

Einfluss der kortikalen Extrazellulären Matrix auf kortexabhängige Lernleistungen in adulten Nagetieren

Systemphysiologie des Lernens, Leibniz-Institut für Neurobiologie

CortXplorer

Autor:

Dipl.-Biochem. Hartmut Niekisch

Betreuer:

Prof. Dr. Frank W. Ohl

Dr. Max F. K. Happel
Dr. Renato Frischknecht

Einfluss der kortikalen Extrazellulären Matrix auf kortexabhängige Lernleistungen in adulten Nagetieren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

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

von: Dipl.-Biochem. Hartmut Niekisch

geb. am 27. Juni 1977 in: Berlin

Gutachter: Prof. Dr. Frank W. Ohl
Prof. Dr. Andreas Faissner

eingereicht am: 15. Juni 2017

verteidigt am: 08. März 2018

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Dipl.-Biochem. Hartmut Niekisch, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel

**Einfluss der kortikalen Extrazellulären Matrix auf kortexabhängige
Lernleistungen in adulten Nagetieren**

selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Das Zitieren aus bestehenden Werken ist entsprechend gekennzeichnet und die jeweilige Quelle angegeben.

Magdeburg, den 15. Juni 2017

Unterschrift:

Hartmut Niekisch

Zusammenfassung

Einfluss der kortikalen Extrazellulären Matrix auf kortexabhängige Lernleistungen in adulten Nagetieren

von Dipl.-Biochem. Hartmut Niekisch

Systemphysiologie des Lernens, Leibniz-Institut für Neurobiologie

CortXplorer

Stichwörter: Extrazelluläre Matrix, Hyaluronidase, Brevican, Tenascin, WFA-Färbung, semiquantitativer Western Blot, Shuttlebox, FM-Diskrimination, adultes kortexabhängiges Lernen

Die hyaluronanbasierte Extrazelluläre Matrix (ECM), mit ihren vielfältigen molekularen Komponenten, ist für die Funktionen des Gehirns wichtig. Sie bildet ein dreidimensionales Maschenwerk um die Zellen des Gehirns herum. Moleküle, wie Brevican und Tenascin, spielen dabei aktivitätsabhängig im Bereich synaptischer Plastizität und morphologischer Veränderungen von Neuronen eine wichtige Rolle. Die ECM dient somit der Aufrechterhaltung und Modulation von Hirnstrukturen, aber auch dem ionalen homöostatischen Gleichgewicht. Sie ist beteiligt an der Ausprägung und Stabilisierung topografischer Karten in sensorischen Arealen des Kortex, sowie subkortikaler Schaltkreise während der Ontogenese. Jedoch sind die Befunde zur Rolle der ECM im adulten Gehirn in der Literatur bisweilen widersprüchlich. Inwieweit die ECM an kortexabhängigem Lernen beteiligt ist, ist bisher weitestgehend unklar.

Mit den Arbeiten zu dieser Dissertation wurden erstmalig Einflüsse der ECM auf kortexabhängiges Lernen adulter Tiere in verschiedenen Betrachtungsebenen in Zusammenhang gebracht. Dazu wurden in dieser Arbeit Verhaltensversuche in der Shuttlebox an verschiedenen Nagerspezies durchgeführt und kombiniert mit der Degradation der ECM im auditorischen Kortex (ACx), proteinbiochemischen Untersuchungen mittels semiquantitativem Western Blot sowie immunhistochemischer Quantifizierungen der ECM im Hirnschnitt.

Im ersten Schritt konnte in der vorliegenden Arbeit an Mongolischen Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*; Gerbil) gezeigt werden, dass die ECM im ACx keinen Einfluss auf das Erlernen einer kortexabhängigen Diskrimination von spektrotemporal komplexen Reizen (Frequenzmodulationen) hat. Sollten hingegen nach Erlernen der Reize die Kontingenzen umgelernt werden (reversal learning), so zeigte sich, dass die enzymatische Reduktion der ECM in der Hörrinde den kognitiv anspruchsvollen Umlernprozess signifikant verbessern konnte.

Der zweite Teil der Arbeit untersuchte den intrinsischen Einfluss der ECM auf das initiale Erlernen und langzeitliche Abrufen dieses Paradigmas in Mäusen (*Mus musculus*) mittels semiquantitativem Western Blot von Brevican und Tenascin-R. Beide Moleküle sind bekannt dafür, in plastische Prozesse auf synaptischer Ebene involviert zu sein. Sie dienen damit beispielhaft als Marker für die aktive Rolle der ECM während der unterschiedlichen Lernphasen. Im Ergebnis konnten Brevican und tendenziell auch Tenascin-R, als wichtige Bausteine für die langzeitliche Fixierung von Erlernem ausgemacht werden. So zeigten erfolgreich lernende und nicht lernende Tiere am Ende der initialen Lernphase unterschiedliche ECM-Zusammensetzungen im ACx.

Im dritten Teil der Arbeit wurde der langzeitliche Einfluss der ECM-Degradation untersucht. Hierzu wurden Mäuse initial, unter ECM-Degradation bilateral im ACx, sowie im Abruf des Erlernten nach einer Pause von 4 Wochen trainiert. Im Ergebnis konnten schlecht initial lernende, ECM-degradierte Tiere, langfristig trotzdem die Diskrimination gleich gut erlernen wie initial gut lernende Tiere der Enzym-injizierten und 0,9 % NaCl-injizierten Gruppen.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, ein differenziertes und kohärentes Bild des Einflusses der kortikalen ECM und ihrer Rolle beim adulten Lernen. Die Befunde der Arbeit weisen auf einen Zustand grundsätzlicher Flexibilität und Dynamik der ECM hin, welche lernabhängig verstärkt wird. Mit dem erfolgreichen Erlernen einer Aufgabe geht die ECM dann vorübergehend in einen rigiden Zustand über, um das Erlernte auch langfristig zu stabilisieren. Tiere, die nicht erfolgreich diskriminieren lernen, verbleiben biochemisch im flexiblen Anfangsstadium des Lernens. Während des Langzeitabrufes geht die ECM erneut in ein flexibleres Stadium über und ermöglicht den initial erfolgreichen Tieren eine leichte Verbesserung im Verhaltensabruf.

Die Ergebnisse dieser Arbeit implizieren mögliche neuartige Therapieansätze im Bereich z. B. der Sucht- und Demenzerkrankungen. Diese könnten auf gezielter örtlich begrenzter Degradation der ECM, kombiniert mit Trainings oder Psychotherapien beruhen. Triggermoleküle zu identifizieren, die die lernnotwendigen zellulären und extrazellulären biochemischen Kaskaden der ECM-Modulation steuern, wie z. B. der Lernmodulator Dopamin, ist ein weiterer wichtiger Forschungsbereich für die Zukunft.

Abstract

Influence of the cortical Extracellular Matrix on cortex-dependent learning performance in adult rodents

from Dipl.-Biochem. Hartmut Niekisch

Systems Physiology of Learning, Leibniz Institute for Neurobiology

CortXplorer

Keywords: Extracellular Matrix, hyaluronidase, brevican, tenascin, WFA-staining, semi-quantitative western blot, shuttle-box, FM-discrimination, adult cortex-dependent learning

The hyaluronan based Extracellular Matrix (ECM) with its diverse molecular components is important for the function of the brain. The ECM constitutes a three dimensional meshwork around the cells of the brain. Molecules like brevican and tenascins play an important role in synaptic plasticity and morphologic adaptations of neurons. So the ECM serves for the maintenance and modulation of brain structures, but also for the ionic homeostatic balance. During ontogenesis the ECM is involved in shaping and maintenance of topographical maps in sensory areas of the cortex, and also subcortical circuits. However, the findings in the literature concerning the role of the ECM in the adult brain are occasionally contradictory. The impact of the ECM on cortex-dependent forms of learning-related plasticity is yet unknown.

To address the influences of the ECM on cortex-dependent learning in adult animals, this dissertation correlates results from different observation levels. For that reason animal trainings in a shuttle-box were performed with different adult rodent species, including ECM-degeneration in the auditory cortex (ACx), biochemical investigation using semi-quantitative western blotting, and immunohistochemical quantification of the ECM in brain slices.

In a first step, using Mongolian Gerbils (*Meriones unguiculatus*), it could be shown, that the ECM does not influence cortex-dependent discrimination learning of spectro-temporal (frequency modulated) tones. However, animals were supposed to re-learn the opposing contingencies of the two stimuli (reversal-learning), it was shown that this cognitive demanding process was only significantly enhanced, if the ECM in the ACx was enzymatically reduced.

The second part of this work investigated the intrinsic influence of the ECM on the initial learning and long-term retrieval of this paradigm in mice (*mus musculus*) using semi-quantitative western blotting of brevican and tenascin-R. Both molecules are known to be involved in plasticity processes on a synaptic level, and were therefore exemplified as markers for the active role of the ECM in different learning phases. As result, brevican and also tenascin-R, could be identified as important components for long-term fixation of learned behavior. Importantly, at the end of the initial training phase, learning and non-learning animals showed different composition of the ECM in ACx.

The third part of this dissertation was focused on the long-term influence of ECM-degradation. Mice were trained initially, under conditions of bilateral degraded ECM in the ACx, and long-term retrieval of learned behavior after a break of around four weeks. As result initially bad learning ECM-degraded animals could discriminate the two stimuli in the long-term as good as initially good learning animals of the enzyme-injected and 0.9 % NaCl-injected groups.

Together the results of this dissertation show a differentiated and coherent picture of the influence of the cortical ECM and its role in adult learning. The findings of this work suggest a state of inherent flexibility of the ECM. During successfully learning a task, the ECM transiently shows a more and more rigid formation in order to long-lastingly stabilize corresponding newly acquired synaptic connections. Non-successfully discriminating animals remain in the biochemically flexible primary state. In the long-term retrieval the ECM shows again a more flexible state, and therefore enables initially learning animals to increase their task-performance further.

The results implicate possible novel therapy approaches in the scope of e.g. drug abuse and dementia disorders. This could result in target-specific ECM-degradation combined with trainings and/or psychotherapy. To identify trigger-molecules, that control the indispensable cellular and extracellular biochemical cascades of ECM-modulations for learning, such as the learning-modulator dopamine, is a key-scope for future science.

Danksagung

In diesem Teil möchte ich mich bei allen Personen bedanken, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht zu dem Ergebnis geführt hätte, wie es nun vorliegt.

Zuerst möchte ich Prof. Dr. Frank W. Ohl danken, der mir ermöglichte meine Dissertation in seiner Abteilung zu vollenden. Ein ganz besonderer Dank geht aber auch an die beiden „Jungs“, Dr. Max F. K. Happel und Dr. Renato Frischknecht, die das Projekt erst auf die Beine gestellt haben, in dem sie das „*Special Project*“ des LIN eingeworben haben. Jeder von euch hat mir großartig geholfen, in die Geheimnisse der Neurobiologie einzutauchen. Tiertrainings und deren Analyse auf der einen Seite und die knifflige Aufgabe der biochemischen Gewebeanalyse auf der anderen Seite, waren nicht so ganz einfach unter einen Hut zu bekommen.

