einer gleichfalls erhöhten 2DG-Anreicherung verbunden ist, reflektiert sie eher subtile Veränderungen in der neuronalen Aktivierung, die zu einer modifizierten Genexpression führen, als den metabolischen Zustand der Areale.

#### **5.1.1.3 Die *arg3.1/arc*-Expression nach gustatorischer Stimulation**

Die *in situ*-Hybridisierung mit einer cRNA-Sonde gegen *arg3.1/arc* zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Mutanten und den Wildtypen auf. In einigen Arealen CHL1-defizienter Tiere war *arg3.1/arc* in gleicher Weise exprimiert nach Stimulation mit einem neuen wie auch einem vertrauten Geschmack. In den Wildtypen war es eine neue im Gegensatz zu einer vertrauten Saccharinlösung, die eine massive Reaktion in Form von mehr *arg3.1/arc*-positiven Zellen hervorruft (Montag-Sallaz *et al.*, 1999). Dies konnte auch für die Wildtyp-Geschwister gefunden werden. CHL1-defiziente Tiere zeigten nach Stimulation mit Saccharin als neuem Geschmack eine verringerte *arg3.1/arc*-Expression, hingegen nach Stimulation mit vertrautem Saccharin eine stärkere Reaktion als die Kontrolltiere. Dies führte zum Verlust der typischen Expressionsmaxima nach Erfahrung eines neuen Reizes in CHL1-defizienten Tieren. Nach neueren Studien ist es der Neuigkeitscharakter eines Reizes oder einer Lernsituation, der *arg3.1/arc* aktiviert. Bereits vertraute Stimuli oder erlernte Verhaltensweisen rufen eine deutlich geringere Expression hervor (Kelly & Deadwyler, 2002; Montag-Sallaz & Buonviso, 2002). Die Besonderheit von *arg3.1/arc* liegt in seiner zweiphasigen Expression dreißig Minuten und 4,5 Stunden nach Training bzw. Stimulation mit einer neuen Trinklösung (Montag-Sallaz *et al.*, 1999). Frühere Arbeiten bewiesen die Notwendigkeit zumeist zweier proteinsyntheseabhängiger Phasen für die Konsolidierung längerwährender Gedächtnisspuren (Übersichtsartikel: Stork & Welzl, 1999). Kürzlich wurde auch auf mRNA-Ebene gezeigt, daß durch die Gabe von Transkriptionshemmern um die Zeit des Trainings und drei bis sechs Stunden danach eine Etablierung von Langzeitgedächtnis

während der Angst-Konditionierung verhindert werden konnte (Igaz *et al.*, 2002). Wie die Autoren ausführen, umfaßt die erste Phase (30 Minuten nach Beginn) schnell reagierende Gene wie Transkriptionsfaktoren. Die zweite Phase (zwischen drei bis sechs Stunden nach Stimulation) betrifft strukturelle Gene, die für die Modifikationen der synaptischen Verschaltungen verantwortlich sind und somit für die Etablierung von Langzeitgedächtnis. Die direkte Behinderung der Proteinbildung von *arg3.1/arc* durch Applikation von Oligonukleotiden im Hippocampus konnte die Aufrechterhaltung einer LTP und auch gezielt die Konsolidierung von Langzeitgedächtnis im *Water-Maze* stören (Guzowski *et al.*, 2000). Guzowski (2002) stellt eine interessante Hypothese für die Funktion der zweiphasigen *arg3.1/arc*-Expression auf. Die mRNA wird in einem Zeitrahmen von etwa fünfzehn Minuten nach Stimulationsbeginn exprimiert. Danach breitet sie sich mit einer bestimmten Zeitkonstante vom Nukleus radial übers Zellsoma bis in die Dendriten aus. Somit könnte die mRNA von *arg3.1/arc* als Zeitmarke für die Aktivierung eines bestimmten dendritischen Bereichs dienen. Wenn nun in einem gewissen Zeitrahmen wieder eine Aktivierung des Neurons erfolgt, durch z.B. modulatorische Eingänge oder *Feedback*-Schleifen des neuronalen Netzwerks, und eine neue *arg3.1/arc*-Welle den Bereich mit lokal erhöhter *arg3.1/arc*-Konzentration erreicht, wird die mRNA dort aufgehalten und vor Ort translatiert. Durch postulierte Interaktionen des *Arg3.1/Arc*-Proteins mit zytoskelettalen Elementen würden synaptische Verbindungen und damit die Gedächtnisspur gestärkt. Die nach Stimulation eines neuen und vertrauten Geschmack ähnlichen Expressionslevel von *arg3.1/arc* in *CHL1*-defizienten Tieren könnten somit die Konsequenz einer veränderten Verarbeitung neuer bzw. vertrauter Reize sein. Da im Wildtypen ausschließlich nach Stimulation mit einem neuen Geschmack signifikant erhöhte *arg3.1/arc*-Konzentrationen detektiert werden können, deuten die erhöhten *arg3.1/arc*-Expressionslevel in den mutanten Mäusen nach Stimulation mit einem vertrauten Geschmack auf eine veränderte Verarbeitung bzw. Detektion vertrauter Reize hin. Das könnte zur Folge haben, daß *CHL1*-defiziente Tiere nicht in der Lage sind, neue von vertrauten Reizen zu unterscheiden.

#### **5.1.1.4 *Taste-Novelty* und ihre Auswirkung auf verschiedene limbische und neokortikale Areale der *CHL1*-defizienten Maus**

Der Vergleich der drei Marker zur Kartierung der neuronalen Aktivität ergab für einige Hirnareale signifikante Unterschiede zwischen Wildtypen und *CHL1*-defizienten Tieren. So konnte in der Amygdala gezeigt werden, daß nach Stimulation mit Saccharin als neuem oder vertrautem Geschmack in *CHL1*-defizienten Tieren mehr *c-fos* positive Zellen auftraten. Die

Defizienz von CHL1 führte zudem zu einer verstärkten Glukoseanreicherung nach der Stimulation mit Wasser als neutralem Geschmack. Beides spricht für eine generell erhöhte Aktivität der Amygdala CHL1-defizienter Tiere. Allerdings wird durch die 2DG-Methode die Region aktiver Synapsen an Axonterminalien gekennzeichnet. Das heißt, die Projektionen in die Amygdala waren besonders aktiv. Die *arg3.1/arc*-Antwort war so modifiziert, daß Saccharin unabhängig vom Neuigkeitsgehalt eine ähnliche Expression zu einem bestimmten Zeitpunkt innerhalb der CHL1-defizienten Tieren induzierte. Die Amygdala ist für die Verarbeitung emotionaler Prozesse von entscheidender Bedeutung und stellt die Verbindung zwischen Kognition und Affekt her (Übersichtsartikel: LeDoux, 2000). Die menschliche Amygdala wird sowohl durch einen positiven als auch unangenehmen Geschmack aktiviert und hat damit nicht nur bei negativen Erfahrungen einen modifizierenden Einfluß auf die Gedächtnisbildung (O'Doherty *et al.*, 2001). Appetitive Vorgänge werden auch im Tier durch die Amygdala beeinflusst (Baxter & Murray, 2002). Die Zerstörung der Amygdala in Ratten kann auch die Ausprägung von geschmacklicher Neophobie verhindern (Sutherland & McDonald, 1990). Die Amygdala scheint also wichtig dafür zu sein, einen neuen gustatorischen Stimulus als potentiell gefährlich zu markieren. So könnte die veränderte Ausprägung der plastizitätsrelevanten Vorgänge der Amygdala für einen veränderten emotionalen Status der Tiere sprechen, die dann auf die gustatorische Stimulation stärker bzw. anders reagieren. Möglicherweise werden neue und vertraute Reize in gleicher Weise in der CHL1-defizienten Amygdala repräsentiert, weil sie in gleicher Weise bewertet werden.

Auch im anterioren cingulären Kortex gab es signifikante Unterschiede zwischen Wildtypen und Mutanten. In den CHL1-defizienten Tieren wurde wiederum signifikant mehr *c-fos* exprimiert. Scheinbar im Widerspruch dazu steht die geringere Glukoseaufnahme in CHL1-defizienten Tieren nach Stimulation mit Wasser im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern. Die *arg3.1/arc*-Antwort nach Stimulation mit einem neuen Geschmack ist reduziert, so daß das *Novelty*-induzierte Expressionsmaximum im CHL1-defizienten Tier fehlt. Der anteriore cinguläre Kortex ist, als Teil des limbischen Systems, involviert in affektive sowie kognitive Prozesse durch die Modulation interner emotionaler Antworten (Parkinson *et al.*, 2000). Im Menschen wurde durch elektrophysiologische Einzelableitungen gezeigt, daß Neurone des anterioren cingulären Kortex durch Aufmerksamkeit-erfordernde Aufgaben aktiviert werden (Davis *et al.*, 2000). Der anteriore cinguläre Kortex wird unter anderem von der Amygdala innerviert (LeDoux, 2000). Somit könnte die modifizierte Antwort durch die Veränderungen in der Amygdala bedingt sein. Da die 2DG-Kartierung Regionen erhöhter synaptischer Aktivität erfaßt, sind es also die Projektionen in den anterioren cingulären Kortex, die durch eine reduzierte Glukoseaufnahme nach Wasser-Stimulation markiert werden. Auf der anderen

Seite könnte durchaus eine veränderte Bewertung der Stimuli zu einer erhöhten Aufmerksamkeit in den CHL1-defizienten Tieren führen, was zu einer stärkeren Aktivierung des cingulären Kortex führt. Das wiederum spiegelt sich in der erhöhten *c-fos*-Expression nach Gabe eines vertrauten Geschmacks wieder. Als Teil des limbischen Systems ist der cinguläre Kortex aber auch an der Verarbeitung neuer Stimuli beteiligt (Tulving *et al.*, 1994; Strange und Dolan, 2001). Die sowohl bei *c-fos* als auch bei *arg3.1/arc* erhöhten Expressionslevel nach Stimulation mit einer bereits vertrauten Saccharinlösung könnten somit Ausdruck einer veränderten Prozessierung vertrauter Reize sein, die sich in einer gestörten Erkennung bekannter Stimuli äußern würde.

*c-fos* Expressionsstudien an Ratten konnten zeigen, daß auch der parietale Kortex an der *Novelty*-Detektion und damit verbundenen kognitiven Prozessen beteiligt sein könnte (Handa *et al.*, 1993; Badiani *et al.*, 1998). Montag-Sallaz *et al.* (1999) haben bei Mäusen anhand von *in situ*-Hybridisierungen für *c-fos* und *arg3.1/arc* im *Taste-Novelty*-Paradigma ebenfalls eine Beteiligung des parietalen Kortex an der *Novelty*-Detektion und beteiligten kognitiven Prozessen postuliert. Dagegen ist der insulare Kortex an der Diskriminierung von gustatorischen Stimuli beteiligt. Aber auch in komplexeren Lernsituationen scheint der insulare Kortex eine Rolle zu spielen (Brunzell & Kim, 2001). Die veränderte *arg3.1/arc*-Expression in diesen Arealen, ähnliche Konzentrationen der mRNA nach Stimulation mit einer neuen oder vertrauten Saccharinlösung, impliziert eine modifizierte Verarbeitung von Stimuli in CHL1-defizienten Mäusen. Die gleiche Repräsentation der neuen sowie der vertrauten Saccharinlösung könnte dann auf eine möglicherweise gestörte *Novelty*-Erkennung bzw. -Verarbeitung schließen lassen.

Im Gyrus Dentatus wird in den CHL1-defizienten Tieren 30 Minuten nach Stimulation mit Saccharin, ob neu oder vertraut, weniger mRNA von *c-fos* und auch *arg3.1/arc* exprimiert. Da in Wildtyp-Kontrollen keine differenzierte IEG-Antwort im Gyrus Dentatus nach gustatorischer Stimulation auftritt, könnten die Unterschiede im CHL1-defizienten Tier durchaus die *Novelty*-Verarbeitung im Hippocampus beeinflussen. Allerdings hat Handa (1993) in Offenfeldversuchen eine starke *Novelty*-induzierte *c-fos*-Expression in der CA1- und CA3-Region des Hippocampus aber nicht im Gyrus Dentatus gefunden. Dort scheint die IEG-Antwort und *Novelty*-Verarbeitung durch thalamische Eingänge und weniger durch den Gyrus Dentatus gesteuert. Andere Studien haben aber gezeigt, daß die Körnerzellen und ihre Projektionen durchaus an der Verarbeitung neuer Stimuli beteiligt sein können. So fanden Lemaire *et al.* (1999) eine negative Korrelationen zwischen der Neurogenese der Granularzellen im Gyrus Dentatus und der lokomotorischen Reaktion von Ratten auf räumliche *Novelty*. Somit könnte die veränderte Verschaltung der Moosfasern der

Körnerzellen des Gyrus Dentatus auf die Somata der CA3-Neurone des Hippocampus deren Antwort auf eine Stimulation mit neuen bzw. vertrauten Reizen beeinflussen. Zur Überprüfung der Funktionsweise der Moosfasern sowie der Schaffer Kollaterale in CHL1-defizienten Tieren könnten zukünftig elektrophysiologische Untersuchungen einen wertvollen Beitrag leisten.