Für die Trainings vieler Tiere in diesem Projekten bedanke ich mich bei Julia Berghäuser, Julia Steinhardt, Judith Weber, Jana Kasper, Erika Kaschinski, Sara Bertazzoni und Karla Knapstein. Großartig was ihr den Tieren, die an dieser Stelle auch erwähnt werden sollten, für Verhaltensleistungen entlockt habt. Den beiden Julias sei auch für ihre Mithilfe bei vielen der notwendigen OPs gedanken. Nicht zu vernachlässigen ist aber auch eure Hilfe bei der Lösung so mancher Hürde für die Matlab-Auswertungs-Tools. An dieser Stelle sei auch Dr. Marcus Jeschke gedankt, der in diesem Zusammenhang oft sehr gute „wichtige Sicherheitshinweise“ in Sachen Matlab für mich übrig hatte.

Für so einige Kniffe, Tricks und Anmerkungen, was den Western Blot angeht, möchte ich mich bei Jeet Singh und Jessica Mitlöhner bedanken. Die Ergebnisse meiner Blots sind dank eurer Erfahrung deutlich besser geworden. Nicht zu vergessen die ganzen Diskussionen über ECM-Proteine, Antikörper, Lösungen etc. und die „paar Kleinigkeiten“ die damit immer in Zusammenhang stehen.

Ein Dank sei auch den beteiligten Technischen Assistentinnen zuteil, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. An all die Zuarbeiten, wie die Herstellung von Hirnschnitten (Kathrin Ohl), Gelherstellung und der stetige Nachschub an Lösungen „*ready to use*“ (Kathrin Hartung) sei erinnert, es hat mir sehr geholfen.

Aber, was wären die Tiertrainings und Biochemie wert ohne den Zwischenschritt der Hirnpräparation. Ein Dank für das Einweihen in die Präparation der Gewebe der trainierten Tiere geht daher an Dr. Eike Budinger.

The „Coffee Team“, bestehend aus Marina Zempeltzi, Michael Brunk und allen anderen Kaffee trinkenden arbeitsgruppenangegliederten Personen um mich „Kaffeefee“ herum, sei auch für die erhellenden, meist aber erheiternden, lustigen oder auch einfach nur „dumm schwätzenden“ Momente gedankt. Was eine schöne

Pausengestaltung... danke euch allen, ihr seid mehr als nur Kollegen - Freunde finden sich eben überall.

Nicht unwichtiger ist der Dank an alle meine Freunde außerhalb des LIN... speziell Ani möchte ich für die entspannten Wochenenden und die wissenschafts-unabhängige Zeit danken.

Und zu guter Letzt, aber deshalb nicht weniger wichtig, gilt ein ganz besonderer Dank meinen Eltern, Regine und Uwe Niekisch, ohne eure Geduld und Unterstützung wäre ich so weit nie gekommen.

Inhaltsverzeichnis

Selbstständigkeitserklärung	5
Zusammenfassung	7
Abstract	9
Danksagung	11
Inhaltsverzeichnis	13
Abbildungsverzeichnis	17
Tabellenverzeichnis	19
Abkürzungsverzeichnis	21
1 Einleitung	23
1.1 Die Struktur der adulten ECM	24
1.2 Allgemeine Funktionen der ECM	24
1.3 Einfluss der ECM auf neuronale Plastizität auf molekularer Ebene	25
1.4 Der ECM-Einfluss auf erlerntes Verhalten im juvenilen und adulten Tier	27
1.5 Der auditorische Kortex als Modellsystem für lernabhängige Plastizität	27
1.6 Die Fragestellungen der Arbeit	30
2 Material und Methoden	33
2.1 Diskriminationslernen in einem 2-Wege-Vermeidungs- Shuttlebox-Paradigma	33
2.1.1 Analyse der Trainingsdaten	37
2.2 Mikroinjektion eines ECM-degradierenden Enzyms in die Hörrinde von Labornagetieren	38
2.3 Präparation der Hirnareale zur Gewinnung der biochemischen Proben	40

2.3.1	Biochemische Aufbereitung der Hirngewebe	40
2.3.2	SDS-PAGE und Western Blot	42
2.3.3	Fluoreszenzanalyse der Western Blots	44
2.3.4	Semiquantitative Auswertung der Western Blots	44
2.4	Immunhistochemische Färbung	47
2.5	Mikroskopische Aufnahmen	48
2.6	Statistische Auswertung	48
3	Ergebnisse	49
3.1	ECM-Degradation während aktiven Vermeidungslernens und Umlernen	49
3.2	Intrinsische Änderungen der ECM während aktiven Vermeidungslernens in Mäusen	53
	Betrachtung der absoluten Brevican-Änderungen	57
	Betrachtung der relativen Brevican-Änderungen	59
	Betrachtung der absoluten und relativen TNF-Änderungen	61
3.3	Einfluss der ECM-Degradation auf aktives Vermeidungslernen und den Langzeitabruf des Erlernten	63
3.4	Zeitliche und räumliche Ausdehnung der ECM-Degradation in Mäusen	68
4	Diskussion	71
4.1	Einfluss der enzymatischen Degradation der ECM im auditorischen Kortex auf kognitiv komplexe Umlernprozesse	72
4.2	Intrinsische Umbauprozesse der ECM im auditorischen Kortex während verschiedener Lernphasen	73
4.2.1	Einteilung der Lernphasen und des individuellen Lernverhaltens	74
4.2.2	Proteinbiochemische Untersuchung des ACx mittels semi- quantitativem Western Blot	76
4.2.3	Lernabhängige Veränderungen von Brevican und Tenascin-R in Abhängigkeit des individuellen Lernniveaus	77
4.2.4	Lernabhängige Dynamik der kortikalen ECM im adulten Gehirn	80
4.3	Einfluss der experimentellen Modulation der ECM auf langzeitliche Gedächtniskonsolidierung	81
4.3.1	Verbesserung des Langzeitabrufs von Vorerfahrungen bei schwacher initialer Lernleistung	81

4.3.2	Abhängigkeit von initialer Lernleistung und Verbesserung des Langzeitabrufs	83
4.4	Die Rolle der ECM in juvenilen und adulten Gehirnen zur Steuerung flexibler Verhaltensanpassungen	84
4.4.1	Entwicklungsabhängiger ECM-Einfluss zur Steuerung der Plastizität in verschiedenen Hirnarealen	84
4.4.2	Zugrunde liegende zelluläre Mechanismen der plastischen Anpassung nach dynamischer ECM Modulation	91
4.4.3	Regulation der ECM zur Verfestigung adulter Lernprozesse und der Gedächtniskonsolidierung	93
4.4.4	Dynamische Regulation lernabhängiger Plastizität im adulten Gehirn	98
4.4.5	Ausblick und Perspektiven	102
A	Statistische Tabellen	105
	Vergleich der Phasenübergänge biochemisch untersuchter Tiergruppen . .	106
	Biochemische Analyse	107
	Vergleich NaCl-injizierter Tiere vs. HYase-injizierter Tiere	113
	Histologische Quantifizierung injizierter Mäuse mittels WFA-Färbung . .	119
B	Trainingsbilder	121
	CR-Raten initial lernender und nicht lernender injizierter Tiere	122
	CR-Raten aller biochemisch analysierter Tiere	123
	CR-Raten aller einzelner injizierter Mäuse	124
C	SDS-PAGE-Gelherstellung und verwendete Lösungen	125
	TG-Gel-Herstellung	126
	Verwendete Lösungen	126
D	Eigene Publikation	129
	Literaturverzeichnis	131

Abbildungsverzeichnis

1.1	Aufbau der Extrazellulären Matrix	26
1.2	Aufsteigende Hörbahn der Maus	29
2.1	Sprunganalyse einer repräsentativen Maus im FM-Diskriminationslernen	35
2.2	2-Wege-Shuttlebox-Trainingsparadigma zur Diskrimination von FM-Tönen	36
2.3	Signal-Detektions-Theorie	38
2.4	Schematische Darstellung der Injektionsorte im ACx von Gerbils und Mäusen	40
2.5	Der Weg vom trainierten Tier bis zur Protein-Gelelektrophorese . . .	43
2.6	Repräsentatives Beispiel eines Western Blot der ECM-Fraktion der auditorischen Kortizes von Mäusen in unterschiedlichen Lernphasen	45
3.1	Lernkurven von Gerbils trainiert in einem FM-Diskriminationsparadigma	50
3.2	Histologische Analyse der zeitlichen und räumlichen Ausdehnung der ECM-Degradation bei Gerbils	52
3.3	Repräsentatives Beispiel eines in FM-Diskrimination trainierten Tieres, mit Erläuterung der Lernparameter	54
3.4	Trainingsgruppen biochemisch mittels semiquantitativem Western Blot analysierter Tiere	56
3.5	Brevican-Quantifizierung des ACx in unterschiedlichen Lernphasen	58
3.6	Verschiebung der Brevican-Verhältnisse im ACx in unterschiedlichen Lernphasen	60
3.7	Tenascin-R-Quantifizierung und deren Verhältnisse im ACx in unterschiedlichen Lernphasen	62
3.8	Vergleich aller NaCl-injizierten Tiere vs. aller HYase-injizierten Tiere	64
3.9	Vergleich der NaCl-injizierten und HYase-injizierten Tiere aufgetrennt nach initialen Lernern und initialen Nichtlernern	67

3.10	Repräsentatives Beispiel einer WFA-Färbung und Quantifizierung der ECM in injizierten Tieren	69
4.1	Postulierter Mechanismus des Einflusses der ECM auf das Lernverhalten adulter Mäuse	101
B.1	CR-Raten initial lernender und nicht lernender injizierter Tiere	122
B.2	CR-Raten aller biochemisch analysierter Tiere	123
B.3	CR-Raten aller einzelner injizierter Mäuse	124