Wie Guzowski (2002) ausführt, kann die partielle oder komplette Habituation einer IEG-Antwort auf vertraute vs. neue Stimuli zwei wesentliche Gründe haben. Zum einen könnte ein bekannter Stimulus zu einer veränderten neuronalen Aktivität führen. Dabei könnte es sich um elektrische Aktivität handeln, die keine molekulare Aktivierung in Form von einer IEG-Antwort induziert. Die zweite Möglichkeit wäre eine verändertes Verhältnis von neuronaler Aktivität und Genexpression. Zum Beispiel könnte die wiederholte Aktivierung desselben neuronalen Ensembles zu einem Wechselspiel zwischen Signaltransduktionswegen führen, die sich gegenseitig in ihrer Wirkung aufheben. Zum einen würden kernlokalisierte Kinasen mobilisiert, welche aktivierend auf Transkriptionsvorgänge wirken, und zum anderen Phosphatasen, die für die Terminierung derselbigen verantwortlich sind. Es wurde aber auch gezeigt, daß zum Beispiel im Hippocampus nach Abrufen einer erlernten Handlungsweise keine vollständige Habituation verschiedener IEG Antworten (*arg3.1/arc*, *c-fos* und *zif268*) erfolgte (Hess *et al.*, 1995; Guzowski *et al.*, 2001). Gerade die wiederholte IEG-Expression nach dem initialen Lernvorgang und der dadurch aktivierten Signalkaskade könnte, durch die Stärkung bestimmter synaptischer Verbindungen, für eine bessere Etablierung der Gedächtnisspur sorgen. Diese Gedächtnisspur könnte dann weniger anfällig für Extinktion oder Modifikationen sein. Dies wirft im Zusammenhang mit den Befunden der CHL1-defizienten Tiere interessante Aspekte auf. Da die CHL1-defizienten Tiere eine veränderte neuronale Aktivierung im *Taste-Novelty*-Paradigma zeigen, ist möglicherweise das neuronale Netzwerk gestört, daß für die normale Adaption der Reizantwort sorgt. Durch die generell signifikant stärkere *c-fos*-Aktivierung und die nach Stimulation mit einer vertrauten Saccharinlösung signifikant erhöhte *arg3.1/arc*-Expression in CHL1-defizienten Tieren wäre es möglich, daß die Gedächtnisspur häufiger aktiviert und damit stabiler wird. Vorausgesetzt die CHL1-Mutanten zeigten im *Water-Maze*, ähnlich wie in der *Taste-Novelty*, eine veränderte IEG-Expression, würde das die relative Unflexibilität der CHL1-defizienten Tiere beim Umlernen auf eine neue Plattformposition im *Water-Maze* erklären helfen (Montag-Sallaz *et al.*, 2002). Wie die Autoren beschreiben, zeigen CHL1-defiziente Tiere eine Wildtypen vergleichbare Lernkurve beim ersten Erlernen der Position einer versteckten Plattform. Wird nach mehreren Versuchstagen die Plattformposition verändert, schwimmen

CHL1-defiziente Tiere signifikant häufiger über der alten Position der Plattform als Wildtypen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Funktionsweise der CA3-Region des Hippocampus als *Novelty*-Detektor (Vinogradova, 2001). Der entorhinale Kortex projiziert über den perforanten Pfad auf die Körnerzellen des Gyrus Dentatus, die Moosfasern der Körnerzellen verschalten auf die CA3-Neurone, die wiederum zu den CA1-Neuronen projizieren. Diese trisynaptische Verschaltung ist das zentrale Element im Vergleich der Innenwelt (Erwartungshaltung) mit der Außenwelt, was zur Bewertung des Stimulus als neu (absolute *Novelty*) bzw. vertraut führt. Auch ein bekannter Stimulus in einem neuen Kontext wird als neu erkannt (relative *Novelty*). Da die Moosfasern im CHL1-defizienten Gehirn nicht nur auf die apikalen Dendriten sondern auch auf den somatischen Bereich der CA3-Pyramidenzellen zu terminieren scheinen (Montag-Sallaz *et al.*, 2002), ist es möglich, daß die CA3-Pyramidenzellen in veränderter Form auf den synaptischen Eingang der Moosfasern reagieren. Das erhärtet die Vermutung, daß die Verarbeitung neuer vs. vertrauter Stimuli nicht in der üblichen Weise geschieht, da in elektrophysiologischen Studien *Novelty* der adäquate Stimulus zur Aktivierung von CA3-Neuronen war (Vinogradova, 2001). Durch die inkorrekte Verschaltung der Moosfasern auf die Somata der CA3-Neurone, statt auf deren dendritische Bereiche, (Montag-Sallaz *et al.*, 2002) könnte die Ausführung einer simplen *match-mismatch*-Funktion durch die CA3-Region CHL1-defizienter Tiere gestört sein. Diese *match-mismatch*-Funktion, der Abgleich der Erwartungshaltung mit den tatsächlichen Gegebenheiten, die der *Novelty*-Detektion zu Grunde liegt, könnte zu einer falschen Markierung eines Reizes als neu oder auch vertraut führen (Vinogradova, 2001). Infolge dessen verarbeiten andere Strukturen eine eingehende falsch markierte Information nicht adäquat. Diese inkorrekte Verarbeitung könnte sich in einer veränderten IEG-Expression äußern. Das könnte zum Beispiel für die Amygdala der Fall sein, die vom Hippocampus ein falsch markiertes Signal erhielt und es nicht in adäquater Form prozessieren kann (Arnold, 1999). Arnold vermutet, daß eine falsche Markierung von Signalen als neu oder vertraut die grundlegende Störung ist, die der Symptomatik einer Schizophrenieerkrankung zu Grunde liegt. Zahlreiche Studien haben gezeigt, daß Veränderungen im hippocampalen Netzwerk mit Schizophrenie einhergehen (Übersichtsartikel: Greene, 2001). Zu den reproduzierbaren Veränderungen am Zentralnervensystem bei Schizophrenie zählen vergrößerte Ventrikel und Neuronenverluste im Hippocampus (Poltorak *et al.*, 1997). Kürzlich hat Sakurai (2002) eine Korrelation zwischen einer Mutation im humanen CHL1-Gen und Schizophrenie gefunden. Zusätzlich ist ein Verlust der chromosomalen Region 3p26, auf der das CHL1-Gen liegt, an der Ausprägung des 3p- Syndrom im Menschen beteiligt (Angeloni *et al.*, 1999a), welches durch verschiedene

Anomalien und mentale Retardierung gekennzeichnet ist. Der Phänotyp der CHL1-defizienten Tiere weist gewisse Ähnlichkeiten zu Schizophrenie auf, wie vergrößerte laterale Ventrikel oder eine stärkere Expression von NCAM-180 mRNA (Montag-Sallaz *et al.*, 2002). Ob ein Zusammenhang zwischen der veränderten Informationsverarbeitung in CHL1-defizienten Tieren und Schizophrenie besteht, die unter anderem durch eine gestörte *Novelty*-Erkennung gekennzeichnet ist, könnte zum Beispiel durch Verhaltensversuche zur latenten Inhibition oder *Prepulse*-Inhibition überprüft werden.

Die veränderte IEG-Antwort und die zum Teil veränderte metabolische Aktivität in den verschiedenen limbischen und neokortikalen Arealen der CHL1-defizienten Maus nach gustatorischer Stimulation führt zu zwei Theorien, deren Grundlage eine veränderte Informationsverarbeitung ist. Zum einen könnten die *Novelty*-Detektion in CHL1-defizienten Tieren gestört sein, was eine mangelhafte Familiarisierung zur Folge hätte. Zum anderen könnten die modifizierten plastizitätsrelevanten Ereignisse im mutanten Gehirn mit einer veränderten Bewertung von Reizen einhergehen, die zu einer veränderten Verhaltensantwort der Tiere führen würde.

### 5.1.2 Offenfeld-Lochbrett-Test und Geruchs-Kennenlern-Test

Die *Taste-Novelty* ist sehr gut geeignet, Veränderungen molekularer und metabolischer Prozesse im Gehirn zu erfassen. Auf der anderen Seite läßt dieser Versuch aber keinerlei Rückschlüsse auf Lernleistungen zu, da keine meßbaren Verhaltensäußerungen der Tiere auftreten. Deshalb war es erforderlich, das Verhalten der Tiere in standardisierten Verhaltenstests zu erfassen. Verhaltensäußerungen in Testsituationen können als Korrelate von Lernvorgängen bzw. Gedächtnisprozessen genutzt werden, deren Grundlage die Verarbeitung von Informationen ist.

Der Offenfeld-Lochbrett-Test wurde etabliert, um die Reaktionen von Tieren in einer erst neuen und später vertrauten Umgebung zu erfassen. An keinem der sechs Versuchstage konnte ein Unterschied in der Grundaktivität zwischen Wildtypen und CHL1-Mutanten gefunden werden. Das zeigten die gleichen Gesamtweglängen und Gesamtanzahl des Aufrichtens. Auch haben die CHL1-defizienten Tiere die Löcher des Lochbretts genauso oft frequentiert wie die Wildtypen. Die Gesamtweglänge ist sowohl für die Mutanten als auch für die Wildtypen im Verlauf der Testsitzungen gefallen, was ein Ausdruck für Habituation ist. Der einzige signifikante Unterschied zwischen CHL1-defizienten Tieren und Wildtypen war, daß die Mutanten mehr Zeit im Zentrum der Arena verbrachten als ihre Wildtyp-Geschwister.

Die wiederholte Exposition der Box kann Habitationsvorgänge gut sichtbar machen (Crawley, 2000). Durch das Einfügen des Lochbretts, einer neuen Komponente nach drei Tagen Offenfeld-Versuch, sollte der Vorgang der *Novelty*-Erkennung bzw. Habituation deutlicher werden. In vielen Studien wurde gezeigt, daß die Grundaktivität der Tiere steigt, wenn eine neue Situation oder ein neuer Stimulus registriert werden, um bei wiederholter Exposition zu sinken (Daenen *et al.*, 2001; File, 2001). Somit scheinen beide Gruppen in der Lage, die zuerst fremde Situation als späterhin vertraut zu registrieren. Schon ein einmaliger Offenfeld-Test hat einen signifikanten Unterschied zwischen CHL1-Mutanten und Wildtypen in der Zeit im Zentrum der Arena erbracht (Montag-Sallaz *et al.*, 2002). Dieser Umstand verdeutlicht die Robustheit dieses Effekts sowie den hohen Grad an Standardisierung des Versuchs, da zwei verschiedene Versuchsgruppen bei verschiedenen Experimentatoren das gleiche Verhalten zeigen. Daß die CHL1-defizienten Tiere mehr Zeit im Zentrum der Arena verbrachten als Wildtypen kann durch einen veränderten Angststatus, ausgelöst durch die Neuigkeit der Umgebung, oder ein verändertes Explorationsverhalten ausgelöst worden sein. Da die CHL1-defizienten Mäuse über den gesamten Versuchszeitraum von sechs Tagen mehr Zeit im Zentrum der Arena verbrachten als die Kontrolltiere, aber beide Gruppen eine Habituation in Form von sinkender Aktivität erkennen lassen, kann ein durch *Novelty* induzierter veränderter Angststatus ausgeschlossen werden. Montag-Sallaz *et al.* (2002) haben aufgrund des Offenfeld-Tests und Ergebnissen aus *Water-Maze*-Versuchen ebenfalls ein verändertes Explorationsverhalten bei CHL1-defizienten Mäusen diskutiert, da das erhobene Plus-Labyrinth und der Licht-Dunkel-Vermeidungs-Test keine Hinweise auf einen veränderten Angststatus CHL1-defizienter Tiere erbracht haben. Nach Analyse des Offenfeld-Lochbrett-Tests scheint dieser Erklärungsansatz favorisierbar, da CHL1-defiziente Tiere in diesem multimodalen Versuch keine gestörte Habituation erkennen lassen. Womöglich könnte in Zukunft ein modifizierter Testaufbau mit Belohnungssystem helfen, das Explorationsverhalten CHL1-defizienter Tiere gezielter zu untersuchen.

Da in der *Taste-Novelty* ein einziger neuer Stimulus präsentiert wird und eine multimodale Versuchsanordnung wie der Offenfeld-Lochbrett-Test keine Unterschiede in der *Novelty*-Erkennung aufzeigt hat, wurde ein Geruchskennenlern-Test entwickelt. Sowohl die Wildtypen als auch die Mutanten zeigten über sechs Tage immer weniger Interesse an Cyclohexanon (Amaretto-Mandel-Geruch) was sich an der Zahl der Schnüffler als auch in der Gesamtaktivität widerspiegelt. Bei Präsentation von unbekanntem Isoamylacetat (Bananen-Geruch) am siebten Tag stieg das Interesse bei beiden Versuchsgruppen wieder an. Allerdings zeigten die Mutanten an fast allen Tagen eine signifikant stärkere Reaktion auf die Geruchsstimulation in Form von Schnüffeln als die Kontrolltiere.

In diesem Versuchsaufbau haben die Tiere lediglich einen einzeln präsentierten Reiz zuerst als neu und im weiteren Versuchsverlauf als vertraut zu erkennen. Somit kann in diesem Test gezielt untersucht werden, ob die Unterschiede zwischen Wildtypen und CHL1-defizienten Tieren in der Aktivierung verschiedener Hirnareale sich in einem veränderten Verhalten gegenüber neuen oder vertrauten Reizen erfassen lassen. Sowohl das Zeitschema, sieben Tage je dreißig Minuten Stimulation, als auch die Art der Präsentation des Reizes, im Heimkäfig ohne weitere Störung, waren identisch zur *Taste-Novelty*. Cyclohexanon und Isoamylacetat wurden vielfach in Geruchstests bei Kleinnagern eingesetzt (Johnson *et al.*, 1998; Yonemori *et al.*, 2000; Montag-Sallaz & Buonviso, 2002). In keiner der Studien konnte eine besondere Affinität zu oder Aversion gegen diese chemisch reinen Geruchsstoffe bei Nagetieren dokumentiert werden.

Da eine veränderte Terminierung der Rezeptorneurone im olfaktorischen Bulbus der CHL1-defizienten Tiere beschrieben wurde (Montag-Sallaz *et al.*, 2002), ist nicht ganz auszuschließen, daß das zu einer veränderten Geruchsverarbeitung oder -wahrnehmung bei diesen Tieren führt. So wurde gezeigt, daß die korrekte Vernetzung neu gebildeter Neurone im olfaktorischen Bulbus wichtig für die Unterscheidung verschiedener Gerüche ist (Gheusi *et al.*, 2000). Diese Möglichkeit könnte zukünftig experimentell durch Bestimmen von Wahrnehmungsschwellen und der Unterscheidungsfähigkeit strukturell und geruchlich verwandter Moleküle von CHL1-defizienten Tieren untersucht werden. Die Lernleistung der Mutanten in diesem Test scheint aber unbeeinflusst zu sein, da sowohl für die zurückgelegten Weglängen als auch die per Motilitätsplattform erfaßten Aktivitäten vergleichbare Habituationkurven für Wildtypen und CHL1-Mutanten auftreten. Bei Präsentation eines neuen Geruchs (Isoamylacetat) zeigen beide Versuchsgruppen erneut erhöhte Aktivitäten. Die Präsentation der Geruchsstoffe könnte bei CHL1-Mutanten im Vergleich zu Wildtypen zu einer verstärkten Antwort in Form von Schnüffeln führen, weil die Stimuli vom mutanten Gehirn anders bewertet werden. Möglicherweise sind die Gerüche für die Mutanten interessanter bzw. bringen die CHL1-defizienten Tiere ihnen mehr Aufmerksamkeit entgegen, die Lernleistung der Mutanten ist aber vermutlich nicht beeinträchtigt.

Der Vergleich des Offenfeld-Lochbrett-Tests und des Geruchs-Kennenlern-Tests ergibt folgendes Bild. Eine multimodale Versuchsanordnung wie der Offenfeld-Lochbrett-Test läßt bei CHL1-defizienten Tieren keine Probleme im Lernen und Erinnern von Stimuli erkennen. Der Geruchs-Kennenlern-Test mit einem Einzelstimulus verdeutlicht zum einen eine stärkere Verhaltensantwort der Mutanten auf Gerüche, läßt andererseits aber keine Defizite im Familiarisierungsprozeß und der *Novelty*-Detektion erkennen.

### 5.1.3 Angst-Konditionierung und Heiße-Platte-Analgesie-Test

Somit könnten die Ergebnisse aus der *Taste-Novelty* Studie auf ein anderes Problem hindeuten. Die Mutanten scheinen auf gewisse Reize stärker oder differenzierter zu reagieren als Wildtypen. Dies könnte durch eine veränderte Verschaltung der Hirnareale hervorgerufen worden sein, welche die Amygdala und andere für emotionale Prozesse wichtige Areale nicht in geordneter Weise mit dem Gesamtnetzwerk aus neuronalen Verschaltungen verbinden. Um die Funktionsweise der Amygdala und auch des Hippocampus zu überprüfen, wurde eine klassische oder pawlowsche Angst-Konditionierung durchgeführt. Die Verknüpfung eines vormals neutralen Tons (CS) mit einem Fußschock (US) erzeugte sowohl bei CHL1-defizienten als auch Wildtyp-Tieren bei erneuter Präsentation des CS bzw. des Kontexts, in dem die Verknüpfung stattfand, eine typische Verhaltensantwort in Form von Angststarre. Zwischen den Versuchsgruppen gab es keinen Unterschied in der Dauer der gezeigten Angststarre. Somit scheinen weder der Hippocampus noch die Amygdala grundlegend in ihrer Funktion gestört zu sein. Der einzige Unterschied zwischen den Gruppen trat am Tag der Verknüpfung auf. Die Mutanten zeigten signifikant weniger Angststarre, nachdem sie zum ersten Mal den Schock bekamen. Dabei zeigten sie weniger Angststarre während der Präsentation des Tones (nach dem ersten Schock) sowie während des gesamten Interstimulusintervalls.

Für die Assoziation von konditioniertem Stimulus (CS) mit unkonditioniertem Stimulus (US) ist die Amygdala von entscheidender Bedeutung, dagegen ist der Hippocampus wichtig für die Integration aller Sinneseindrücke (Kontext) die diesen Vorgang begleiten (McNish *et al.*, 1997; Fanselow & LeDoux, 1999; Fendt & Fanselow, 1999; Gewirtz & Davis, 2000; Maren, 2001). So führt in Ratten eine operative Läsion des Hippocampus zu einer kontextabhängigen reduzierten Verhaltensantwort (Phillips & LeDoux, 1992). Die klassische Angst-Konditionierung wird vielfach zur Überprüfung der Funktion des Hippocampus und der Amygdala mutanter Mäuse eingesetzt (Crawley, 1999; Crawley, 2000; Gerlai, 2001; Otto *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 2001). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen vermuten, daß keine grundlegenden Fehlfunktionen der Amygdala oder des Hippocampus vorliegen, die eine Angst-Konditionierung beeinflussen würden.

Ob die signifikant verringerte Schock-induzierte Angststarre in CHL1-defizienten Tieren auf eine möglicherweise veränderte Schmerzwahrnehmung zurückzuführen ist, wurde im Heiße-Platte-Analgesie-Test überprüft. Dieser Test wurde entwickelt, um die Wirksamkeit verschiedener analgetisch wirksamer pharmakologischer Substanzen zu überprüfen (Crawley, 2000). Zwischen CHL1-defizienten Tieren und Wildtypen treten keine signifikanten Unterschiede in der Latenzzeit bis zur Reaktion auf die heiße Platte auf. Das läßt die

Schlußfolgerung zu, daß nicht eine veränderte Schmerzwahrnehmung sondern eine vielleicht veränderte Emotionalität für die reduzierte Angststarre der Mutanten während der Konditionierung verantwortlich ist. Eine aktuelle Studie an Mäusen zeigt, daß durch Blockierung der Rezeptoren des Corticotropin-Releasing Hormons (CRH) sowohl in der Amygdala als auch im lateralen Septum die Schock-induzierte Angststarre reduziert werden konnte (Bakshi *et al.*, 2002). Dabei wurde die Schmerzempfindlichkeit oder die generelle motorische Aktivität der Tiere nicht beeinflusst. Es könnte durchaus sein, daß auch in den CHL1-defizienten Tieren eine modifizierte Streßantwort über eine veränderte Hormonausschüttung induziert wird, die durch eine falsche Verknüpfung des neuronalen Netzwerks hervorgerufen würde. Dies könnte in Zukunft durch pharmakologische Studien überprüft werden. Die möglicherweise veränderte Emotionalität CHL1-defizienter Tiere scheint durchaus situationsabhängig zu sein, da zum Beispiel das erhobene Plus-Labyrinth eine signifikant größere Offenarmpräferenz der Mutanten im Vergleich zu Wildtypen erkennen läßt, was ein Ausdruck reduzierter Angst sein könnte (Montag-Sallaz *et al.*, 2002). Dahingegen ließen sich beim Licht-Dunkel-Vermeidungs-Test keine Unterschiede zwischen CHL1-defizienten Tieren und Wildtypen erkennen. Dies deutet weniger auf eine veränderte Emotionalität als vielmehr auf veränderte Verhaltensantworten auf bestimmte Stimuli hin, die durch eine falsche Verknüpfung und damit Interaktion des neuronalen Netzwerkes hervorgerufen werden könnten.

#### **5.1.4 Zusammenfassung für die konventionell CHL1-defizienten Mäuse**

Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der konventionell CHL1-defizienten Tiere hat gezeigt, daß die Abwesenheit von CHL1 zu Veränderungen plastizitätsrelevanter Vorgänge in limbischen und neokortikalen Arealen führt. Nach verhaltensbiologischer Analyse der Tiere können diese Unterschiede als Ausdruck einer veränderten Reaktivität der Tiere auf bestimmte Reize interpretiert werden, die durch morphologische Defekte in der axonalen Terminierung zu Tage treten können. Durch diese Fehlverschaltungen scheint es zu einer veränderten Repräsentation und Bewertung von neuen vs. vertrauten Stimuli im defizienten Gehirn zu kommen, was zu modifizierten Verhaltensantworten führt. Das könnte auf eine veränderte Informationsverarbeitung in Abhängigkeit einer CHL1-Defizienz hindeuten, die gewisse Ähnlichkeiten zur Symptomatik von Schizophrenie aufweist.

## 5.2 Die Analyse der konditionell CHL1-defizienten Linien

Die Analyse der konventionell CHL1-defizienten Tiere hat morphologische und verhaltensbiologische Unterschiede aufgezeigt. Es wird immer wieder diskutiert, ob nicht andere Effekte als das direkte Fehlen eines Moleküls für Veränderungen bei *knock-out*-Organismen verantwortlich sind (Crawley, 1999; Crawley, 2000; Hatcher *et al.*, 2001; van der Staay & Steckler, 2001). So wäre ein Einfluß der Manipulation am Genom und dadurch eventuelle Eingriffe in z.B. Promoter-Bereiche den Ziellokus flankierender Gene denkbar. Hinzu kommt die Unsicherheit, ob nicht kompensatorische Effekte, eine modifizierte Genexpression anderer Moleküle, die Auswirkungen verschleiert bzw. verstärkt haben. So haben Montag-Sallaz *et al.* (2002) eine signifikant höhere Expression von NCAM-180 mRNA im Gehirn CHL1-defizienter Tiere beschrieben. Für andere Zellerkennungsmoleküle (L1, NrCAM, Neurofascin und F3/Contactin) konnten keine Unterschiede im Expressionslevel oder -muster gefunden werden.

Durch die Entwicklung induzierbarer *knock-out*-Mutanten können einige dieser Probleme möglicherweise geklärt werden. Eine erste Analyse der noch nicht beschriebenen konditionell CHL1-defizienten Linien sollte über das Vorkommen des CHL1-Moleküls im Gehirn sowie über mögliche Parallelitäten in der Auswirkung der CHL1-Defizienz auf die Morphologie des Gehirns Auskunft geben.

### 5.2.1 Überprüfung der Funktionalität der *loxP*-Cre-Rekombinase-Systeme

#### 5.2.1.1 Das *loxP*-CMV-Cre-Rekombinase-System

Zur Charakterisierung des *loxP*-CMV-Cre-Rekombinase-Systems wurden Geschwistertiere eingesetzt, die entweder alleine das mit *loxP*-Elementen versehene CHL1-Gen besaßen oder zusätzlich die CMV-Cre-Rekombinase trugen. Über eine PCR mit spezifischen Primern bzw. Southern-Blot mit einer spezifischen Cre-Sonde konnte nachgewiesen werden, daß in Abhängigkeit von der Anwesenheit einer CMV-Cre-Rekombinase das zwischen den *loxP*-Elementen befindliche DNA-Fragment herausgeschnitten wurde. Eine PCR auf DNA aus Schwanzbiopsien zeigt eine genetische Deletion des ersten CHL1-Exons in Tieren mit *loxP*-Elementen und CMV-Cre-Rekombinase. Das ungeschnittene gefloخته CHL1-Fragment konnte per PCR nicht nachgewiesen werden. Dagegen zeigen Kontrolltiere ohne Cre-Rekombinase das gefloخته Gen aber keine Excision. Der Western-Blot mit Proteinextrakt aus *loxP*-CMV-Cre Tieren zeigt mit einem CHL1-Antikörper allerdings keine erkennbare Reduktion des Proteins gegenüber *loxP* Tieren ohne Cre-Rekombinase. Vermutlich ist der

Proteinverlust so gering oder lokal begrenzt, daß er im Gehirnextrakt nicht zu detektieren ist. Die Bildung des CHL1-Proteins im Gehirn wird nach der Geburt herunterreguliert und ist im adulten Tier nur in geringen Mengen nachweisbar (Hillenbrand *et al.*, 1999). Somit reicht die Sensitivität eines Western-Blot mit einem CHL1-Antikörper vermutlich nicht aus, eine Reduktion des CHL1-Proteins in den *loxP*-CMV-Cre-Tieren nachzuweisen.

Wie die Immunhistochemie mit einem Peptidantikörper für CHL1 auf Gewebeschnitten gezeigt hat, ist die hippocampale Moosfaserregion im *loxP*-CMV-Cre-Rekombinase-Tier praktisch nicht detektierbar. Das Geschwistertier ohne Cre-Rekombinase zeigt die CHL1-typische Immunreaktivität, daß heißt die Moosfasern sind deutlich zu erkennen. Dies läßt auf einen hippocampalen Verlust von CHL1 in *loxP*-CMV-Cre-Rekombinase-Tieren schließen. Somit scheint das *loxP*-CMV-Cre-System zu einem Mosaik-Muster von Excisionen im Gehirn zu führen. Dies könnte durch die CMV-Promoter bedingte Aktivität der Cre-Rekombinase in proliferierenden Zellen erklärt werden. Wie in der Literatur beschrieben wird, ist der CMV-Promoter zum Beispiel in der Epidermis der Haut wesentlich stärker aktiv (40 % Excision) als im Gehirn (< 15 % Excision) (Feil *et al.*, 1996; Brocard *et al.*, 1997). Zusätzlich beschränkt sich die Aktivität der CMV-Cre-Rekombinase auf bestimmte Zellpopulationen innerhalb eines Gebiets. Somit scheint das *loxP*-CMV-Cre-System zu einer mosaikartig CHL1-defizienten Maus zu führen, der das CHL1-Protein in Teilbereichen des Gehirns fehlt.

### 5.2.1.2 Das *loxP*-CreER<sup>T</sup>-Rekombinase-System

Zur Analyse des *loxP*-CMV-CreER<sup>T</sup>-Rekombinase Systems wurden Geschwistertiere eingesetzt, die entweder alleine das mit *loxP*-Elementen versehene CHL1-Gen besaßen oder zusätzlich die CMV-CreER<sup>T</sup>-Rekombinase trugen. Mittels PCR konnte gezeigt werden, daß sowohl die *loxP*-Elemente als auch die CreER<sup>T</sup>-Rekombinase nötig waren, um nach fünftägiger Induktion mit Tamoxifen (in Öl) zu einer Excision im Genom zu führen. Die Applikation des Vehikels (Öl) hatte dagegen keinen aktivierenden Effekt auf die CreER<sup>T</sup>-Rekombinase. Das dokumentiert die erfolgreiche Etablierung des beschriebenen *loxP*-CreER<sup>T</sup>-Rekombinase Systems (Metzger *et al.*, 1995; Feil *et al.*, 1996; Brocard *et al.*, 1997; Indra *et al.*, 1999).