Tabellenverzeichnis

A.1	One-Way-ANOVA der Lernphasenübergänge der biochemisch analysierten Gruppen	106
A.2	Gepaarter t-Test zwischen Hit- und FA-Raten der Einzeltiere der biochemisch analysierten Gruppen	106
A.3	One-Way-ANOVA der Quantifizierung der absoluten Brevican-Werte der ECM-Fraktion	107
A.4	One-Way-ANOVA der Quantifizierung der absoluten Brevican-Werte der zellulären Fraktion	108
A.5	One-Way-ANOVA der Quantifizierung der Überschüsse zwischen Vollängenbrevican und dem 55 kDa-Fragment in der ECM-Fraktion und der zellulären Fraktion	109
A.6	One-Way-ANOVA der Quantifizierung der Brevican-Überschüsse in der ECM-Fraktion vs. der zellulären Fraktion	110
A.7	One-Way-ANOVA der Quantifizierung der absoluten TNR-Werte für die ECM-Fraktion und die zelluläre Fraktion	111
A.8	One-Way-ANOVA der Quantifizierung der TNR Überschüsse für ECM-Fraktion vs. der zellulären Fraktion	112
A.9	ANOVAs zwischen Hit- bzw. False-Alarms-Raten-Plateaus, sowie deren 1. Versuchssitzungen, der initialen und LTR-Phasen aller 0,9% Kochsalz- und HYase-injizierten Tiere	113
A.10	ANOVAs zwischen d'-Werten der Plateaus und der 1. Versuchssit- zungen, sowie zwischen den Lernphasenwechseln der initialen und LTR-Phasen, aller 0,9% Kochsalz- und HYase-injizierten Tiere	114
A.11	ANOVAs zwischen Hit- bzw. False-Alarms-Raten-Plateaus, sowie deren 1. Versuchssitzungen, der initialen und LTR-Phasen, initial ler- nender 0,9% Kochsalz- und HYase-injizierter Tiere	115
A.12	ANOVAs zwischen d'-Werten der Plateaus und der 1. Versuchssit- zungen, sowie zwischen den Lernphasenwechseln der initialen und LTR-Phasen, initial lernender 0,9% Kochsalz- und HYase-injizierter Tiere	116

A.13 ANOVAs zwischen Hit- bzw. False-Alarms-Raten-Plateaus, sowie deren 1. Versuchssitzungen, der initialen und LTR-Phasen, nicht initial lernender 0,9 % Kochsalz- und HYase-injizierter Tiere	117
A.14 ANOVAs zwischen d'-Werten der Plateaus und der 1. Versuchssitzungen, sowie zwischen den Lernphasenwechseln der initialen und LTR-Phasen, nicht initial lernender 0,9 % Kochsalz- und HYase-injizierter Tiere	118
A.15 One-Way-ANOVA der Transition zur Diskrimination HYase- und 0,9 % Kochsalz-injizierter, initial lernender und HYase-injizierter initial nicht lernender Mäuse	118
A.16 One-Way-ANOVA der Quantifizierung des Zeitverlaufes und der Ortsspezifität der ECM-Degradation im ACx, unilateral mit HYase und NaCl injizierter Tiere	119
C.1 Herstellung der 5 % - 20 % TG-Proteingradientengele	126
C.2 Zusammensetzungen der TG-Blotpuffer	126
C.3 Zusammensetzung der SDS-Puffer	126
C.4 Zusammensetzungen der TBS-Puffer	127
C.5 Zusammensetzungen der PBS-Puffer	127
C.6 Zusammensetzungen der 4 % PFA-Lösung	127

Abkürzungsverzeichnis

Aβ	Amyloid Beta Protein
ACx	Auditorischer Kortex
ADAMTS	Disintegrin und Metalloprotease mit Thrombospondin Motiven
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure aktivierbarer ionotroper Glutamat-Rezeptor
APP/PS1	Alzheimer-Mausmodell-Linie
AQ	Akquisition
AV	Ausweichen (aus dem Englischen <i>avoidance</i>)
<hr/>	
β-DG	β -Dystroglykan
BDNF	vom Gehirn stammender neurotropher Faktor (aus dem Englischen <i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
<hr/>	
CA	Hippocampus
CC	Cingulet Kortex
c-Fos	Cofaktor von Transkriptionsfaktoren der Fos-Familie
ChABC	Chondroitinase ABC
CR	konditionierte Reaktion (aus dem Englischen <i>conditioned response</i>)
CRj	korrekt sitzen bleiben (aus dem Englischen <i>correct rejection</i>)
CS	konditionierter Stimulus (aus dem Englischen <i>conditioned stimulus</i>)
CSD	Stromquellendichte (aus dem Englischen <i>current source density</i>)
CSPG	Chondroitinsulfat-Proteoglykan
<hr/>	
d'	D-Prime (Sensitivitätsindex beschrieben in der SDT)
D1/D5	Dopamin-Rezeptoren
<hr/>	
ECM	Extrazelluläre Matrix
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
ERK	extrazellulär signalregulierte Kinase
<hr/>	
FA	Falschsprung (aus dem Englischen <i>false alarm</i>)
FAK	zentrale Adhäsionskinase (aus dem Englischen <i>focal adhesion kinase</i>)
FM	frequenzmoduliert
<hr/>	
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GAG	Glukosaminoglykan
GluR1/2	Untereinheiten von AMPA-Rezeptoren (Glutamat-R.-Untereinheit-1/2)
Go/NoGo	CS für das Abrufen des Sprung-/Nichtsprung-Verhaltens der Tiere
<hr/>	
HAPLN/Crtl	Hyaluronan-Proteoglykan-Link-Protein
Hit	korrekter Sprung (aus dem Englischen <i>hit</i>)
HYase	Hyaluronidase
HVC	auditorisch-motorisches Kortexareal der Vögel (aus dem Englischen <i>high vocal area</i>)
<hr/>	
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
<hr/>	
LAR	CSPG-Rezeptor: (aus dem Englischen <i>leukocyte common antigen related phosphatase</i>)
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
LTR	Langzeitabruf (aus dem Englischen <i>long-term retrieval</i>)

weitere Abkürzungen

Miss	verpasster Sprung (aus dem Englischen <i>miss</i>)
MMP	Matrixmetalloprotease
mTOR	Rapamycin-sensitive Kinase im Säugetier (aus dem Englischen <i>mechanistic Target of Rapamycin</i>)
NgR	Nogo Rezeptor (Axon Wachstumsinhibitions-Rezeptor)
NL	nicht diskriminationslernend (Nichtlerner)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat aktivierbarer ionotroper Glutamat-Rezeptor
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (aus dem Englischen <i>phosphate buffered saline</i>)
PFA	Paraformaldehyd Lösung
PFC	Präfrontaler Kortex
PG	Proteoglykan
PNN	Perineuronales Netz
PPD	gepaarte Puls-Unterdrückung (aus dem Englischen <i>paired pulse depression</i>)
PV	Parvalbumin
RPTPσ	CSPG-Rezeptor: Protein Tyrosin Phosphatase σ
RT	Abruf (aus dem Englischen <i>retrieval</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (aus dem Englischen <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDT	Signal-Detektions-Theorie
SPL	Schalldrucklevel (aus dem Englischen <i>sound pressure level</i>)
sqWB	semiquantitativer Western Blot
STD	Standard
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (aus dem Englischen <i>tris buffered saline</i>)
TBS-T	Tris gepufferte Salzlösung mit Detergenz TWEEN 20
TCx	temporaler Kortex
TG	Tris-Glycin
TNR	Tenascin-R
tPA	Gewebe-Plasminogenaktivator (aus dem Englischen <i>tissue plasminogen activator</i>)
TrkB	Tyrosinkinase-B
US	unkonditionierter Stimulus
WEA	<i>Wisteria floribunda</i> Agglutinin
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

Kapitel 1

Einleitung

Wie jeder an sich selbst bemerkt, lernen wir ein Leben lang. Dazu gehört aber auch, dass Gedächtnisse ständig stabilisiert werden und dabei flexibel genug bleiben müssen, um in einer sich ständig ändernden Umwelt zuvor Erlerntes dennoch gewinnbringend anzuwenden. Die Regelung dieser Balance ist komplex und es gibt neuere Ideen dazu, dass das Gehirn solche lernabhängige Plastizität und Stabilität auch über extrazelluläre Mechanismen steuert.

In höheren Vertebraten werden durch Gliazellen und Neuronen Moleküle produziert, die in den extrazellulären Raum sekretiert werden und dort die Extrazelluläre Matrix (ECM) bilden. Schon die Pioniere der Zellbiologie des Gehirns, wie Camillo Golgi und Santiago Ramon y Cajal, haben im 19. Jahrhundert netzförmige Strukturen beschrieben, die die meisten Neuronen umgeben. Zunächst als präparative Artefakte eingestuft, wurde der ECM später eine stabilisierende Funktion der Gewebe zugeschrieben. Die Forschung der darauf folgenden Jahrzehnte gab mehr und mehr Hinweise darauf, dass die ECM viele Funktionen im Gehirn übernimmt. Sie ist beteiligt an Prozessen der Regulation von Zelladhäsion, der Kommunikation zwischen Zellen, deren Differenzierung und Kompartimentbildung und verschiedenen Formen der neuronalen Plastizität. Während der frühen Ontogenese ändert sich die Zusammensetzung der ECM mehrfach. So wechselt die Ausstattung mit Proteoglykanen und Glykoproteinen, wie Neurocan und Tenascin-C, in der späten embryonalen Phase hin zu deren, im adulten Hirn vorrangig anzutreffenden, Vertretern.

Der Wechsel von juveniler zu adulter ECM-Zusammensetzung findet interessanterweise zeitgleich mit dem Schließen sog. kritischer Perioden in der Entwicklung der einzelnen Strukturen des Gehirns statt. Aufgrund dieser Beobachtung wurde die Idee entwickelt, dass die ECM den Wechsel zwischen juveniler und adulter Plastizität im Gehirn, durch Stabilisierung und damit Restriktion der neuronalen Reorganisation erfahrungsoptimierter Netzwerke, beeinflusst. Diese Mechanismen stellen die Voraussetzungen für strukturelle Integrität bei gleichzeitiger aktivitätsabhängiger Optimierung neuronaler Schaltkreise dar, die Langzeitspeiche-

rung und Abruf von Gedächtnisinhalten ermöglichen. Neueste wissenschaftliche Forschung hat gezeigt, dass dynamische Veränderungen in der ECM Formen synaptischer Plastizität beeinflussen, flexibles Lernen ermöglichen und die Gedächtnisorganisation im adulten Tier beeinflussen können.

1.1 Die Struktur der adulten ECM

Wie zuvor angedeutet, ist die ECM ein komplex angeordnetes dreidimensionales Netzwerk aus vielen Molekülen unterschiedlicher Klassen. Das vorrangig im adulten Gehirn vorhandene Glykoprotein Tenascin-R und die Chondroitinsulfat-Proteoglykane (CSPGs) Brevican und Aggrecan binden dabei an das unverzweigte Polysaccharid Hyaluronan, welches das sogenannte Rückgrat der ECM bildet (für einen Überblick siehe [Rauch, 2004](#); [Frischknecht & Happel, 2016](#); Abb. 1.1). Dadurch vernetzt sich die ECM zu einer dreidimensionalen Struktur. CSPGs wie Aggrecan und Brevican sind hantelförmige Proteoglykane, die mit ihren unterschiedlichen Bindedomänen einerseits am Hyaluronan verankert sind, andererseits aber auch mit Tenascin-R (TNR) Wechselwirkungen eingehen. Die Verknüpfungen der CSPGs am Hyaluronan werden durch Hyaluronan-Proteoglykan-Linkproteine (HAPLN/Crtl) zusätzlich stabilisiert (siehe Abb. 1 in [Frischknecht & Happel, 2016](#)).

In dieses Netzwerk sind auch andere Komponenten, wie Orientierungsmoleküle und Wachstumsfaktoren (z. B. BDNF) eingebettet, die Einfluss auf die Morphologie von Neuronen haben können. Diese lockere ECM umgibt Zellkörper, Dendriten und synaptische Verknüpfungen der meisten Neuronen im adulten Gehirn. Um eine kleine Population Neuronen herum ist sie jedoch dichter gepackt und stabiler. Diese sogenannten Perineuronalen Netze (PNNs) enthalten einen großen Anteil Aggrecan mit seinen Chondroitinsulfat-Seitenketten und sind oftmals um inhibitorisch wirkende, mit dem Kalziumbindeprotein Parvalbumin ausgestattete GABAerge Interneurone anzutreffen. Es ist aber auch gezeigt worden, dass PNNs heterogen sind und um viele Neuronentypen im ZNS vorhanden sind. Für die Bildung dieser speziellen ECM-Strukturen sind Linkproteine wie HAPLN1/Crtl1 entscheidende Regulatoren ([Carulli et al., 2010](#)).

1.2 Allgemeine Funktionen der ECM

Aus der komplexen Komposition der ECM ergeben sich vielfältige Funktionen. So ist die ECM im juvenilen Stadium an den Prozessen zur Neuro- und Gliogenese, der Zellmigration, der Wegfindung von Axonen und an der Synaptogenese

beteiligt. Diese hohe Flexibilität der juvenilen ECM ist notwendig für die individuelle Anpassung des Gehirns, was sich dadurch optimal an die Lebensumgebung des Organismus adaptieren kann. Am Ende dieser Anpassungen stehen kritische Phasen, in denen in sensorischen Systemen die neuronale Abbildung der Umwelt fixiert wird. Ein Beispiel ist das visuelle System, in dem die Ausbildung topografischer Karten im primären sensorischen Kortex nach dem Beenden der sog. kritischen Periode, in der die ECM in ihren adulten Zustand wechselt und damit die juvenile Plastizität beendet, abgeschlossen ist.

Auch die adulte hyaluronanbasierte ECM erhält diverse Funktionen des Gehirns aufrecht. Dazu zählen Prozesse wie die Regulation der Synaptogenese und synaptischen Plastizität, die Kompartimentierung neuronaler Oberflächen, Schutz der Neuronen vor z. B. oxidativem Stress, Regulation der ionalen Homöostase und Neuron-Glia Interaktionen.

1.3 Einfluss der ECM auf neuronale Plastizität auf molekularer Ebene

Für diese Arbeit stehen die Einflüsse der ECM auf adulte Lernprozesse im Vordergrund. Grundlage solcher Lernprozesse sind immer synaptische Veränderungen in aktiven Neuronen und deren Netzwerken, die auf elektrophysiologischer als auch morphologischer Ebene sichtbar werden können.

Enzyme aus der Gruppe der ECM modulierenden Metalloproteasen scheinen in all diesen Prozessen beteiligt zu sein. In [Frischknecht & Seidenbecher \(2008\)](#) ist eine aktivitätsabhängige Sekretion und Rekrutierung von Neurotrypsin gezeigt worden. Das resultierende 22 kDa-Fragment, aus der Proteolyse von Agrin, induziert Signale zur Bildung von Filopodien in Hippocampusschnitten ([Matsumoto-Miyai et al., 2009](#)) nach induzierter Langzeitpotenzierung (LTP). MMP9, als eine der am besten untersuchten Metalloproteasen, hat nach Netzwerkaktivierung über sein Zielmolekül β -Dystroglykan (β -DG) Einfluss auf die morphologische Umgestaltung der synaptischen Dornen, über Interaktionen mit dem Actin-Zytoskelett ([Michaluk et al., 2007](#)). Homöostatische Plastizität wird z. B. durch ADAMTS-4/5 beeinflusst ([Yamaguchi, 2000](#)), wobei Brevican ein Zielmolekül aktivitätsabhängiger, homöostatischer Modulation an Synapsen ist ([Valenzuela et al., 2014](#)).

Wie in [Frischknecht & Seidenbecher \(2012\)](#) beschrieben, scheint die ECM über Signalmoleküle, die durch aktivitätsabhängige Proteolyse entstehen, Einfluss auf synaptische Plastizität, bis hin zur Synapsenneubildung, nehmen zu können. Auf

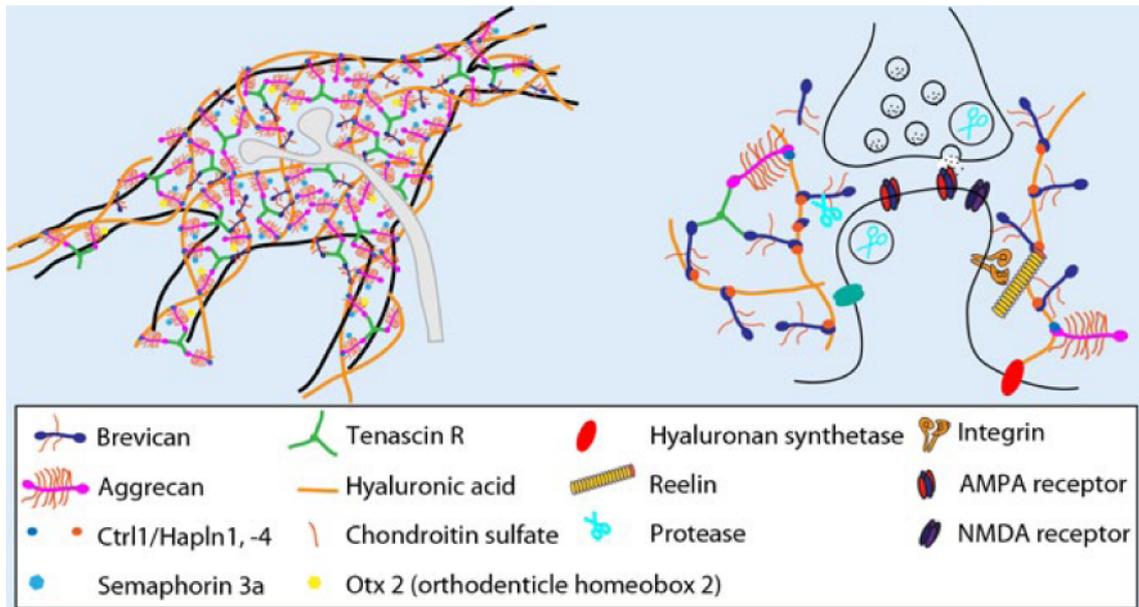


Abbildung 1.1 – **Aufbau der Extrazellulären Matrix.** Gezeigt ist der schematische Aufbau der ECM mit seiner Vielfalt an beteiligten Molekülen. Links ist die Situation in dicht gepackten PNNs mit den an den Chondroitinsulfat-Seitenketten gebundenen Signalmolekülen dargestellt. Axone formen Synapsen in den Aussparungen der PNNs. Rechts ist die lockere ECM um Synapsen gezeigt, die wenig Aggrecan und damit weniger Chondroitinsulfat enthalten. Signalproteine der ECM kommunizieren mit ihren synaptischen Bindepartnern und regulieren verschiedene Zellprozesse, wie die Mobilisierung von Glutamatrezeptoren. Die ECM-Funktion, wie das Freisetzen von Signalmolekülen oder erhöhen synaptischer Plastizität durch ECM-Abbau, werden durch Proteasen (angedeutet durch die Scheren) aktivitätsabhängig moduliert (verändert nach [Frischknecht & Happel \(2016\)](#), Details siehe Abb. 1 des Übersichtsartikels).

morphologische Umbauprozesse an Synapsen könnten Wachstumsfaktoren, wie BDNF in Zusammenhang mit ECM-Modulation, großen Einfluss haben ([Iwakura et al., 2008](#)).

In *in vitro* Studien ist gezeigt worden, dass nach Degradation der ECM in hippocampalen Zellkulturen die laterale Mobilität von AMPA-Rezeptoren an glutamatergen Synapsen erhöht ist ([Frischknecht et al., 2009](#)). Die hohe negative Ladung der ECM-Moleküle könnte auch Einfluss auf die synaptische Übertragung durch Glutamat haben. Somit könnte die ECM-Modulation subtile Einflüsse auf Netzwerkaktivitäten haben.

Verschiedene Studien haben den Einfluss des lernassoziierten Neuromodulators Dopamin auf Lernprozesse untersucht ([Stark & Scheich, 1997](#); [Schicknick et al., 2008](#); [Happel et al., 2014a](#)). Dass Dopamin hierbei ebenfalls mögliche Einflüsse auf die Rezeptormobilisierung hat, haben aktuelle Studien vorgeschlagen (z. B. [Ladepêche et al., 2013](#); [Nai et al., 2010](#); [Sun, 2005](#)).

Aufgrund der aufgezeigten *in vitro* Befunde zur Modulation von Brevican, als

einem aktivitätsabhängig an Synapsen modulierten Molekül, ist es eines der Hauptmoleküle der Betrachtung in dieser Arbeit, im sich frei verhaltenden Tier.

1.4 Der ECM-Einfluss auf erlerntes Verhalten im juvenilen und adulten Tier

Auf Ebene des lebenden Tieres ist der ECM-Einfluss zunächst während des Übergangs vom juvenilen ins adulte Entwicklungsstadium, der kritischen Periode, untersucht worden. Die strukturelle Festlegung topografischer Organisation im visuellen Kortex wird dabei durch die adulte ECM festgelegt (Pizzorusso, 2002). Es wurde aber gezeigt, dass hier die kritische Periode durch Injektion von Chondroitinase ABC (ChABC) wieder eröffnet werden kann. Aus weiteren Studien ist bekannt, dass Angstverhalten in Ratten auf subkortikaler Ebene mit der Maturierung der ECM festgelegt wird (Gogolla et al., 2009). Der ECM-Einfluss auf kortexabhängige Lernprozesse wie das Erlernen von arttypischen Gesängen wurde bei Zebrafinken untersucht (Balmer et al., 2009). Auch hier wurde die motorische Fähigkeit des Gesanges während der kritischen Periode mit der ECM-Maturierung festgelegt. Im adulten Tier konnte die Fähigkeit durch Degradation der ECM in dem spezifischen Areal nicht wieder hergestellt werden.

In Verhaltensstudien im adulten Tier konnte anhand von Knock-out (KO) Tieren für das Linkprotein HAPLN1 gezeigt werden, dass die Objektwiedererkennung für bis zu 48 h in den KO-Tieren verlängert und dies auf eine verringerte Dichte an PNNs zurückzuführen ist (Romberg et al., 2013). Drogen- und futterinduzierte Ortspräferenz wurde mit Hilfe von Degradation der ECM in der Amygdala untersucht (Xue et al., 2014). Dabei konnten die drogeninduzierten Verhaltensweisen wieder eliminiert werden, das futterinduzierte Suchverhalten jedoch nicht.