Der Gyrus Dentatus sollte als besonders plastisches Areal ein Gebiet mit CMV-CreER<sup>T</sup>-Rekombinase-Aktivität sein, da hier permanent Neurone nachbildet werden. Wiederholte Versuche mittels PCR konnten keine Excision in der DNA des Gyrus Dentatus oder anderen Hirnarealen nachweisen. Lediglich in der DNA der Schwanzbiopsie konnte eine relativ

schwache Excisionsbande detektiert werden. Doch da ein Großteil der DNA aus dem Schwanz aus bereits ausdifferenzierten Zellen stammt, ist der Anteil der Excision im Vergleich zur ungeschnittenen Matrize recht gering. Die Kinetik der PCR könnte für den fehlenden Nachweis der Excision im Gehirn verantwortlich gemacht werden. Die Angaben über den Anteil junger Neurone an den Körnerzellen des Gyrus Dentatus der Ratte schwanken zwischen etwa 6%, das bedeutet täglich kommen ca. 9000 hinzu (Cameron & McKay, 2001), und 15 % (Snyder *et al.*, 2001). Im Gyrus Dentatus können vermutlich nur in dieser Zellpopulation Excisionen auftreten. Falls die Cre-Rekombinase in nur geringem Maße aktiv war, wird in der PCR die im Verhältnis sehr häufig vorliegende mit beiden *loxP*-Elementen versehene ungeschnittene Matrize amplifiziert. Somit kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, daß in einem Teil der jungen Körnerzellen des Gyrus Dentatus Excisionen stattgefunden haben. Für die weitere Analyse dieser Linie wäre es notwendig, auf zellulärer Ebene zu klären, wo die Cre-Rekombinase exprimiert und aktiv wird. Doch auch hier wäre Vorsicht angebracht, da einige Autoren gezeigt haben, daß die Expressionsmuster der mRNA oder des Proteins der Cre-Rekombinase nicht unbedingt die Region der stärksten Aktivität dokumentieren (Tsien *et al.*, 1996; Tsien, 1999; Zeng *et al.*, 2001). Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis der Aktivität der Cre-Rekombinase wäre die Verwendung einer sogenannten Reporterlinie. Tiere die z.B. StopLacZ mit *loxP*-Elementen tragen, könnten mit der CMV-CreER<sup>T</sup>-Linie gekreuzt werden. Nach Herausschneiden der Stop-Sequenz durch die Cre-Rekombinase würde die bakterielle  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert und könnte über eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden (Kellendonk *et al.*, 1999). Wie Zeng *et al.* (2001) beschreiben, ist die Effektivität der Cre-Rekombinase aber entscheidend vom Ziel-Lokus (Lage der *loxP*-Elemente im Genom) abhängig. Somit wäre dieser indirekte Nachweis der Cre-Aktivität auch mit Vorsicht zu betrachten.

### 5.2.2 Morphologische Veränderungen im *loxP*-CMV-Cre-CHL1-defizienten Gehirn

Die Analyse der *loxP*-CMV-Cre-Tiere hat eine lokale Reduktion des CHL1-Proteins im Hippocampus dieser Tiere nachweisen können. Die nächste Frage war, ob die *in vivo*-Deletion von CHL1 durch die CMV-Cre-Rekombinase zu den gleichen morphologischen Defekten im Gehirn führt wie ein konventioneller *knock-out*. Dazu wurden Gehirne mit immunhistochemischen Färbemethoden untersucht. Die Analyse der Hirnmorphologie hat zwei deutlich erkennbare Veränderungen in den Mutanten aufgezeigt. So konnte mit der TIMMs-Färbung und einer Synaptophysin-IHC eine Veränderung in der Moosfaserverschaltung gefunden werden. Die TIMMs-Färbung detektiert das in den

Moosfaserterminalien angereicherte Zink (Cremer *et al.*, 1997; Montag-Sallaz *et al.*, 2002). Mit einem Antikörper gegen Synaptophysin als präsynaptischen Marker können ebenfalls die Moosfaserterminalien angefärbt werden, die reich an synaptischen Vesikeln sind. Cremer *et al.* (1997) haben an NCAM-defizienten Tieren gezeigt, daß diese beiden Färbemethoden sehr gut geeignet sind, Veränderungen in der Moosfaserorganisation bzw. -verschaltung zu detektieren. Wie die Vergrößerungen der hippocampalen Region zeigten, scheinen die Moosfaserterminalien in den induzierbar CHL1-defizienten Tieren nicht nur auf den dendritischen Bereich der CA3-Pyramidenzellen beschränkt zu sein. Die wiederholt markierten Terminalien in der Zellkörperschicht der Pyramidenzellen lassen vermuten, daß es in den CHL1-defizienten Mäusen zu fehlerhaften Verschaltungen der Moosfasern auf die Somata der Pyramidenzellen kam. Diese Befunde decken sich mit den beschriebenen Fehlerterminierungen in den konventionellen *knock-out*-Mäusen (Montag-Sallaz *et al.*, 2002). Somit reicht die lokale Reduktion des CHL1-Moleküls in der hippocampalen Region aus, morphologische Veränderungen, vergleichbar denen im konventionell CHL1-defizienten Tier, herbeizuführen. Der Gyrus Dentatus ist auch im adulten Tier durch eine hohe Plastizität gekennzeichnet, dabei werden permanent junge Neurone in den Zellverband integriert. Somit läßt sich mit einem *knock-out*-Tier, welches schon während der Entwicklung das CHL1-Molekül verlor, nicht beantworten, wie die Fehlverschaltungen in der hippocampalen Region entstanden sind. Bei der *loxP*-CMV-Cre Linie kann der Zeitpunkt der Deletion nicht bestimmt werden. Zum einen könnte die Bahnfindung der Pionieraxone durch das Fehlen des CHL1-Moleküls gestört worden sein, so daß es zu Fehlverschaltungen kam. Das wiederum läßt nachfolgenden Axone ebenfalls falsch auswachsen. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß die Pionieraxone richtig ausgewachsen sind, aber die nachfolgenden Axone durch das Fehlen von CHL1 nicht zielgerichtet folgen konnten. Es könnte sich also um ein Faszikulierungsproblem handeln. Zur Beantwortung dieser Frage könnte ein induzierbarer *knock-out* beitragen, bei dem die Bahnfindung noch unter voller Molekülausstattung stattfindet und daß Molekül erst im adulten Tier ausgeschaltet wird. So könnten nur nachfolgende Axone neu gebildeter Neurone betroffen sein. Bei der Beantwortung dieser Fragen könnte in Zukunft eine Zuchtlinie nützlich werden, bei der die Cre-Rekombinase im adulten Tier zu einem definierten Zeitpunkt durch Tamoxifen-Induktion aktiviert wird und CHL1 deletiert. Dadurch könnte die Zeitspanne der CHL1-Defizienz und das Einsetzen möglicher Kompensationsmechanismen minimiert werden.

Veränderungen in der Verschaltung der hippocampalen Moosfasern lassen sich durch die lokale Häufung der Verschaltungen leichter entdecken als in anderen z.B. kortikalen Bereichen im Gehirn. Doch ist es durchaus berechtigt anzunehmen, daß es auch in anderen

Hirnregionen zu ähnlichen Veränderungen kommt, wenn CHL1 deletiert wird. Da für konventionelle CHL1-defiziente Tiere Defekte im olfaktorischen Bulbus gefunden wurden, wurde dort auch in *loxP*-CMV-Cre-Tieren nach Veränderungen gesucht. Die Neurone des Riechepithels der Nase werden permanent erneuert und müssen darum auch ständig neue Verbindungen mit dem Zielgebiet, den olfaktorischen Bulbi, knüpfen. Die Analyse der Gehirne induzierbar CHL1-defizienter Mäuse durch immunhistochemische Färbemethoden hat Veränderungen in der Terminierung dieser Axone gezeigt. Dazu wurde die DBA-Färbemethode eingesetzt, die eine Teilpopulation dieser Axone angefärbt hat (Tenne-Brown & Key, 1999; Montag-Sallaz *et al.*, 2002). Diese normalerweise in genau einen Glomerulus terminierenden Axone haben in der konstitutiven CHL1-defizienten Maus zum Teil zwei Glomeruli innerviert. Hinzu kommen abrupte Richtungsänderungen dieser Axone. Diese Fehlerterminierungen gleichen den im konventionellen CHL1-*knock-out* beschriebenen Veränderungen (Montag-Sallaz *et al.*, 2002). Allerdings konnte mit einem Western-Blot nicht nachgewiesen werden, daß eine Reduktion des CHL1-Proteins im olfaktorischen Bulbus der *loxP*-CMV-Cre Tiere vorlag (Daten nicht gezeigt). Das wäre wiederum durch die geringe Sensitivität des Western-Blot für das im adulten Gehirn nur gering vorhandene CHL1 zu erklären. Die wenigen Fehlerterminierungen könnten darauf hindeuten, daß nur in vereinzelt Rezeptorneuronen eine Deletion von CHL1 stattgefunden hat.

Eine veränderte Bahnfindung von Axonen wurde auch in defizienten Tieren verschiedener anderer neuraler Zelladhäsionsmoleküle gefunden, wie bei L1 (Cohen *et al.*, 1998; Castellani *et al.*, 2000), Contactin (Berglund *et al.*, 1999), NCAM (Cremer *et al.*, 1997) oder Netrin-1 (Serafini *et al.*, 1996; Barallobre *et al.*, 2000). In diesen Mutanten sind nicht alle Axone in ihrer Bahnfindung gestört. Genau wie in der CHL1-defizienten Maus ist es immer nur ein gewisser Anteil der Axone einer Region. Die vorliegende Studie hat gezeigt, daß die konstitutive Excision des ersten Exons des CHL1-Gens durch die Cre-Rekombinase *in vivo* und der daraus resultierenden lokalen Reduktion des CHL1-Proteins zu vergleichbaren morphologischen Defekten im Gehirn führt wie die konventionelle *Gene-targeting* Methode zur Herstellung eines CHL1-defizienten Tieres.

### 5.3 Vergleich der konventionell und konditionell CHL1-defizienten Mäuse

Wie Montag-Sallaz *et al.* (2002) ausführen, bilden die Zellen des olfaktorischen Bulbus kein CHL1-Transkript. Dagegen kann auf einem Proteinextrakt mit spezifischen Antikörpern gegen CHL1 das Protein im olfaktorischen Bulbus nachgewiesen werden. Dies läßt sich nur erklären, wenn die Fasern der in den olfaktorischen Bulbus projizierenden Neurone CHL1

enthalten. Die immunhistochemisch nachgewiesene axonale Lokalisation von CHL1, die Zellkörper sind mit einem CHL1-Antikörper nur minimal anzufärben, spricht dafür, daß die auswachsenden Axone ihr Ziel finden können, ohne daß das Zielgebiet überhaupt das CHL1 Protein bildet. Das verdeutlichen auch die Axone des Riechepithels, die in die olfaktorischen Bulbi einwachsen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie haben die Aussagen gestärkt, daß die Abwesenheit des CHL1-Moleküls die Wahrscheinlichkeit erhöht, daß es zu Fehlern in der Terminierung von Axonen kommt. Dies illustrieren sowohl die abweichenden Terminierungen der Moosfaserprojektionen im Hippocampus als auch die Projektionen der Rezeptorneurone des Riechepithels in die olfaktorischen Bulbi der *loxP*-CMV-Cre-Rekombinase-Tiere. Diese sogenannte Phänokopie der konventionell CHL1-defizienten Linie durch das *loxP*-Cre-System auf hirnmorphologischer Ebene läßt den Schluß zu, daß nicht die Manipulation am CHL1-Lokus, und eine dadurch mögliche Beeinträchtigung benachbarter Gene, zu diesen Effekten führte. Die äquivalenten Mutationen des CHL1-Gens können für diese Effekte verantwortlich gemacht werden. Allerdings kann mit diesen Mutanten nicht beantwortet werden, ob es eventuelle Kompensationsmechanismen gibt, die diese Effekte teilweise gemildert oder gar verstärkt haben. Dazu könnte die Weiterentwicklung bzw. Analyse konditioneller *knock-out*-Systeme in Zukunft einen Beitrag leisten.

Somit ist ein bestimmtes Zellerkennungsmolekül wichtig für die Optimierung der Bahnfindung bzw. Faszikulierung von Axonen. Durch die vielfältigen Interaktionen der membranständigen Zelladhäsionsmoleküle der L1-Familie mit dem umgebenden Milieu, es gibt homophile oder auch heterophile Bindungsmöglichkeiten, helfen diese Moleküle beim zielgerichteten Auswachsen der Wachstumskegel. Fehlt nun eines dieser speziellen Moleküle, wird es womöglich teilweise oder auch ganz in seiner Funktion durch eines der anderen ersetzt. Das kann wiederum zu schwächeren oder gar drastischeren Effekten in defizienten Tieren führen. So konnte die transgene Expression von NCAM-180 einige von den verhaltensbiologischen Defiziten NCAM-defizienter Tiere beheben (Stork *et al.*, 2000). Die morphologischen Veränderungen im Hippocampus konnten dadurch allerdings nicht unterdrückt werden.

Da für andere Mitglieder der L1-Familie eine direkte Beteiligung an lernrelevanten Ereignissen diskutiert wird (Mileusnic *et al.*, 1999; Pradel *et al.*, 1999; Pradel *et al.*, 2000), kann eine solche Funktion auch für das CHL1-Molekül vermutet werden. Den verhaltensbiologisch untersuchten konventionellen *knock-out*-Tiere fehlte das CHL1-Molekül während ihrer gesamten Lebenszeit. Aus diesem Grund ist es schwierig zu sagen, ob die Effekte in Lern- und Verhaltenstests ausschließlich auf die fehlerhafte Entwicklung des

Nervensystems zurückzuführen sind, oder ob das akute Fehlen des Moleküls während des Lernvorganges auch einen direkten Einfluß hatte. Ob die beschriebenen Fehlverschaltungen ausreichen, die gefundenen Verhaltensunterschiede der CHL1-*knock-outs* zu erklären, bleibt zu überprüfen. Allerdings wurde gezeigt, daß Zellerkennungsmoleküle durch ihre intrazelluläre Domäne direkt an Signaltransduktionsprozessen der Zelle während Lernvorgängen beteiligt sind (Übersichtsartikel: Fields & Itoh, 1996). Somit ist es nicht unwahrscheinlich, daß auch CHL1 einen direkten Einfluß auf Lernvorgänge hat. Da auch die konditionell CHL1-defizienten Tiere der *loxP*-CMV-Cre-Linie morphologische Defekte aufweisen, können diese Tiere zur Beantwortung dieser Frage nicht eingesetzt werden. Der Tamoxifen induzierbare *knock-out*, der erst nach abgeschlossener Juvenilentwicklung des Tieres induziert wird, könnte hierbei helfen. Das neuronale Netzwerk sollte in diesem Tier intakt sein und es bliebe weniger Zeit für das Einsetzen kompensatorischer Effekte. Möglicherweise könnte solch ein induzierbarer *knock-out* die Frage beantworten, ob das akute Fehlen des Moleküls im Gehirn Auswirkungen auf Plastizitätsvorgänge wie Lernen und Gedächtnis hat. Dazu ist aber noch nötig zu klären, ob es in diesem Tier zur Reduktion von CHL1 gekommen ist. Möglicherweise wäre eine Cre-Rekombinase-Linie hilfreich, die auch in ausdifferenzierten Neuronen aktiv ist, um den Anteil der von einer Excision betroffenen Zellen zu erhöhen.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde eine Mutation in der Signalsequenz des humanen CHL1 (CALL) mit Schizophrenie korreliert (Sakurai *et al.*, 2002). Da immer wieder von hippocampalen Veränderungen in Schizophrenie-Patienten berichtet wird, wäre es interessant zu überprüfen, ob die CHL1-defiziente Maus nicht schizophrenieähnliche Symptome aufweist. Eine Möglichkeit zur Überprüfung dieser Hypothese wären Verhaltensexperimente zur *Prepulse*-Inhibition oder latenten Inhibition. Bei der latenten Inhibition handelt es sich um eine modifizierte Angst-Konditionierung. Dabei wird dem Tier vor der eigentlichen Konditionierungssitzung der neutrale Stimulus oder der Kontext präsentiert. Der bereits als harmlos kennengelernte Stimulus kann nachfolgend schlechter mit dem negativen Stimulus assoziiert werden und die Angst-Reaktion auf den konditionierten Stimulus schwächer ausfallen als bei einer konventionellen Konditionierung. Bei Präexposition des konditionierten Stimulus (z.B. Ton) sowie des Kontext kommt es zu einer deutlichen *c-fos*-Expression in der Amygdala und anderen Strukturen, die bei wiederholter Exposition des Reizes fehlt. Diesen Effekt der Habituation der IEG-Antwort auf einen bekannten Reiz bietet Radulovic (1998) als Erklärungsansatz für das Phänomen der latenten Inhibition. Die in der *Taste-Novelty*-Studie gefundene signifikant erhöhte *c-fos*-Expression sowie die gleichförmige Induktion von *arg3.1/arc* durch sowohl neue als auch vertraute

Stimuli in der Amygdala und anderen Arealen könnte durchaus dafür sprechen, daß die latente Inhibition in CHL1-defizienten Tieren möglicherweise gestört ist.

#### 5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden konventionelle CHL1-*knock-out*-Mäuse verhaltensbiologisch untersucht, um herauszufinden, ob Prozesse der Informationsverarbeitung aufgrund von Fehlverschaltungen des neuronalen Netzwerkes verändert sind. Dabei wurden signifikante Unterschiede in der Ausprägung plastizitätsrelevanter Vorgänge in verschiedenen limbischen und neokortikalen Regionen, wie der Amygdala und dem anterioren cingulären Kortex, im CHL1-defizienten Tier gefunden. Die generell signifikant stärkere *c-fos*-Expression nach gustatorischer Stimulation, sowie die vergleichbare *arg3.1/arc*-Expression nach Stimulation mit einem neuen oder vertrauten Geschmack, lassen auf eine veränderte Repräsentation bzw. Verarbeitung von Stimuli im mutanten Gehirn schließen. Verschiedene Verhaltenstests zur Überprüfung von *Novelty*-Detektion und Familiarisierung ließen keine Modifizierung dieser Prozesse in Abwesenheit von CHL1 erkennen. Vielmehr scheinen Informationen nicht korrekt verarbeitet zu werden, so daß zum Beispiel angstvolle Situationen oder vertraute Stimuli zu veränderten Verhaltensäußerungen führen können.

Die Analyse induzierbarer CHL1-defizienter Tiere hat zum einen den Hinweis darauf erbracht, daß die Ausnutzung eines *loxP*-CMV-Cre-Rekombinase-Systems zu einem vermutlich mosaikartigen CHL1-defizienten Tier führt. Zum anderen haben immunhistochemische Färbemethoden gezeigt, daß die lokale Reduktion des CHL1-Proteins zu einer Phänokopie der morphologischen Defekte des konventionellen *knock-outs* führte. So wurde sowohl eine abweichende Terminierung der Moosfasern auf die CA3-Pyramidenzellschicht als auch eine veränderte Terminierung der Rezeptorneurone des Riechepithels in die Glomeruli der olfaktorischen Bulbi dokumentiert.

Ein vorrangiges Ziel weiterführender Arbeiten besteht in der Überprüfung der Funktionalität der zum Teil fehlerhaften neuronalen Netzwerke der CHL1-defizienten Maus. Dazu würden zum Beispiel elektrophysiologische Untersuchungen der hippocampalen Region und der Amygdala sowie pharmakologische Studien einen wichtigen Beitrag leisten. Außerdem könnte die Geruchswahrnehmung der CHL1-Mutanten überprüft werden. Ein entscheidender Beitrag zur Aufdeckung der Funktion von CHL1 *in vivo* wäre zudem die Weiterentwicklung und Analyse von konditionell CHL1-defizienten Tieren, in dem das Molekül zu einem frei wählbaren Zeitpunkt ausgeschaltet wird. Damit könnten Entwicklungsfehler und auch die

Herausbildung von Kompensationseffekten verringert werden und die Auswirkung des akuten Fehlens von CHL1 in verhaltensbiologischen Tests überprüft werden. Das könnte einen möglichen direkten Einfluß des CHL1-Moleküls auf Lernvorgänge sichtbar machen.

Weiterhin wäre es interessant, ob der beim Menschen vermutete Zusammenhang zwischen Mutationen im CHL1-Gen und dem Auftreten von Schizophrenie auch in der defizienten Maus gefunden werden kann, da schon Ähnlichkeiten in der gestörten Informationsverarbeitung aufgedeckt wurden. Dafür würden sich z.B. Verhaltenstests zur *Prepulse*-Inhibition oder latenten Inhibition eignen.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Anagnostaras SG, Gale GD, Fanselow MS (2001) Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus* 11: 8-17.
- Angeloni D, Lindor NM, Pack S, Latif F, Wei M-H, Lerman MI (1999a) CALL gene is haploinsufficient in a 3p-syndrome patient. *Am J Med Genet* 86: 482-485.
- Angeloni D, Wei M-H, Lerman MI (1999b) Two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the CALL gene for association studies with IQ. *Psych Genet* 9: 165-167.
- Arnold OH (1999) Schizophrenia - A disturbance of signal interaction between the entorhinal cortex and the dentate gyrus? The contribution of experimental dibenamine psychosis to the pathogenesis of schizophrenia: A hypothesis. *Neuropsychobiology* 40: 21-32.
- Attardi DG, Sperry RW (1963) Preferential selection of central pathways by regenerating optic fibers. *Exp Neurol* 7: 46-64.
- Badiani A, Oates MW, Day HEW, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (1998) Amphetamine-induced behavior, dopamine release, and c-fos mRNA expression: modulation by environmental novelty. *J Neurosci* 18: 10579-10593.
- Bailey DJ, Rosebush JC, Wade J (2002) The hippocampus and caudomedial neostriatum show selective responsiveness to conspecific song in the female zebra finch. *J Neurobiol* 52: 43-51.
- Bailey MS, Puche AC, Shipley MT (1999) Development of the olfactory bulb: evidence for glia-neuron interactions in glomerular formation. *J Comp Neurol* 415: 423-448.
- Bakshi VP, Smith-Roe S, Newman SM, Grigoriadis DE, Kalin NH (2002) Reduction of stress-induced behavior by antagonism of corticotropin-releasing hormone 2 (CRH2) receptors in lateral septum or CRH1 receptors in amygdala. *J Neurosci* 22: 2926-2935.
- Barallobre MJ, Del Rio JA, Alcantara S, Borrell V, Aguado F, Ruiz M, Carmona MA, Martin M, Fabre M, Yuste R, Tessier-Lavigne M, Soriano E (2000) Aberrant development of hippocampal circuits and altered neural activity in netrin 1-deficient mice. *Development* 127: 4797-4810.
- Bartsch U, Schachner M (1999) Die L1-defiziente Maus: ein Tiermodell für die Erbkrankheit CRASH. *Neuroforum* 4: 108-114.
- Baxter MG, Murray EA (2002) The amygdala and reward. *Nat Rev Neurosci* 3: 563-573.
- Berglund EO, Murai KK, Fredette B, Sekerkova G, Marturano B, Weber L, Mugnaini E, Ranscht B (1999) Ataxia and abnormal cerebellar microorganization in mice with ablated contactin gene expression. *Neuron* 24: 739-750.
- Braun S, Scheich H (1997) Influence of experience on the representation of the "mothering call" in frontoparietal and auditory cortex of pups of the rodent *Oktodon degus*: FDG mapping. *J Comp Physiol A* 181: 697-709.

- Brocard J, Warot X, Wendling O, Messaddeq N, Vonesch JL, Chambon P, Metzger D (1997) Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14559-14563.
- Brunzell DH, Kim JJ (2001) Fear conditioning to tone, but not to context, is attenuated by lesions of the insular cortex and posterior extension of the intralaminar complex in rats. *Behav Neurosci* 115: 365-375.
- Cameron HA, McKay RDG (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435: 406-417.
- Caputto BL, Guido ME (2000) Immediate early gene expression within the visual system: light and circadian regulation in the retina and the suprachiasmatic nucleus. *Neurochem Res* 25: 153-162.
- Castellani V, Chédotal A, Schachner M, Faivre-Sarrailh C, Rougon G (2000) Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* 27: 237-249.
- Chaisuksunt V, Zhang Y, Anderson PN, Campbell G, Vaudano E, Schachner M, Lieberman AR (2000) Axonal regeneration from CNS neurons in the cerebellum and brainstem of adult rats: correlation with the patterns of expression and distribution of messenger RNAs for L1, CHL1, c-jun and growth-associated protein-43. *Neuroscience* 100: 87-108.
- Chen J, Kelz MB, Zeng G, Sakai N, Steffen C, Shockett PE, Picciotto MR, Duman RS, Nestler EJ (1998) Transgenic animals with inducible, targeted gene expression in brain. *Mol Pharmacol* 54: 495-503.
- Chen S, Mantei N, Dong L, Schachner M (1999) Prevention of neural cell death by neural adhesion molecules L1 and CHL1. *J Neurobiol* 38: 428-439.
- Cohen NR, Taylor JS, Scott LB, Guillery RW, Soriano P, Furley AJ (1998) Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Curr Biol* 8: 26-33.
- Crawley JN (1999) Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res* 835: 18-26.
- Crawley JN (2000) *What's Wrong With My Mouse? - Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice*. New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-Liss.
- Cremer H, Chazal G, Goridis C, Represa A (1997) NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 8: 323-335.
- Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ (1995) Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64: 477-505.

- Daenen EW, Van der Heyden JA, Kruse CG, Wolterink G, Van Ree JM (2001) Adaptation and habituation to an open field and responses to various stressful events in animals with neonatal lesions in the amygdala or ventral hippocampus. *Brain Res* 918: 153-165.
- Davis KD, Hutchison WD, Lozano AM, Tasker RR, Dostrovsky JO (2000) Human anterior cingulate cortex neurons modulated by attention-demanding tasks. *J Neurophysiol* 83: 3575-3577.
- De Angelis E, Brummendorf T, Cheng L, Lemmon V, Kenwrick S (2001) Alternative use of a mini exon of the L1 gene affects L1 binding to neural ligands. *J Biol Chem* 276: 32738-32742.
- Dewar D, McCulloch J (1992) Mapping functional events in the CNS with 2-deoxyglucose autoradiography. In: *Quantitative methods in neuroanatomy* (Stewart MG, ed), pp 57-84: John Wiley & Sons.
- Duncan GE, Moy SS, Knapp DJ, Mueller RA, Breese GE (1998) Metabolic mapping of the rat brain after subanesthetic doses of ketamine: potential relevance to schizophrenia. *Brain Res* 787: 181-190.
- Emmert MH, Herman JP (1999) Differential forebrain c-fos mRNA induction by ether inhalation and novelty: evidence for distinctive stress pathways. *Brain Res* 845: 60-67.
- Eriksson B, Bergqvist I, Eriksson M, Holmberg D (2000) Functional expression of Cre recombinase in sub-regions of mouse CNS and retina. *FEBS Letters* 479: 106-110.
- Fanselow MS (1998) Pavlovian conditioning, negative feedback, and blocking: mechanisms that regulate association formation. *Neuron* 20: 625-627.
- Fanselow MS, LeDoux JE (1999) Why we think plasticity underlying pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron* 23: 229-232.
- Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P (1996) Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10887-10890.
- Fendt M, Fanselow MS (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 743-760.
- Fields RD, Itoh K (1996) Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *TINS* 19: 473-480.
- File SE (2001) Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res* 125: 151-157.
- Filipkowski RK, Rydz M, Berdel B, Morys J, Kaczmarek L (2000) Tactile experience induces c-fos expression in rat barrel cortex. *Learning & Memory* 7: 116-122.
- Garavan H, Pendergrass JC, Ross TJ, Stein EA, Risinger RC (2001) Amygdala response to both positively and negatively valenced stimuli. *NeuroReport* 12: 2779-2783.
- Garner CC, Zhai RG, Gundelfinger ED, Ziv NE (2002) Molecular mechanisms of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci* 25: 243-251.