Eine Studie an Alzheimer-Modell Mäusen zeigte zudem, durch Degradation der ECM im Hippocampus, einen Einfluss der ECM auf Angstverhalten der Tiere in einer Erkrankungsphase, in der die typischen Plaques im Gehirn noch nicht ausgeprägt sind (Végh et al., 2014).

1.5 Der auditorische Kortex als Modellsystem für lernabhängige Plastizität

Für Trainings in Shuttleboxen oder ähnlichen Apparaturen sind Nagetiere wegen ihrer Größe und auch einer entsprechend hohen Reproduktionsrate geeignete Versuchstiere. Der ACx von Gerbils und Mäusen ist zudem gut als Lernmodell kortex-

abhängiger Lernprozesse nutzbar, weil die aufsteigende Hörbahn von Nagetieren sehr gut beschrieben ist (Abb. 1.2) und auch die Verbindungen zu anderen nicht auditorischen Systemen, über Fasertraktfärbungen, aufgeklärt sind (Budinger & Scheich, 2009). Auditorische Signale der Cochlea, als sensorische Eingänge in das System, werden über eine komplexe Verarbeitung über viele subkortikale Schaltstationen, die ebenso wie der ACx (vergl. Abb. 2.4) alle tonotop organisiert sind, integriert (Abb. 1.2).

Traditionell wurden sensorische Systeme als Stimulusanalysatoren betrachtet, wobei Lernen und Gedächtnisse den höheren Kortexarealen zugeschrieben wurden. Wie man heute weiß ist dies für den ACx nicht der Fall. Der Übersichtsartikel von Weinberger (2004) zeigt auf, dass bereits in den 1950er Jahren erstmals der ACx mit lernassoziierten Veränderungen in Verbindung gebracht wurde. Verschiedene Studien zeigten metabolische Effekte (Gonzalez-Lima & Scheich, 1984) und Verschiebungen rezeptiver Felder (Bakin & Weinberger, 1990) im ACx, assoziiert mit tonevoziertem Lernen. Auch an auditorischem Lernen und Gedächtnisbildung ist er beteiligt (Ohl et al., 2001; Weinberger, 2004; Ohl & Scheich, 2005).

In Ohl et al. (1999) wurde gezeigt, dass der ACx für die Diskrimination der Verlaufsrichtung von frequenzmodulierten (FM) Tönen unerlässlich ist, jedoch die Diskrimination von Reintönen auch ohne den ACx erlernt werden kann. Im ACx werden zudem kontext- und gedächtnisbezogene, wie auch konzeptionelle und ausführungsbegleitende Aspekte einer Aufgabe gespeichert (Scheich et al., 2007).

Somit wird dem ACx bei Säugetieren, mit der Integration von stimulusbezogener Information (*Bottom up*) und kontextbezogener Information (*Top down*), eine zentrale Aufgabe bei der Bewältigung kognitiv komplexer Lernprozesse und der Verhaltenssteuerung zuteil. Im Zuge dieser Integration spielt der lernassoziierte Neuromodulator Dopamin eine zentrale Rolle (Schultz, 2015; Happel & Frischknecht, 2016). So wurde gezeigt, dass Dopamin ebenfalls auf Ebene des ACx die nötigen lernabhängigen plastischen Anpassungen von synaptischen Schaltkreisen ermöglicht (Bao et al., 2001; Schicknick et al., 2008). Zwar ist bekannt, dass im Zuge der verstärkerbasierten Lernprozesse durch Dopamin die kortikale Verarbeitung verändert wird (Happel et al., 2014a), jedoch ist unklar, wie die langfristige Stabilisierung synaptischer Reorganisationen auf zellulär-morphologischer Ebene erfolgt.

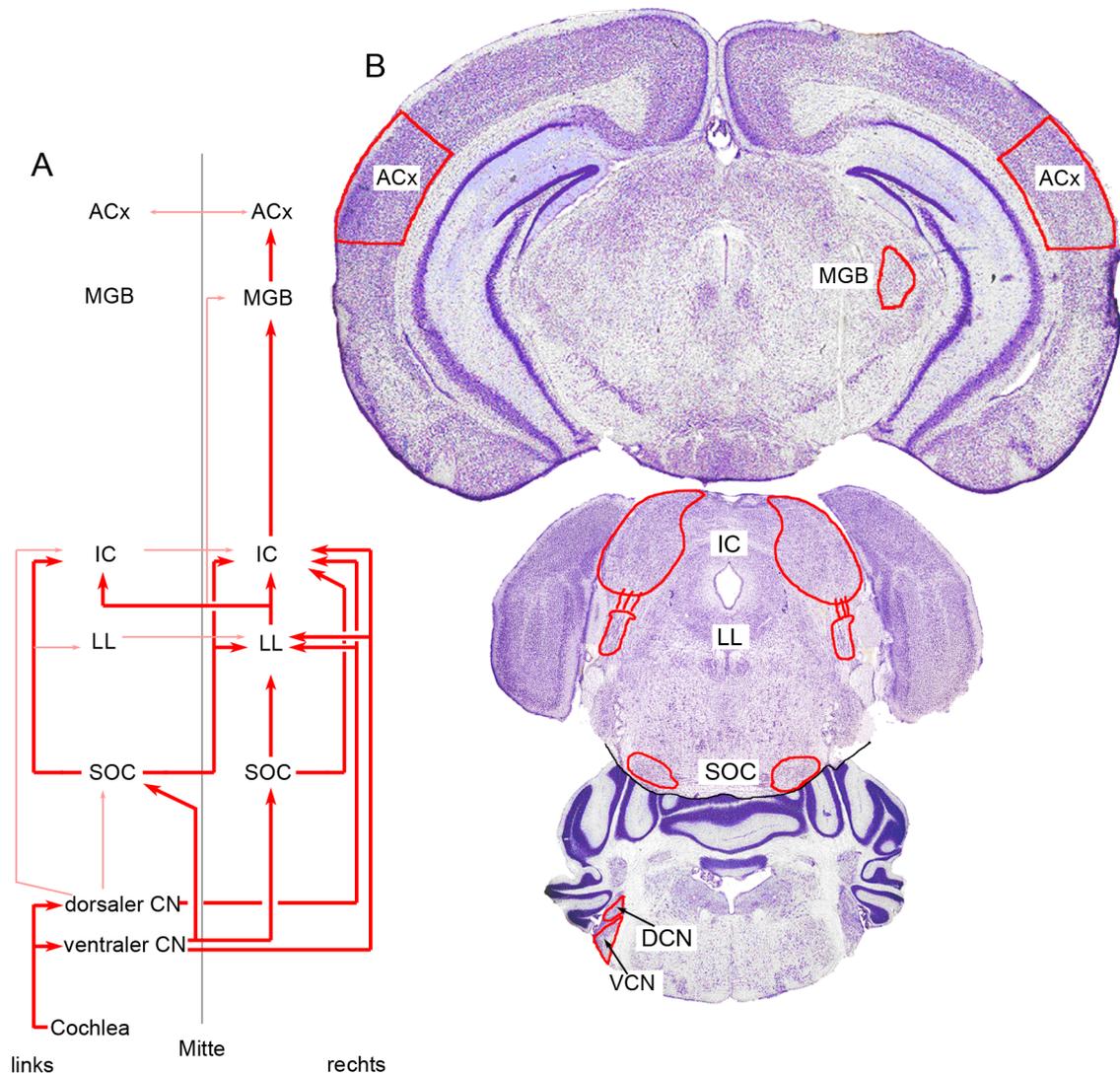


Abbildung 1.2 – **Aufsteigende Hörbahn der Maus.** (A) Schematische Darstellung der ipsi- (links) und kontralateralen (rechts) Verschaltung der aufsteigenden Hörbahn ausgehend vom linken Ohr (verändert aus Lehrbuch [Dudel et al. \(2001\)](#)). Dicke Linien sind Hauptprojektionen, dünne Linien sind schwächere Projektionen. (B) Nisslschnitte aus [Paxinos & Franklin \(1997\)](#), eingezeichnete Kerngebiete sind Cochleakern CN (dorsal DCN, ventral VCN), oberer Olivenkomplex (SOC), lateraler Lemniskus (LL), Colliculus inferior (IC), Medialer Kniehöcker (MGB), Auditorischer Kortex (ACx). Unterregionen von SOC, LL, IC, MGB, ACx sind nicht dargestellt. Für eine detaillierte Darstellung des ACx siehe Abb. 2.4.

1.6 Die Fragestellungen der Arbeit

In den in Abschnitt 1.4 beschriebenen Studien ist die topografische Organisation (Pizzorusso, 2002), subkortikal gesteuertes Angstverhalten (Gogolla et al., 2009) oder artspezifisches kortikal verarbeitetes Gesangsverhalten (Balmer et al., 2009), eher im Übergang vom juvenilen zum adulten Tier, untersucht worden. Romberg et al. (2013) und Xue et al. (2014) konnten den Einfluss der kortikalen und subkortikalen ECM im adulten Tier auf Objekterkennung und drogeninduziertes Suchverhalten aufzeigen. Weitere Erkenntnisse des Einflusses der ECM auf kognitiv anspruchsvolle adulte Lern- und Gedächtnisprozesse sind in der Literatur jedoch nicht verfügbar.

In Voruntersuchungen unseres Labors konnte ein signifikanter ECM-Einfluss auf das Umlernverhalten von adulten Gerbils in einem kortexabhängigen auditorischen Verhaltensparadigma, der Diskrimination von FM-Tönen (siehe Abschnitt 2.1), gezeigt werden (Happel et al., 2014b).

Ausgehend vom aktuellen Stand der Literatur ergeben sich daher wichtige offene Fragen zum Einfluss der ECM auf Lernprozesse im adulten Tier. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel die folgenden Fragen zu untersuchen:

1. Welchen Einfluss hat die ECM im ACx von Labornagetieren auf das Erlernen einer FM-Diskrimination, auf das flexible Umlernen, sowie auf den Langzeitabruf der Gedächtnisinhalte?
2. Sind spezifische ECM-Moleküle, wie Brevican oder TNFR, während kortexabhängiger Lernprozesse durch intrinsische Mechanismen, z. B. *de novo* Synthese oder proteolytischer Verdau, reguliert?
3. In welchen Lernphasen finden diese Modulationen statt und sind sie in allen Tieren aufzufinden oder individuell reguliert?
4. Lässt sich das Erlernen und/oder das Abrufen von Erlerntem durch eine lokale, experimentelle Modulation der ECM im ACx beeinflussen und entsprechend steuern?