- Gass P, Bruehl C, Herdegen T, Kiessling M, Lutzenburg M, Witte OW (1997) Induction of FOS and JUN proteins during focal epilepsy: congruences with and differences to [14C]deoxyglucose metabolism. *Mol Brain Res* 46: 177-184.
- Gerlai R (2001) Behavioral tests of hippocampal function: simple paradigms complex problems. *Behav Brain Res* 125: 269-277.
- Gewirtz JC, Davis M (2000) Using pavlovian higher-order conditioning paradigms to investigate the neural substrates of emotional learning and memory. *Learn Mem* 7: 257-266.
- Gheusi G, Cremer H, McLean H, Chazal G, Vincent J-D, Lledo P-M (2000) Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1823-1828.
- Goodman CS (1996) Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu Rev Neurosci* 19: 341-377.
- Greene R (2001) Circuit analysis of NMDAR hypofunction in the hippocampus, in vitro, and psychosis of schizophrenia. *Hippocampus* 11: 569-577.
- Guzowski JF (2002) Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus* 12: 86-104.
- 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.
- Handa RJ, Nunley KM, Bollnow MR (1993) Induction of c-fos mRNA in the brain and anterior pituitary gland by a novel environment. *Neuroreport* 4: 1079-1082.
- Hatcher JP, Jones DN, Rogers DC, Hatcher PD, Reavill C, Hagan JJ, Hunter AJ (2001) Development of SHIRPA to characterise the phenotype of gene-targeted mice. *Behav Brain Res* 125: 43-47.
- 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 Rev* 28: 370-490.
- Herrera DG, Robertson HA (1996) Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol* 50: 83-107.
- Hess US, Lynch G, Gall CM (1995) Regional patterns of c-fos mRNA expression in rat hippocampus following exploration of a novel environment versus performance of a well-learned discrimination. *J Neurosci* 15: 7796-7809.

- Hillenbrand R, Molthagen M, Montag D, Schachner M (1999) The close homologue of the neural adhesion molecule L1 (CHL1): patterns of expression and promotion of neurite outgrowth by heterophilic interactions. *Eur J Neurosci* 11: 813-826.
- Hirasawa M, Cho A, Sreenath T, Sauer B, Julien J-P, Kulkarni AB (2001) Neuron-specific expression of Cre recombinase during the late phase of brain development. *Neurosci. Res* 40: 125-132.
- Holm J, Hillenbrand R, Steuber V, Bartsch U, Moos M, Lübbert H, Montag D, Schachner M (1996) Structural features of a close homologue of L1 (CHL1) in the mouse: a new member of the L1 family of neural recognition molecules. *Eur J Neurosci* 8: 1613-1629.
- Honkaniemi J, Kainu T, Ceccatelli S, Rechart L, Hökfelt T, Pelto-Huikko M (1992) Fos and jun in rat central amygdaloid nucleus and paraventricular nucleus after stress. *NeuroReport* 3: 849-852.
- Hooper ML, Chiasson BJ, Robertson HA (1994) Infusion into the brain of an antisense oligonucleotide to the immediate-early gene c-fos suppresses production of Fos and produces a behavioral effect. *Neuroscience* 63: 917-924.
- Hortsch M (1996) The L1 family of neural cell adhesion molecules: old proteins performing new tricks. *Neuron* 17: 587-593.
- Hummler E, Cole TJ, Blendy JA, Ganss R, Aguzzi A, Schmid W, Beermann F, Schutz G (1994) Targeted mutation of the CREB gene: compensation within the CREB/ATF family of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5647-5651.
- Igaz LM, Vianna MR, Medina JH, Izquierdo I (2002) Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J Neurosci* 22: 6781-6789.
- Indra AK, Warot X, Brocard J, Bornert J-M, Xiao J-H, Chambon P, Metzger D (1999) Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER<sup>T</sup> and Cre-ER<sup>T2</sup> recombinases. *Nucleic Acids Res* 27: 4324-4327.
- Irie Y, Yamagata K, Gan Y, Miyamoto K, Do E, Kuo C-H, Taira E, Miki N (2000) Molecular cloning and characterization of Amida, a novel protein which interacts with a neuron-specific immediate early gene product Arc, contains novel nuclear localization signals, and causes cell death in cultured cells. *J Biol Chem* 275: 2647-2653.
- Ivanco TL, Greenough WT (2002) Altered mossy fiber distributions in adult Fmr1 (FVB) knockout mice. *Hippocampus* 12: 47-54.
- Jenkins SM, Kizhatil K, Kramarcy NR, Sen A, Sealock R, Bennett V (2001) FIGQY phosphorylation defines discrete populations of L1 cell adhesion molecules at sites of cell-cell contact and in migrating neurons. *J Cell Sci* 114: 3823-3835.
- Johnson BA, Woo CC, Leon M (1998) Spatial coding of odorant features in the glomerular layer of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 393: 457-471.

- Jourdan F, Duveau A, Astic L, Holley A (1980) Spatial distribution of [ $^{14}\text{C}$ ]-2-deoxyglucose uptake in the olfactory bulbs of rats stimulated with two different odours. *Brain Res* 188: 139-154.
- Juliano RL (2002) Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 283-323.
- Kamiguchi H, Lemmon V (2000) IgCAMs: bidirectional signals underlying neurite growth. *Curr Opin Cell Biol* 12: 598-605.
- Kearney JAF, Frey KA, Albin RL (1997) Metabotropic glutamate agonist-induced rotation: a pharmacological, FOS immunohistochemical, and [ $^{14}\text{C}$ ]-2-deoxyglucose autoradiographic study. *J Neurosci* 17: 4415-4425.
- Kellendonk C, Tronche F, Casanova E, Anlag K, Opherk C, Schütz G (1999) Inducible site-specific recombination in the brain. *J Mol Biol* 285: 175-182.
- Kelly MP, Deadwyler SA (2002) Acquisition of a novel behavior induces higher levels of Arc mRNA than does overtrained performance. *Neuroscience* 110: 617-626.
- 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.
- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23: 155-184.
- Lemaire V, Aurousseau C, Le Moal M, Abrous DN (1999) Behavioural trait of reactivity to novelty is related to hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 11: 4006-4014.
- 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 USA* 92: 5734-5738.
- Lipscomb BW, Treloar HB, Greer CA (2002) Novel microglomerular structures in the olfactory bulb of mice. *J Neurosci* 22: 766-774.
- Lisman JE, Otmakhova NA (2001) Storage, recall, and novelty detection of sequences by the hippocampus: elaborating on the SOCRATIC model to account for normal and aberrant effects of dopamine. *Hippocampus* 11: 551-568.
- Liu Q, Dwyer ND, O'Leary DDM (2000) Differential expression of COUP-TFI, CHL1, and two novel genes in developing neocortex identified by differential display PCR. *J Neurosci* 20: 7682-7690.
- Lorenzini CGA, Baldi E, Bucherelli C, Sacchetti B, Tassoni G (1999) Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. *Neurobiol. Learning & Memory* 71: 1-18.

- Löwel S (2002) 2-Deoxyglucose architecture of cat primary visual cortex. In: The cat primary visual cortex (Payne BR, Peters A, eds), pp 167-193. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press, Harcourt Inc.
- Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders L, 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.
- Malhotra JD, Tsiotra P, Karagogeos D, Hortsch M (1998) Cis-activation of L1-mediated ankyrin recruitment by TAG-1 homophilic cell adhesion. *J Biol Chem* 273: 33354-33359.
- Mansuy IM, Mayford M, Kandel ER (1999) Regulated temporal and spatial expression of mutants of CamKII and calcineurin with the tetracycline-controlled transactivator (tTA) and reverse tTA (rtTA) systems. In: Handbook of Molecular-Genetic Techniques for Brain and Behavior Research (Crusio WE, Gerlai RT, eds), pp 291-304: Elsevier Science BV.
- Maren S (2001) Neurobiology of pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* 24: 897-931.
- McNish KA, Gewirtz JC, Davis M (1997) Evidence of contextual fear after lesions of the hippocampus: a disruption of freezing but not fear-potentiated startle. *J Neurosci* 17: 9353-9360.
- Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P (1995) Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6991-6995.
- Mileusnic R, Lancashire C, Rose SPR (1999) Sequence-specific impairment of memory formation by NCAM antisense oligonucleotides. *Learning & Memory* 6: 120-127.
- Montag-Sallaz M, Buonviso N (2002) Altered odor-induced expression of c-fos and arg 3.1 immediate early genes in the olfactory system after familiarization with an odor. *J Neurobiol* 52: 61-72.
- Montag-Sallaz M, Schachner M, Montag D (2002) Misguided axonal projections, neural cell adhesion molecule 180 mRNA upregulation, and altered behavior in mice deficient for the close homolog of L1. *Mol Cell Biol* 22: 7967-7981.
- Montag-Sallaz M, Welzl H, Kuhl D, Montag D, Schachner M (1999) Novelty-induced increased expression of the immediate early genes c-fos and arg3.1 in the mouse brain. *J Neurobiol* 38: 234-246.
- Morgan JI, Curran T (1991) Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* 14: 421-451.
- Murphy KJ, Regan CM (1998) Contributions of cell adhesion molecules to altered synaptic weightings during memory consolidation. *Neurobiol. Learning & Memory* 70: 73-81.

- Nader K, Majidishad P, Amorapanth P, LeDoux JE (2001) Damage to the lateral and central, but not other, amygdaloid nuclei prevents the acquisition of auditory fear conditioning. *Learning & Memory* 8: 156-163.
- Nagy A (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26:99-109.
- Navarro M, Spray KJ, Cubero I, Thiele TE, Bernstein IL (2000) cFos induction during conditioned taste aversion expression varies with aversion strength. *Brain Res* 887: 450-453.
- O'Doherty J, Rolls ET, Francis S, Bowtell R, McGlone F (2001) Representation of pleasant and aversive taste in human brain. *J Neurophysiol* 85: 1315-1321.
- Otto C, Kovalchuk Y, Wolfer DP, Gass P, Martin M, Zuschratter W, Grone HJ, Kellendonk C, Tronche F, Maldonado R, Lipp HP, Konnerth A, Schutz G (2001) Impairment of mossy fiber long-term potentiation and associative learning in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor-deficient mice. *J Neurosci* 21: 5520-5527.
- Parkinson JA, Willoughby PJ, Robbins TW, Everitt BJ (2000) Disconnection of the anterior cingulate cortex and nucleus accumbens core impairs pavlovian approach behavior: further evidence for limbic cortical-ventral striatopallidal systems. *Behav Neurosci* 114: 42-63.
- Paxinos G, Franklin KBJ (2001) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, Second Edition Edition. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press.
- Pearse D, Mirza A, Leah J (2001a) Jun, Fos and Krox in the hippocampus after noxious stimulation: simultaneous-input-dependent expression and nuclear speckling. *Brain Res* 894: 193-208.
- Pearse DD, Bushell G, Leah JD (2001b) Jun, Fos and Krox in the thalamus after C-fiber stimulation: coincident-input-dependent expression, expression across somatotopic boundaries, and nucleolar translocation. *Neuroscience* 107: 143-159.
- Phillips RG, LeDoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106: 274-285.
- Picciotto MR, Wickman K (1998) Using knockout and transgenic mice to study neurophysiology and behavior. *Physiol Rev* 78: 1131-1163.
- Pleskacheva MG, Wolfer DP, Kupriyanova IF, Nikolenko DL, Scheffrahn H, Dell'Omo G, Lipp HP (2000) Hippocampal mossy fibers and swimming navigation learning in two vole species occupying different habitats. *Hippocampus* 10: 17-30.
- Poltorak M, Wright R, Hemperly JJ, Torrey EF, Issa F, Wyatt RJ, Freed WJ (1997) Monozygotic twins discordant for schizophrenia are discordant for N-CAM and L1 in CSF. *Brain Res* 751: 152-154.

- Pradel G, Schachner M, Schmidt R (1999) Inhibition of memory consolidation by antibodies against cell adhesion molecules after active avoidance conditioning in zebrafish. *J Neurobiol* 39: 197-206.
- Pradel G, Schmidt R, Schachner M (2000) Involvement of L1.1 in memory consolidation after active avoidance conditioning in zebrafish. *J Neurobiol* 43: 389-403.
- Radulovic J, Kammermeier J, Spiess J (1998) Relationship between Fos production and classical fear conditioning: effects of novelty, latent inhibition, and unconditioned stimulus preexposure. *J Neurosci* 18: 7452-7461.
- Royal SJ, Gambello MJ, Wynshaw-Boris A, Key B, Clarris HJ (2002) Laminar disorganisation of mitral cells in the olfactory bulb does not affect topographic targeting of primary olfactory axons. *Brain Res* 932: 1-9.
- Royet JP, Sicard G, Souchier C, Jourdan F (1987) Specificity of spatial patterns of glomerular activation in the mouse olfactory bulb: computer-assisted image analysis of 2-deoxyglucose autoradiograms. *Brain Res* 417: 1-11.
- Sakurai K, Migita O, Toru M, Arinami T (2002) An association between a missense polymorphism in the close homologue of L1 (CHL1, CALL) gene and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 7: 412-415.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning - a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 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: 1-5.
- Schmidt JT, Schachner M (1998) Role for cell adhesion and glycosyl (HNK-1 and oligomannoside) recognition in the sharpening of the regenerating retinotectal projection in goldfish. *J Neurobiol* 37: 659-671.
- Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M (1996) Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87: 1001-1014.
- Sharp FR, Sagar SM, Swanson RA (1993) Metabolic mapping with cellular resolution: c-fos vs. 2-deoxyglucose. *Crit Rev Neurobiol* 7: 205-228.
- Slotnik BM, Panhuber H, Bell GA, Laing DG (1989) Odor-induced metabolic activity in the olfactory bulb of rats trained to detect propionic acid vapor. *Brain Res* 500: 161-168.
- Snyder JS, Kee N, Wojtowicz JM (2001) Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *J Neurophysiol* 85: 2423-2431.
- Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M (1977) The [<sup>14</sup>C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* 28: 897-916.

- Sperry RW (1963) Recovery of sight after transplantation of eyes and regeneration of retina and optic nerve. In: Proceedings of the International Congress on Technology and Blindness, pp 87-97.
- Staiger JF, Masannek C, Bisler S, Schleicher A, Zuschratter W, Zilles K (2002) Excitatory and inhibitory neurons express c-Fos in barrel-related columns after exploration of a novel environment. *Neuroscience* 109: 687-699.
- Steward O, Worley PF (2001) A cellular mechanism for targeting newly synthesized mRNAs to synaptic sites on dendrites. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7062-7068.
- Stork O, Welzl H (1999) Memory formation and the regulation of gene expression. *Cell Mol Life Sci* 55: 575-592.
- Stork O, Welzl H, Wolfer D, Schuster T, Mantei N, Stork S, Hoyer D, Lipp H-P, Obata K, Schachner M (2000) Recovery of emotional behaviour in neural cell adhesion molecule (NCAM) null mutant mice through transgenic expression of NCAM180. *Eur J Neurosci* 12: 3291-3360.
- Strange BA, Dolan RJ (2001) Adaptive anterior hippocampal responses to oddball stimuli. *Hippocampus* 11: 690-698.
- Sutherland RJ, McDonald RJ (1990) Hippocampus, amygdala, and memory deficits in rats. *Behav Brain Res* 37: 57-79.
- Tenne-Brown J, Key B (1999) Errors in lamina growth of primary olfactory axons in rat and mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol* 410: 20-30.
- Tischmeyer W, Grimm R (1999) Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell Mol Life Sci* 55: 564-574.
- Tsien JZ (1999) Brain region-specific and temporally restricted gene knockout using the Cre recombinase system. In: *Handbook of Molecular-Genetic Techniques for Brain and Behavior Research* (Crusio WE, Gerlai RT, eds), pp 281-304: Elsevier Science BV.
- Tsien JZ, Chen DF, Gerber D, Tom C, Mercer EH, Anderson DJ, Mayford M, Kandel ER, Tonegawa S (1996) Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell* 87: 1317-1326.
- Tulving E, Markowitsch HJ, Kapur S, Habib R, Houle S (1994) Novelty encoding networks in the human brain: positron emission tomography data. *Neuroreport* 5: 2525-2528.
- Turgeon SM, Reichstein DA (2002) Decreased striatal c-Fos accompanies latent inhibition in a conditioned taste aversion paradigm. *Brain Res* 924: 120-123.
- Valverde F (1999) Building an olfactory glomerulus. *J Comp Neurol* 415: 419-422.
- van der Staay FJ, Steckler T (2001) Behavioural phenotyping of mouse mutants. *Behav Brain Res* 125: 3-12.

- Vinogradova OS (2001) Hippocampus as comparator: role of the two input and two output systems of the hippocampus in selection and registration of information. *Hippocampus* 11: 578-598.
- Wei M-H, Karavanova I, Ivanov SV, Popescu NC, Keck CL, Paek S, Eisen JA, Lerman MI (1998) In silico-initiated cloning and molecular characterization of a novel human member of the L1 gene family of neural cell adhesion molecules. *Hum Genet* 103: 355-364.
- White LE, Price JL (1993) The functional anatomy of limbic status epilepticus in the rat. - I. Patterns of  $^{14}\text{C}$ -2-deoxyglucose uptake and Fos immunocytochemistry. *J Neurosci* 13: 4787-4809.
- Yokoyama C, Sasaki K (1999) Regional expression of Fos-like immunoreactivity in rat cerebral cortex after stress; restraint and intraperitoneal lipopolysaccharide. *Brain Res* 816: 267-275.
- Yonemori M, Nishijo H, Uwano T, Tamura R, Furuta I, Kawasaki M, Takashima Y, Ono T (2000) Orbital cortex neuronal responses during an odor-based conditioned associative task in rats. *Neuroscience* 95: 691-703.
- Zeng H, Chattarji S, Barbarosie M, Rondi-Reig L, Philpot BD, Miyakawa T, Bear MF, Tonegawa S (2001) Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. *Cell* 107: 617-629.
- Zhang Y, Roslan R, Lang D, Schachner M, Lieberman AR, Anderson PN (2000) Expression of CHL1 and L1 by neurons and glia following sciatic nerve and dorsal root injury. *Mol Cell Neurosci* 16: 71-86.

## 7 ANHANG

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

2DG	2-Deoxy-D-[1- <sup>14</sup> C]-Glukose
%	Prozent
°C	Grad Celsius
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
ANOVA	Varianzanalyse
AP	alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
CHCl <sub>2</sub>	Chloroform
CHL1	<i>Close homolog of L1</i>
CHL1-/-	homozygot CHL1-defiziente Tiere
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
CS	konditionierter Stimulus
DAB	Diaminobenzidin
dB	Dezibel
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
<i>et al.</i>	et alii
g	Gramm, Erdbeschleunigung
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
Hg	Quecksilber
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horse raddish peroxidase</i> )
IEG	<i>Immediate-Early Gen</i>
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
K	Kalium
kDa	Kilo-Dalton
LB	Lauria Bertani
M	molar
mA	Milliampere
MBM	modifiziertes Blockierungs-Medium
mg	Milligramm
min	Minute

---

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NBT	4-Nitroblue Tetrazoliumchlorid
nm	nanometer
OB	olfaktorischer Bulbus
P	Phosphor
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
POD	Meerrettichperoxidase
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROD	relative optische Dichte
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Sodium-Citrat-Puffer ( <i>Standard Saline Citrat</i> )
SSPE	Sodium-Phosphat-EDTA-Puffer
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	thermostabile DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TC	Schwanzbiopsie ( <i>tailcut</i> )
TNB	Tris-Natriumchlorid-Blockierungslösung
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
US	unkonditionierter Stimulus
V	Volt
WB	Western-Blot
z.B.	zum Beispiel

## 7.2 Gruppen-Mittelwerte der 2DG-Anreicherung in relativer optischer Dichte (ROD) mit Standardfehler für die *Taste-Novelty*

### Amygdala

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	4,5 h
Wasser/Wasser	WT	0,973 ± 0,031	1,066 ± 0,041
	CHL1-/-	1,167 ± 0,047	1,107 ± 0,066
Wasser/Saccharin	WT	1,021 ± 0,043	1,026 ± 0,022
	CHL1-/-	1,135 ± 0,024	1,02 ± 0,027
Saccharin/Saccharin	WT	1,14 ± 0,056	1,035 ± 0,009
	CHL1-/-	1,068 ± 0,037	1,028 ± 0,028

### anteriöer cingulärer Kortex

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	4,5 h
Wasser/Wasser	WT	1,633 ± 0,098	1,405 ± 0,06
	CHL1-/-	1,352 ± 0,04	1,532 ± 0,116
Wasser/Saccharin	WT	1,535 ± 0,059	1,694 ± 0,056
	CHL1-/-	1,616 ± 0,072	1,498 ± 0,046
Saccharin/Saccharin	WT	1,608 ± 0,07	1,571 ± 0,042
	CHL1-/-	1,679 ± 0,021	1,32 ± 0,137

### posteriöer cingulärer Kortex

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	4,5 h
Wasser/Wasser	WT	1,654 ± 0,071	1,545 ± 0,096
	CHL1-/-	1,56 ± 0,155	1,72 ± 0,091
Wasser/Saccharin	WT	1,747 ± 0,085	1,687 ± 0,113
	CHL1-/-	1,805 ± 0,07	1,555 ± 0,02
Saccharin/Saccharin	WT	1,856 ± 0,142	1,657 ± 0,107
	CHL1-/-	1,687 ± 0,047	1,588 ± 0,031

### Gyrus Dentatus

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	4,5 h
Wasser/Wasser	WT	1,181 ± 0,01	1,176 ± 0,057
	CHL1-/-	1,285 ± 0,097	1,231 ± 0,057
Wasser/Saccharin	WT	1,266 ± 0,061	1,294 ± 0,047
	CHL1-/-	1,275 ± 0,073	1,171 ± 0,049
Saccharin/Saccharin	WT	1,337 ± 0,07	1,258 ± 0,058
	CHL1-/-	1,273 ± 0,045	1,17 ± 0,038

### insularer Kortex

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	4,5 h
Wasser/Wasser	WT	1,418 ± 0,068	1,388 ± 0,069
	CHL1-/-	1,331 ± 0,051	1,334 ± 0,097
Wasser/Saccharin	WT	1,41 ± 0,036	1,488 ± 0,053
	CHL1-/-	1,549 ± 0,095	1,358 ± 0,044
Saccharin/Saccharin	WT	1,491 ± 0,06	1,38 ± 0,067
	CHL1-/-	1,529 ± 0,088	1,253 ± 0,098

### piriformer Kortex

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	4,5 h
Wasser/Wasser	WT	1,36 ± 0,068	1,29 ± 0,066
	CHL1-/-	1,365 ± 0,102	1,401 ± 0,08
Wasser/Saccharin	WT	1,385 ± 0,041	1,384 ± 0,046
	CHL1-/-	1,5 ± 0,096	1,264 ± 0,03
Saccharin/Saccharin	WT	1,47 ± 0,102	1,541 ± 0,13
	CHL1-/-	1,357 ± 0,037	1,285 ± 0,047

**parietaler Kortex Schichten I-III**

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	4,5 h
Wasser/Wasser	WT	1,614 ± 0,043	1,56 ± 0,11
	CHL1-/-	1,553 ± 0,179	1,708 ± 0,105
Wasser/Saccharin	WT	1,708 ± 0,115	1,641 ± 0,048
	CHL1-/-	1,803 ± 0,053	1,513 ± 0,054
Saccharin/Saccharin	WT	1,723 ± 0,118	1,67 ± 0,082
	CHL1-/-	1,704 ± 0,06	1,666 ± 0,065

**parietaler Kortex Schichten IV-VI**

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	4,5 h
Wasser/Wasser	WT	1,502 ± 0,032	1,412 ± 0,08
	CHL1-/-	1,491 ± 0,171	1,581 ± 0,104
Wasser/Saccharin	WT	1,566 ± 0,107	1,49 ± 0,05
	CHL1-/-	1,705 ± 0,038	1,437 ± 0,046
Saccharin/Saccharin	WT	1,628 ± 0,083	1,579 ± 0,049
	CHL1-/-	1,596 ± 0,017	1,521 ± 0,049

### 7.3 Gruppen-Mittelwerte der *c-fos*-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> mit Standardfehler für die *Taste-Novelty*

**Amygdala**

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	1,0 h	4,5 h	6 h
Wasser/Wasser	WT	50,942 ± 7,772	38,822 ± 4,072	30,155 ± 4,453	18,687 ± 1,766
	CHL1-/-	66,978 ± 10,433	50,376 ± 1,578	46,45 ± 7,271	50,495 ± 15,713
Wasser/Saccharin	WT	109,57 ± 22,101	62,453 ± 9,739	34,3 ± 4,993	28,765 ± 5,799
	CHL1-/-	189,206 ± 33,311	72,487 ± 3,512	45,022 ± 7,872	35,326 ± 4,874
Saccharin/Saccharin	WT	55,452 ± 7,735	50,338 ± 1,964	32,26 ± 2,445	33,663 ± 11,126
	CHL1-/-	102,118 ± 19,719	55,578 ± 12,807	89,85 ± 19,115	24,74 ± 4,461

**anteriöer cingulärer Kortex**

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	1,0 h	4,5 h	6 h
Wasser/Wasser	WT	56,545 ± 14,866	55,862 ± 9,887	33,237 ± 3,145	17,037 ± 3,248
	CHL1-/-	98,1 ± 12,961	91,984 ± 8,804	72,566 ± 16,466	54,8 ± 5,779
Wasser/Saccharin	WT	161,42 ± 35,063	97,918 ± 18,28	44,998 ± 8,857	29,558 ± 6,033
	CHL1-/-	214,414 ± 32,439	114,733 ± 33,449	52,56 ± 8,362	47,596 ± 9,308
Saccharin/Saccharin	WT	94,342 ± 14,784	74,504 ± 11,002	58,573 ± 11,244	28,707 ± 12,202
	CHL1-/-	177,666 ± 25,479	97,816 ± 14,991	74,575 ± 21,8	40,925 ± 5,552

**posteriöer cingulärer Kortex**

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	1,0 h	4,5 h	6 h
Wasser/Wasser	WT	63,902 ± 18,226	80,614 ± 11,61	47,555 ± 14,551	27,777 ± 3,197
	CHL1-/-	118,737 ± 10,983	104,67 ± 17,456	103,316 ± 14,066	84,84 ± 13,607
Wasser/Saccharin	WT	232,112 ± 53,038	127,388 ± 9,266	63,986 ± 11,833	58,972 ± 15,295
	CHL1-/-	279,292 ± 29,915	165,07 ± 11,173	84,983 ± 13,339	53,638 ± 5,564
Saccharin/Saccharin	WT	135,256 ± 21,854	80,69 ± 9,382	73,762 ± 12,538	33,94 ± 5,722
	CHL1-/-	234,934 ± 32,201	117,282 ± 4,81	159,25 ± 61,382	49,593 ± 8,62