Der erste Teil dieser Dissertation beleuchtet die Versuche und Ergebnisse, die sich mit dem Erlernen und dem flexiblen Umlernen in der ersten Frage befassen. Im zweiten Teil wurden die intrinsischen Einflüsse der ECM exemplarisch an den Molekülen Brevican und TNFR (2. und 3. Frage) und der Teil des Langzeitabrufes aus der ersten Frage bearbeitet. Im dritten Teil wurden dann die vierte Frage und auch die Langzeitaspekte der ersten Frage bearbeitet.

Mit der Beantwortung dieser Fragen erweitern die Arbeiten zu dieser Dissertation nun die Erkenntnisse in Bezug auf kortexabhängiges auditorisches Lernen und dem Einfluss der ECM im primär sensorischen Areal des ACx in Nagetieren.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Diskriminationslernen in einem 2-Wege-Vermeidungs-Shuttlebox-Paradigma

Für die Datengewinnung dieser Dissertation wurden Gerbils und Mäuse in einem FM-Diskriminationsparadigma in einer 2-Wege-Shuttlebox (TSE Systems) trainiert. Um die Tiere von äußeren Störquellen, wie Bewegungen oder Geräusche im Labor, abzuschotten, wurden sie in Shuttleboxen innerhalb schallisolierter Kammern trainiert. Die Shuttleboxen wurden durch die TSE-Steuerbox, inklusive der nötigen Computersoftware und des zugehörigen Trainingsprogrammes, angesteuert. Dies ermöglichte auch die individuelle Stimulation über die separat manuell zuschaltbare Hürde. Für die Präsentation der akustischen Reize diente der Deckel der Box, in dem zwei Lautsprecher integriert waren. Die Kontrolle der elektrischen Fußreize über das Reizgitter erfolgte ebenfalls über interne Elektrostimulatoren der TSE-Steuerbox (Gerbils) oder zwei separate AM-Systems 2100 Stimulatoren (Mäuse). In beiden Fällen war eine Anpassung der Stromstärken während des Trainings gegeben, sodass sich im Bedarfsfall die Stromstärken in Go- und NoGo-Trials variieren ließen. Beide Spezies wurden jeweils mit angepassten Paradigmen trainiert, die angelehnt an die aus der Literatur bekannte Methode ([Kraus, 2002](#); [Schicknick et al., 2008](#)) waren.

Vor jedem Training befanden sich die Tiere für 3 Minuten in einer Phase der Habituation an die Shuttlebox, in welcher keine konditionierten Stimuli (CS) oder unkonditionierten Stimuli (US) präsentiert wurden. Die Anzahl der Kompartimentwechsel wurde in dieser Habituationsphase dokumentiert (Abb. 2.1 C). Während des Trainings mussten die Tiere aufsteigende und abfallende lineare FM-Töne als CS diskriminieren (siehe Abb. 2.1). Beide Spezies wurden in Frequenzbandbereichen innerhalb ihrer normalen Hörkurven trainiert. Für Gerbils wurden FM-Töne (250 ms mit 5 ms linearem Anstieg bzw. Abfall am Start bzw. Ende des Tones und 250 ms Pause, 6 s Dauer der Präsentation; ansteigend, 2–4 kHz; abfallend, 4–2 kHz)

verwendet. Die Mäuse wurden mit FM-Tönen gleicher Parameter im Frequenzbereich (4–8 kHz) trainiert, um besser an den Hörbereich der Tiere angepasst zu stimulieren. Die Tiere mussten dabei auf den Go-Stimulus hin innerhalb der 6 s das Kompartiment wechseln, um einem milden Fußreiz als US zu entgehen und auf den NoGo-Ton das Sprungverhalten aktiv unterdrücken. Für die Mäuse wurde des Weiteren bei beiden Trailvarianten der Ton nach dem Entscheidungsfenster von 6 s parallel mit dem Fußreiz präsentiert. Dies ermöglichte es den Tieren leichter, die Diskrimination beider CS zu erlernen. Die mittlere Trialdauer betrug 20 ± 4 s.

Als korrekte Verhaltensreaktionen wurde ein Kompartimentwechsel innerhalb dieser 6 s für den Go-Fall (*Hit*) und das Verbleiben im NoGo-Fall (aus dem Englischen *Correct Rejection*, CRj) gewertet (vgl. Abb. 2.2). Als US wurde ein ausreichend hoher Fußreiz präsentiert, der im Falle des Verbleibens auf der ipsilateralen Seite im Go-Fall (aus dem Englischen *Miss*) über das Bodengitter appliziert wurde und das Tier zum Überqueren der Hürde veranlasste. Im umgekehrten Fall (aus dem Englischen *False Alarms*, FA) wurde der Fußreiz auf der kontralateralen Seite präsentiert, sodass das Tier auf den Fußreiz hin zurück ins ursprüngliche Kompartiment sprang (vgl. Abb. 2.2). Bei beiden Tierarten wurden die Stromstärken individuell adjustiert und lagen bei Gerbils zwischen 100 μ A und 600 μ A, bei Mäusen zwischen 200 μ A und 750 μ A (Abb. 2.2). Um die Tiere in sogenannter Schockkontrolle zu halten, wurde die individuelle Reizstärke entsprechend so eingeregelt, dass die Tiere in >90 % der Fälle innerhalb eines Zeitfensters von 0,5 s bis 1,0 s nach Beginn des Reizes auf den Go-Ton das Kompartiment wechselten (vgl. Abb. 2.1). Den Tieren wurden die Töne pseudorandomisiert, in einer Lautstärke deutlich über dem Grundrauschen der Umgebung (15–20 dB SPL über Grundrauschen) und gut wahrnehmbar im Bereich der Hörkurven der Tiere (Gerbils: 65 dB SPL, Mäuse: 80 dB SPL), präsentiert.

Für die Datengewinnung dieser Dissertation wurden insgesamt 46 Gerbils (siehe [Happel et al., 2014b](#)) und 123 Mäuse verwendet, davon wurden für die Analyse mittels semiquantitativem Western Blot (sqWB, siehe Abschnitt 2.3.2) für die naive und je Trainingsgruppe 8 Mäuse, für die nicht diskriminierenden Tiere (NL-Gruppe)

7 Mäuse in die biochemische Analyse inkludiert (gesamt 47 Tiere). Für die Injektionsexperimente (siehe Abschnitt 2.2) wurden von der Gesamtanzahl 38 Mäuse verwendet. Die Tiere wurden nach geltenden Normen und Gesetzen des Landes Sachsen-Anhalt in einem 12 Stunden Tag-/ Nachtrhythmus inklusive Futter und Wasser *ad libitum* gehalten.

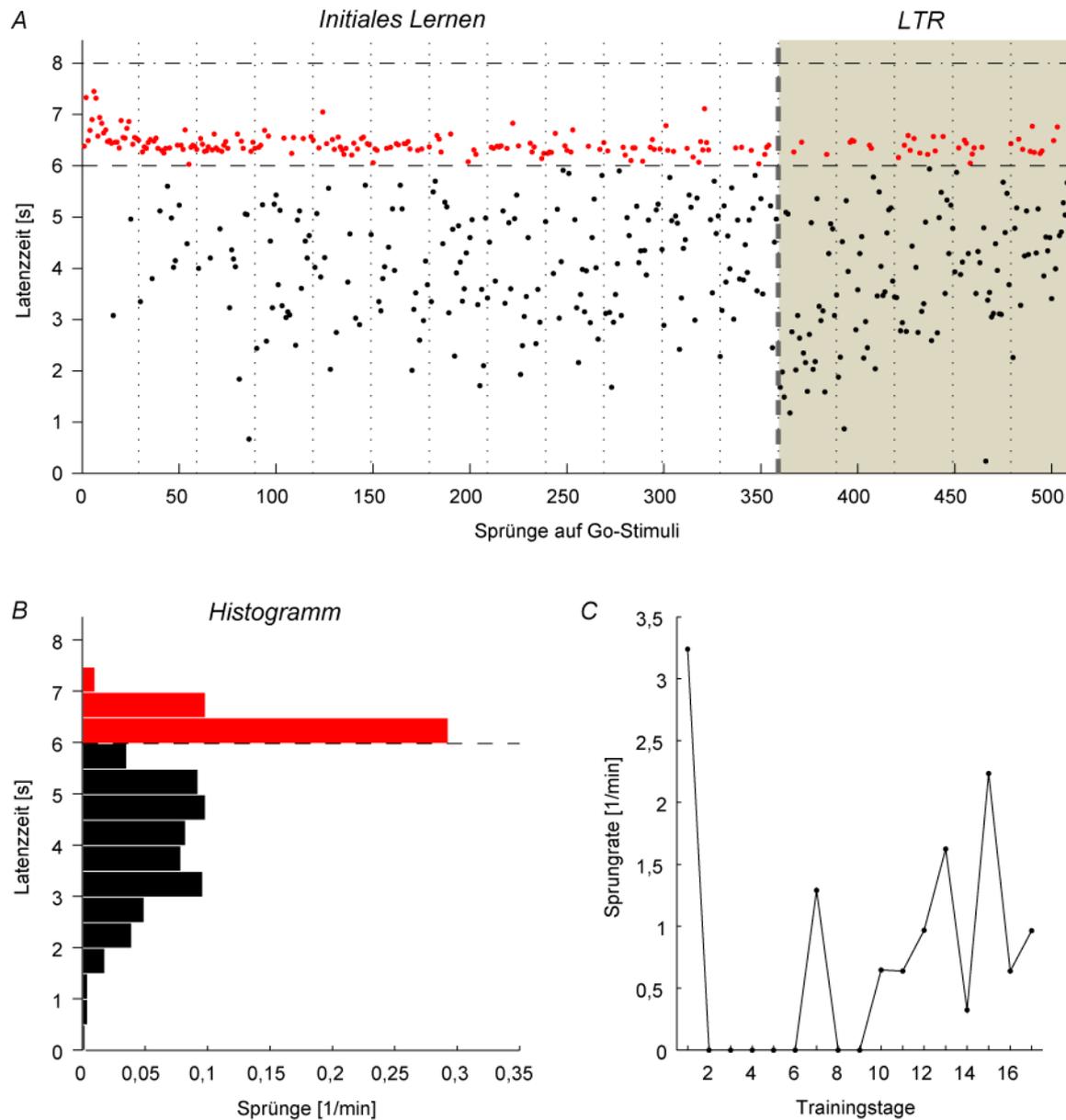


Abbildung 2.1 – **Sprunganalyse einer repräsentativen Maus im FM-Diskriminationslernen.** Gezeigt sind die Sprungdaten eines Beispieletieres im Verlaufe aller Trainingssitzungen, wobei in (A) die einzelnen Sprünge (Punkte) als Reaktion auf den Go-Stimulus dargestellt sind. (B) zeigt in einem Histogramm die Sprungzeiten aller Sprünge über alle Trainingssitzungen, zusammengefasst jeweils in 500 ms je Balken. (C) zeigt die Sprungraten des Tieres innerhalb der Habituationzeit (3 min) über alle Trainingssitzungen. Ocker unterlegte Sitzungen in (A) zeigen den Langzeitabruf der Diskrimination nach etwa 4 Wochen Trainingspause im Haltungskäfig. In (A) und (B) repräsentiert schwarze Farbe Hits innerhalb des Entscheidungsfensters von 6 s, rote Farbe zeigt durch den Fußreiz evozierte Sprünge (*Miss*) innerhalb des angestrebten 1 s-Fensters, für gute Schockkontrolle. Details siehe Text.

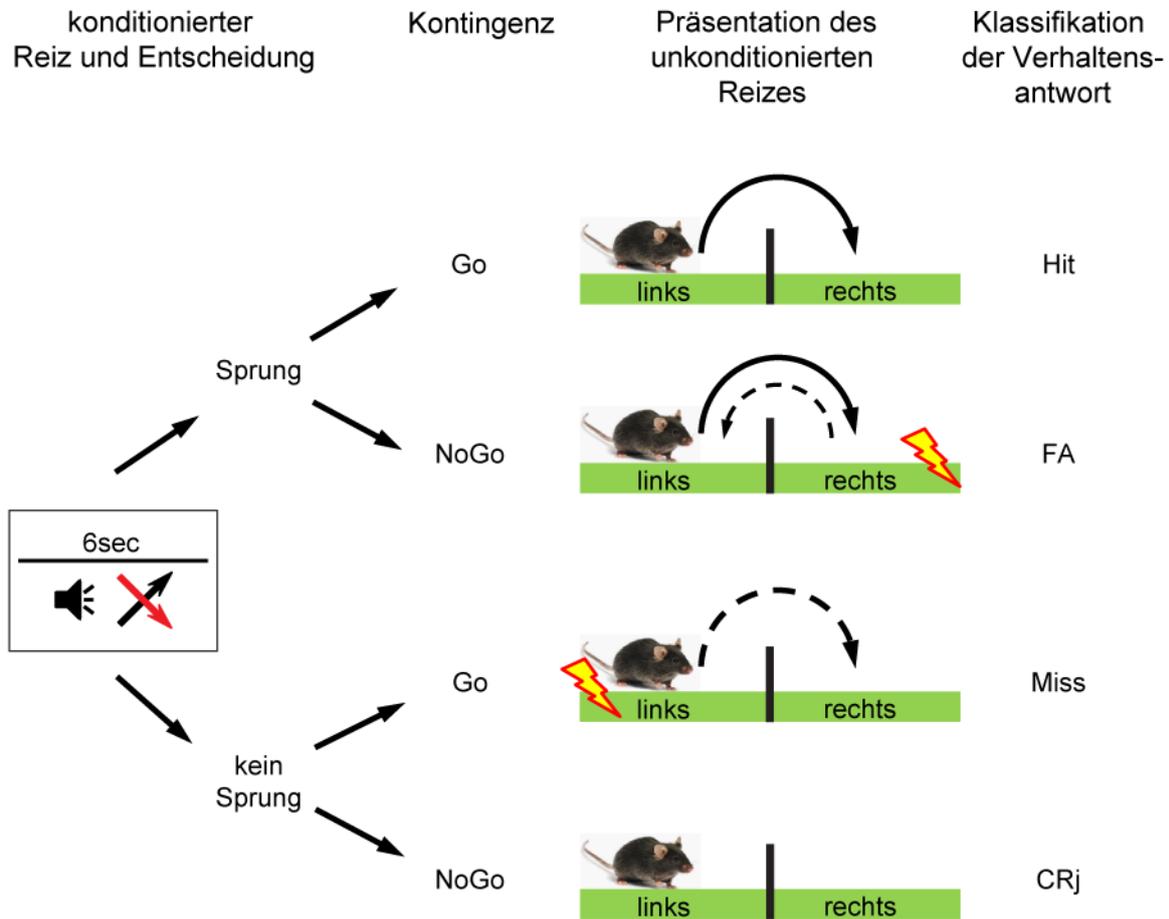


Abbildung 2.2 – **2-Wege-Shuttlebox-Trainingsparadigma zur Diskrimination von FM-Tönen.** Schematische Darstellung des Trainingsablaufs in der Shuttlebox. Die Tiere lernen in dieser Box, die Modulationsrichtung zweier FM-Töne zu diskriminieren. Die Diskrimination wird durch Überqueren der Hürde in der Mitte der Box angezeigt. Dabei sind vier Entscheidungsfälle zu unterscheiden. Entscheidet sich das Tier für einen Sprung im Go-Fall, so zählt diese Reaktion als korrekter Sprung (*Hit*). Springt das Tier im Go-Fall nicht (*Miss*), so wird auf ipsilateraler Seite der Box ein milder Fußreiz präsentiert, der das Tier zum Überqueren der Hürde bringt. Springt das Tier im NoGo-Fall über die Hürde (*False Alarm; FA*) so wird ein milder Fußreiz auf der kontralateralen Seite präsentiert, der es in der Regel veranlasst umgehend zurückzuspringen (gestrichelter Pfeil). Springt es im NoGo-Fall nicht, hat es diesen Versuchsfall durch korrektes Sitzenbleiben (*Correct Rejection, CRj*) erfüllt. Details der Trainingsparameter siehe Text.

2.1.1 Analyse der Trainingsdaten

Für die Analyse der Trainings wurden die Rohdaten der konditionierten Sprungraten für die Go- und NoGo-Reaktion sowie die Spontansprungraten zwischen den einzelnen Trials der Tiere ausgewertet. Als sogenannte mittlere Inter-Trial Shuttle-rate (ITS) wurde die mittlere Sprunganzahl innerhalb des gesamten Trails, abzüglich der CRj und der US-induzierten Sprünge bestimmt. Da die Tiere in diesem Paradigma die Entscheidung der Reaktion auf zwei verschiedenen Stimuli haben, wurde das Diskriminationsverhalten auf der Basis der „Signal-Detektions-Theorie“ (SDT) ausgewertet (für einen Überblick siehe [Carandini & Churchland, 2013](#); Abb. 2.3). Die Tiere haben die Möglichkeit sich korrekt oder falsch auf die Stimuli zu entscheiden, dabei ist die Entscheidung durch die perzipierte Signalstärke und die Tendenz für oder gegen eine Entscheidung beeinflusst. Die SDT ermöglicht diese bidirektionalen, teilweise gegensätzlichen Beiträge zur Entscheidungsfindung zu vereinen. Es wird dabei angenommen, dass die neurale Aktivität in jedem Entscheidungsversuch von zwei Verteilungen für die Anwesenheit oder das Fehlen des Stimulus abhängt. Das Tier setzt für sich selbst eine Schwelle, die überschritten werden muss, um das Go-Verhalten auszulösen. Der berechnete Sensitivitätsindex D-prime (d') zeigt die perzipierte Stimulusintensität an. Für eine definierte Schwelle ergibt sich somit bei sich verschiedenem d' -Wert eine unterschiedlich hohe Hit-Quote oder umgekehrt. Trägt man nun den d' -Wert gegen die Trainingssitzungen auf und gibt zusätzlich eine Schwelle vor, die das Tier überschreiten muss, um mit der Lernleistung über dem spontanen Sprunglevel zu liegen, so kann man das Lernverhalten als statistisches Maß quantifizieren (siehe Abb. 3.3 C). Die von uns definierte und für viele Verhaltensanalysen übliche Schwelle lag bei $d' = 1$, gleichbedeutend mit der Standardabweichung von Eins über dem Spontansprunglevel des Tieres bzw. einer zufälligen Diskrimination der zwei Reize durch das Tier.

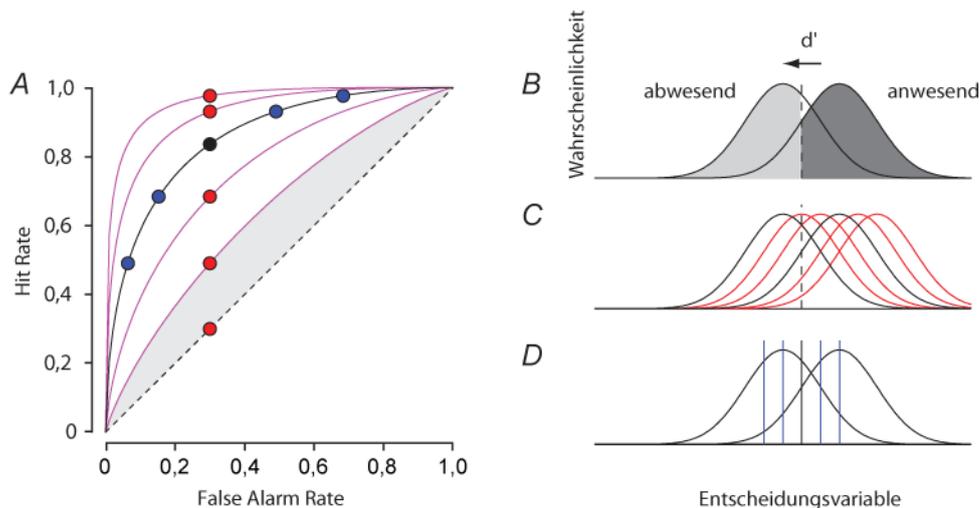


Abbildung 2.3 – **Signal-Detektions-Theorie (SDT)**. Dargestellt sind die Annahmen zur mathematischen Beschreibung von Lernprozessen mithilfe der SDT. In einem Go/NoGo-Design wird ein Stimulus oder eine Eigenschaft dessen als anwesend oder abwesend detektiert. In (A) ist die Lernrate (Grafen) des Tieres in Form der Hits und FAs dargestellt. Diese Daten enthalten allerdings nicht nur die Perzeptstärke, sondern auch die vom Individuum selbst bestimmte Schwelle, die für eine Reaktion überwunden werden muss. (B) zeigt die in der SDT postulierten Verteilungskurven und die Entscheidungsschwelle des Tieres, die für jeden Versuch neu einreguliert wird. (C, D) zeigt zwei Varianten der Auswertung, die für einen festgelegten Schwellenwert (C) eine Verschiebung der Hit-Rate erzeugt (rot in A), oder bei einem festgelegten d' -Wert (D) den Schwellenwert (blau in A) verändert. Abbildung adaptiert aus [Carandini & Churchland \(2013\)](#)

2.2 Mikroinjektion eines ECM-degradierenden Enzyms in die Hörrinde von Labornagetieren

Für die Injektionen des ECM-degradierenden Enzyms Hyaluronidase (HYase) wurden die Tiere beider Spezies in Vollnarkose gelegt (Gerbils: i.p. initiale Injektion von 0,4 ml/100 g Körpergewicht: 45 % Ketamin (50 mg/ml), 5 % Xylazin (2 mg/ml), 50 % isotonische 0,9%ige Kochsalzlösung (154 mM); Mäuse: i.p. initiale Injektion von 0,75 ml/100 g Körpergewicht: 20 % Ketamin (50 mg/ml), 5 % Xylazin (2 mg/ml), 75 % isotonische 0,9%ige Kochsalzlösung (154 mM)). Bilateral wurde die Haut über dem Schläfenbein (*Os temporale*) eröffnet und ein Teil des dort ansitzenden Kaumuskel möglichst stumpf entfernt ([Kraus, 2002](#); [Schicknick et al., 2008](#); [Happel et al., 2014b](#)). Durch Aufbringen von 0,9%iger Kochsalzlösung auf den Schädelknochen lässt sich die Vaskularisation im Temporalkortex als anatomische Landmarke für die Lokalisation der primären und sekundären Felder des ACx nutzen ([Budinger et al., 2000](#); [Mao et al., 2006](#)). Aufgrund der Größenunterschiede der ACx wurden Gerbils dreimal und Mäuse zweimal je Seite injiziert

und somit das primäre, anteriore und auch das posteriore auditorische Feld abgedeckt (Abb. 2.4).