**Gyrus Dentatus**

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	1,0 h	4,5 h	6 h
Wasser/Wasser	WT	34,133 ± 2,02	34,152 ± 10,966	45,163 ± 6,197	41,4 ± 3,839
	CHL1-/-	34,847 ± 11,92	29,292 ± 7,023	37,134 ± 7,132	38,56 ± 5,765
Wasser/Saccharin	WT	40,874 ± 10,339	43,496 ± 9,478	33,832 ± 11,608	27,516 ± 5,345
	CHL1-/-	25,08 ± 8,922	25,627 ± 6,464	33,408 ± 10,431	40,376 ± 4,692
Saccharin/Saccharin	WT	48,094 ± 12,882	33,66 ± 10,362	37,825 ± 9,326	54,85 ± 22,445
	CHL1-/-	25,072 ± 7,644	20,81 ± 9,54	50,79 ± 13,496	61,045 ± 24,283

**insularer Kortex**

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	1,0 h	4,5 h	6 h
Wasser/Wasser	WT	53,462 ± 16,75	70,656 ± 11,159	33,112 ± 6,684	23,573 ± 3,885
	CHL1-/-	98,853 ± 13,448	96,59 ± 13,56	67,416 ± 16,897	47,907 ± 11,732
Wasser/Saccharin	WT	189,064 ± 39,955	90,602 ± 16,96	49,518 ± 6,096	36,942 ± 9,116
	CHL1-/-	265,248 ± 44,598	122,153 ± 39,261	49,098 ± 11,615	38,71 ± 2,348
Saccharin/Saccharin	WT	103,898 ± 15,504	76,414 ± 6,972	51,667 ± 12,97	24,707 ± 10,712
	CHL1-/-	158,01 ± 25,291	90,334 ± 21,497	58,557 ± 10,778	36,26 ± 13,301

**piriformer Kortex**

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	1,0 h	4,5 h	6 h
Wasser/Wasser	WT	96,502 ± 4,878	96,118 ± 11,404	53,117 ± 10,23	46,417 ± 2,281
	CHL1-/-	120,68 ± 12,202	120,99 ± 11,616	105,116 ± 12,122	82,7 ± 22,966
Wasser/Saccharin	WT	175,428 ± 38,995	144,32 ± 27,985	49,318 ± 4,492	32,814 ± 10,959
	CHL1-/-	174,228 ± 16,655	137,333 ± 22,218	63,542 ± 19,34	61,194 ± 12,934
Saccharin/Saccharin	WT	113,564 ± 14,853	106,342 ± 8,494	65,447 ± 8,444	55,033 ± 9,029
	CHL1-/-	141,5 ± 13,622	135,332 ± 28,316	107,688 ± 23,053	75,812 ± 11,146

**parietaler Kortex Schichten I-III**

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	1,0 h	4,5 h	6 h
Wasser/Wasser	WT	57,207 ± 10,776	69,762 ± 9,681	40,307 ± 9,76	27,867 ± 6,511
	CHL1-/-	101,517 ± 10,807	76,336 ± 9,818	93,876 ± 15,451	78,185 ± 28,13
Wasser/Saccharin	WT	190,952 ± 39,788	110,264 ± 24,421	52,02 ± 11,831	43,054 ± 11,312
	CHL1-/-	232,544 ± 44,089	114,6 ± 9,286	42,652 ± 11,225	38,414 ± 4,688
Saccharin/Saccharin	WT	92,964 ± 18,601	67,406 ± 10,512	56,09 ± 10,514	35,387 ± 9,761
	CHL1-/-	138,252 ± 25,444	85,764 ± 14,503	135,275 ± 50,976	33,498 ± 6,279

**parietaler Kortex Schichten IV-VI**

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	1,0 h	4,5 h	6 h
Wasser/Wasser	WT	70,18 ± 11,169	69,74 ± 5,748	43,345 ± 5,752	29,983 ± 3,616
	CHL1-/-	124,927 ± 1,214	102,534 ± 16,351	100,992 ± 13,427	71,17 ± 22,343
Wasser/Saccharin	WT	208,598 ± 37,951	135,816 ± 20,8	70,316 ± 11,095	52,89 ± 6,476
	CHL1-/-	296,648 ± 57,384	154,14 ± 19,612	77,77 ± 20,698	51,598 ± 2,921
Saccharin/Saccharin	WT	119,064 ± 20,108	74,56 ± 8,246	59,425 ± 10,868	42,787 ± 12,402
	CHL1-/-	178,918 ± 13,948	130,822 ± 18,714	158,38 ± 37,659	60,13 ± 18,778

#### 7.4 Gruppen-Mittelwerte der *arg3.1/arc*-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> mit Standardfehler für die *Taste-Novelty*

**Amygdala**

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	1,0 h	4,5 h	6 h
Wasser/Wasser	WT	60,09 ± 7,401	60,036 ± 13,16	64,092 ± 21,644	71,727 ± 9,566
	CHL1-/-	47,995 ± 4,203	46,158 ± 7,712	46,32 ± 5,257	44,26 ± 5,28
Wasser/Saccharin	WT	214,246 ± 30,666	106,758 ± 23,753	148,086 ± 26,696	55,186 ± 8,871
	CHL1-/-	125,268 ± 14,541	70,15 ± 6,089	124,036 ± 19,88	50,732 ± 5,205
Saccharin/Saccharin	WT	71,026 ± 12,041	75,804 ± 14,151	75,743 ± 8,567	74,113 ± 9,259
	CHL1-/-	138,982 ± 14,544	81,014 ± 5,781	97,623 ± 9,593	48,457 ± 4,53

**anteriöer cingulärer Kortex**

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	1,0 h	4,5 h	6 h
Wasser/Wasser	WT	150,715 ± 39,311	134,892 ± 30,936	91,59 ± 25,777	124,83 ± 10,605
	CHL1-/-	144,752 ± 13,697	138,17 ± 20,447	108,364 ± 9,332	123,045 ± 16,249
Wasser/Saccharin	WT	361,394 ± 63,416	141,878 ± 18,62	269,384 ± 39,184	87,128 ± 14,776
	CHL1-/-	292,096 ± 21,483	151,67 ± 11,133	240,1 ± 35,493	129,808 ± 13,987
Saccharin/Saccharin	WT	197,942 ± 38,308	178,68 ± 38,048	147,97 ± 11,601	100,393 ± 17,718
	CHL1-/-	268,646 ± 30,284	168,336 ± 17,967	170,13 ± 22,137	128,115 ± 12,502

**posteriorer cingulärer Kortex**

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	1,0 h	4,5 h	6 h
Wasser/Wasser	WT	194,498 ± 22,092	155,734 ± 30,477	132,636 ± 42,881	132,997 ± 5,375
	CHL1-/-	171,332 ± 28,205	110,656 ± 18,204	118,16 ± 18,728	113,94 ± 20,904
Wasser/Saccharin	WT	355,008 ± 66,208	187,546 ± 29,126	337,002 ± 44,893	114,188 ± 20,191
	CHL1-/-	306,31 ± 42,838	175,91 ± 19,187	366,435 ± 44,615	133,362 ± 11,869
Saccharin/Saccharin	WT	228,15 ± 41,935	191,558 ± 34,454	192,288 ± 36,859	117,44 ± 37,458
	CHL1-/-	319,906 ± 45,256	185,398 ± 11,027	220,962 ± 22,658	97,57 ± 12,326

**Gyrus Dentatus**

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	1,0 h	4,5 h	6 h
Wasser/Wasser	WT	60,22 ± 8,253	59,504 ± 7,586	61,53 ± 9,32	88,083 ± 44,809
	CHL1-/-	67,618 ± 7,397	59,848 ± 12,601	56,602 ± 15,127	66,907 ± 9,815
Wasser/Saccharin	WT	88,022 ± 5,424	84,21 ± 12,429	98,92 ± 9,453	46,162 ± 9,48
	CHL1-/-	49,754 ± 7,625	89,293 ± 9,566	77,484 ± 13,629	52,744 ± 4,538
Saccharin/Saccharin	WT	89,4 ± 23,795	72,258 ± 13,153	63,357 ± 16,405	43,04 ± 2,476
	CHL1-/-	44,984 ± 7,222	59,066 ± 12,332	74,62 ± 12,667	61,72 ± 9,024

**insularer Kortex**

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	1,0 h	4,5 h	6 h
Wasser/Wasser	WT	125,025 ± 8,229	97,588 ± 7,941	72,54 ± 24,508	87,37 ± 9,982
	CHL1-/-	84,18 ± 7,118	80,004 ± 7,625	66,854 ± 3,414	62,85 ± 11,035
Wasser/Saccharin	WT	259,722 ± 47,491	137,06 ± 18,276	238,5 ± 34,872	91,594 ± 11,131
	CHL1-/-	251,364 ± 44,208	146,04 ± 24,986	208,142 ± 34,485	88,014 ± 2,962
Saccharin/Saccharin	WT	120,898 ± 18,976	136,43 ± 33,211	109,67 ± 18,581	80,543 ± 14,176
	CHL1-/-	204,32 ± 21,319	135,004 ± 13,53	150,373 ± 22,732	94,737 ± 26,562

**piriformer Kortex**

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	1,0 h	4,5 h	6 h
Wasser/Wasser	WT	100,415 ± 13,074	67,67 ± 12,939	72,308 ± 23,538	59,723 ± 3,521
	CHL1-/-	71,905 ± 21,56	36,095 ± 6,201	69,392 ± 9,285	55,6 ± 8,798
Wasser/Saccharin	WT	163,878 ± 22,633	90,476 ± 10,961	132,872 ± 41,675	54,816 ± 16,556
	CHL1-/-	96,046 ± 16,5	60,497 ± 10,476	75,752 ± 13,984	39,106 ± 7,816
Saccharin/Saccharin	WT	91,166 ± 13,233	105,618 ± 14,753	91,46 ± 11,53	64,853 ± 29,413
	CHL1-/-	76,456 ± 14,869	50,05 ± 10,562	54,007 ± 8,746	39,585 ± 6,198

**parietaler Kortex Schichten I-III**

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	1,0 h	4,5 h	6 h
Wasser/Wasser	WT	168,898 ± 28,102	139,988 ± 14,91	82,924 ± 30,943	118,997 ± 3,046
	CHL1-/-	137,317 ± 16,077	118,062 ± 15,229	92,552 ± 7,114	98,14 ± 6,879
Wasser/Saccharin	WT	321,586 ± 57,426	177,43 ± 29,736	242,838 ± 30,008	96,552 ± 19,439
	CHL1-/-	289,306 ± 37,906	180,25 ± 35,283	234,302 ± 28,14	107,136 ± 6,694
Saccharin/Saccharin	WT	234,144 ± 55,667	180,294 ± 38,311	129,955 ± 10,027	81,74 ± 13,531
	CHL1-/-	293,224 ± 28,783	213,342 ± 29,026	162,803 ± 21,337	100,165 ± 14,035

**parietaler Kortex Schichten IV-VI**

Trinklösung	Genotyp	0,5 h	1,0 h	4,5 h	6 h
Wasser/Wasser	WT	251,473 ± 35,697	163,264 ± 28,656	133,496 ± 38,944	196,79 ± 22,529
	CHL1-/-	228,715 ± 24,974	186,84 ± 26,712	157,912 ± 17,884	155,318 ± 17,818
Wasser/Saccharin	WT	439,166 ± 44,354	248,936 ± 24,308	332,174 ± 34,867	122,102 ± 13,354
	CHL1-/-	341,416 ± 51,231	261,663 ± 36,633	326,786 ± 36,319	144,566 ± 19,937
Saccharin/Saccharin	WT	318,328 ± 54,939	240,174 ± 38,09	187,962 ± 20,587	135,683 ± 41,067
	CHL1-/-	448,958 ± 35,724	303,396 ± 19,64	241,468 ± 31,332	176,023 ± 4,665

## Lebenslauf

### **persönliche Daten**

<b>Name</b>	Andrea Ulrike Hamm-Baarke, geb. Baarke
<b>Geburtstag</b>	27. Januar 1974
<b>Geburtsort</b>	Berlin
<b>Staatsangehörigkeit</b>	deutsch

### **Bildungsweg**

<b>September 1980 – Juni 1992</b>	Polytechnische Oberschule und Gymnasium in Berlin
<b>Juni 1992</b>	Abitur
<b>Oktober 1992 – November 1997</b>	Studium der Biologie an der Humboldt-Universität zu Berlin
<b>November 1996 – November 1997</b>	Diplomarbeit in der Projektgruppe Naturschutz am Institut für Zoologie der Humboldt-Universität zu Berlin
<b>Januar 1999 – Dezember 2002</b>	Anfertigung der Doktorarbeit in der Forschergruppe Neurogenetik am Leibniz-Institut für Neurobiologie Magdeburg
<b>seit Mai 2003</b>	wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Immunologie an der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

Magdeburg, den 11.12.2003

.....  
Andrea Hamm-Baarke

## Verzeichnis der bisherigen wissenschaftlichen Publikationen:

### Publikationen:

M. MONTAG-SALLAZ, A. BAARKE & D. MONTAG (2003): Aberrant neuronal connectivity in CHL1-deficient mice is associated with altered information processing-related immediate early gene expression, J. Neurobiol. 57, 67-80.

### Posterbeiträge:

BAARKE A., MONTAG-SALLAZ M. & D. MONTAG (2000): Different *c-fos* expression in the brain of mice deficient for the close homologue of L1 (CHL1) after gustatory stimulation, - Forum of European Neuroscience in Brighton, Eur. J. Neurosci. 12, Supplement 11, 335.

BAARKE A., MONTAG-SALLAZ M. & D. MONTAG (2000): Different *c-fos* expression in the brain of mice deficient for the close homologue of L1 (CHL1) after gustatory stimulation, - Xth Magdeburg International Neurobiological Symposium: Mechanisms of Learning and Memory

BAARKE A. & B. MENSCH, (1998): Kleinsäugermigrationen in der Agrarlandschaft – wann wohin? - 16. Ethologentreffen in Halle

MENSCH B., SCHNEIDER R. & A. BAARKE (1997): Kleinsäuger auf Nahrungssuche - Einfluß von Randstruktur und Landnutzung. - Verh. Dtsch. Zool. Ges., 90. Jahresversamml. G. Fischer Stuttgart, New York, 369.

Magdeburg, den 11. Dezember 2003

.....  
Andrea Hamm-Baarke