In den Schädelknochen wurden im Ausdehnungsbereich des ACx mit einem Bohrer je Seite entsprechend Abb. 2.4 zwei bzw. drei Löcher von etwa 0,5 mm Durchmesser gebohrt, ohne die Dura Mater zu beschädigen. Die Injektion des Enzyms erfolgte beidseitig durch die Löcher mithilfe einer Glasmikropipette und eines Mikroinjektors (Nanoliter Injektor 2000, World Precision Instruments). Dazu wurde der in einem stereotaktischen Mikromanipulator fixierte Mikroinjektor mit Pipette (ausgezogen aus einer 3,5 inch Kapillare) so platziert, dass die Injektion in speziesspezifischer kortikaler Tiefe (750 μm Gerbils, 400 μm Mäusen) erfolgen konnte. Die eigentliche Injektion der HYase pro Loch erfolgte in 22 Einzeldosen (22,8 nl alle 3 s). Für die Injektionen wurden Enzyme mit unterschiedlichem Substratumsatzvermögen (Standard: 1 unit = 1 μmol Substrat/min) verwendet (Gerbils, 500 unit; Mäuse, 250 unit). Generell geben die Hersteller für Hyaluronidase unterschiedliche Bestimmungen der Enzymaktivität an. Laut Sigma-Aldrich entspricht 1 unit HYase der Abnahme der Absorption (bei 600 nm) des Substrates um 0,330 in einem 2 ml Eppendorfgefäß pro Minute (37°C, pH 5,35, 45 min Reaktionszeit; Sigma-Aldrich, H3506, 37326-33-3). Es handelt sich dabei um Laborwerte ohne den Einfluss eines lebenden Organismus. Auf den Abbau der ECM (vgl. Abb. 3.2, 3.10) und in den Verhaltensdaten (vgl. Abb. 3.1, 3.8, 3.9), waren keine wesentlichen Einflüsse der unterschiedlichen Umsatzzahlen aufzuzeigen. Kontrollgruppentiere wurden in derselben Weise mit 0,9 %iger isotonischer Kochsalzlösung injiziert.

Die Wunden der Tiere wurden anschließend mit antiseptischer Salbe behandelt und mit Gewebekleber (Histoacryl-Kleber, B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) verschlossen (Mäuse nach der ersten OP, Gerbils nach zweiter Injektion am Folgetag unter 1,5-2 % Isofluran). Die Tiere erhielten zur Wundschmerzinderung Metacam (0,5 mg/kg Körpergewicht + 5 % Glucose) subcutan verabreicht und erwachten unter Beobachtung einzeln in neuen Käfigen auf Wärmematten. Je nach Gruppe wurden die Tiere nach einer postoperativen Erholungspause (Gerbils 24 h; Mäuse 48 h) trainiert. Da den Tieren die Kaumuskeln partiell von ihrem Ansatz am Schädel ab präpariert wurden, sind sie in den Folgetagen engmaschig auf Nahrungsaufnahme und Körpergewicht kontrolliert und der Phänotyp in Augenschein genommen worden. Bei etwaigen Einschränkungen der Futteraufnahme in den ersten postoperativen Tagen wurde das Futter eingeweicht angeboten.

Für die Degradation der ECM wurde HYase verwendet, da das Enzym im Vergleich zu Chondroitinase ABC eine deutlich kürzere Lebensdauer hat. Somit vollzieht sich die Rekonstitution der ECM im Zeitverlauf von Tagen und nicht Wochen.

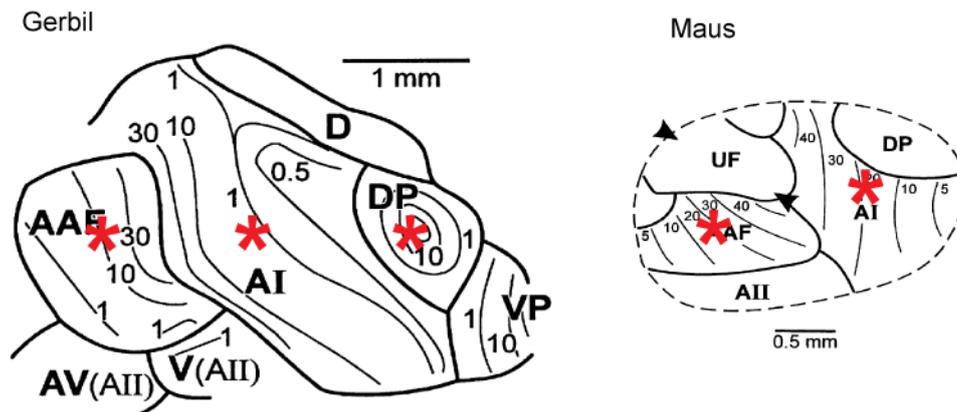


Abbildung 2.4 – Schematische Darstellung der Injektionsorte im ACx von Gerbils und Mäusen. Die Abbildung zeigt die auditorischen Kortizes von Gerbil und Maus im ähnlichen Größenmaßstab (modifiziert nach Stiebler et al. (1997)). Mit roten Sternchen sind die Mikroinjektionsorte von je 500 nl HYase in die ACx von Gerbils und Mäusen schematisch gezeigt. Die Injektionen übergreifen beginnend mit dem AAF und endend mit dem DP-Feld die komplette anterior-posteriore Achse der ACx (Details siehe Text). Abkürzungen aus Stiebler et al. (1997): AI primäres auditorisches Feld, AAF anterior auditorisch, D dorsal, DP dorsoposterior, VP ventroposterior, AV (AII) anteroventral, V (AII) ventral, UF Ultraschallfeld.

2.3 Präparation der Hirnareale zur Gewinnung der biochemischen Proben

Für die biochemische Analyse der ECM-Proteine über sqWB wurden Eppendorfgläser beschriftet und leer ausgewogen (präzise bis auf 0,1 mg genau). Diese vorbereiteten Gefäße wurden während der Präparation des Tieres auf etwa -80°C auf Trockeneis vorgekühlt. Für die Präparation wurden die Tiere tief mit Isofluran anästhesiert und mithilfe einer Guillotine dekapitiert. Anschließend wurde auf dem Deckel einer mit Eis gefüllten Petrischale das Gehirn der Tiere entnommen, die zu untersuchenden Gewebe ACx, Hippocampus (CA), Striatum (Str.) und Präfrontaler Kortex (PFC) beider Hemisphären getrennt herauspräpariert und jeweils in Isopentan, über flüssigem Stickstoff auf -30°C bis -50°C heruntergekühlt, schockgefroren. Die Proben wurden in die gewogenen Eppendorfgläser überführt, nachdem das Isopentan kurz abgedampft war (Abb. 2.5, Schritte 1+2). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben unter -80°C -Bedingungen gelagert.

2.3.1 Biochemische Aufbereitung der Hirngewebe

Die bei -80°C gelagerten ACx-Proben, jeweils beider Gehirnhemisphären getrennt, wurden vor der weiteren Aufarbeitung auf Eis kalt gehalten, mit Eppendorfgläser

gegengewogen und die Masse bestimmt. Anschließend wurden die Gewebe mit Chondroitinase-Extraktionspuffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,03 M Natriumacetat; Proteinaseinhibitor, ROCHE: cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack, REF: 0589791001) und der zugesetzten ChABC (1 μ l ChABC (0,1 unit)/800 μ l Puffer) im Verhältnis 1+9 (9 μ l Extraktionspuffer/1 mg Gewebeprobe) überschichtet. Zur Extraktion der leicht löslichen ECM-Bestandteile, wurden die Proben 45 min bei 37 °C und 900 U/min in einem Eppendorfschüttler inkubiert und anschließend bei 4 °C, 12000 U/min in einer Mikrozentrifuge (Eppendorf: 5424 R) zentrifugiert (Abb. 2.5, Schritt 3).

Um später alle Blots untereinander vergleichen zu können musste ein Standard (STD) mit präpariert werden. Dieser wurde vor der Inkubation, mit dem ChABC-Extraktionspuffer, im Puffer mit Hilfe eines kleinen Skalpell in Stücke zerschnitten, die der Größe des ACx entsprechen. Dies verbessert das Oberflächen-Volumen-Verhältnis und damit die Angriffsfläche des Enzyms.

Der Überstand aller Proben wurde nach der Extraktion abpipettiert und als ECM-Fraktion, jeweils beider Hemisphären, vereinigt. Von all diesen Proben wurden Aliquots sofort für die Elektrophorese (SDS-PAGE) verwendet und die restlichen Proben bei -20 °C gelagert (Abb. 2.5, Schritt 3, linker Zweig). Die verbleibenden Pellets wurden als zelluläre Fraktion bei -20 °C gelagert und später aufgearbeitet (Abb. 2.5, Schritt 3, rechter Zweig). Für die Analyse der ECM-Fraktionen im sqWB wurden jeweils 10 μ l der Proben mit 3,34 μ l SDS-Puffer (4x konzentriert, siehe Anhang, Tab. C.3) versetzt und bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert. Der SDS-Puffer ist in der Probe damit einfach konzentriert. Anschließend wurden die Proben auf Eis aufbewahrt und kurz anzentrifugiert, um verdampftes Wasser vom Deckel des Eppis wieder der Probe zuzuführen (Abb. 2.5, Schritt 4 linker Zweig).

Um für die Auflösung der Pellets im SDS-Puffer genügend Volumen zu haben, wurde die Menge des SDS-Puffers in einfacher Konzentration nach der theoretisch maximal möglichen ECM-Fraktionsmenge jeder Probe berechnet. Da in den Pellets aber deutlich höhere Proteinkonzentrationen zu erwarten waren, wurde die Konzentration an SDS nach Erfahrungswerten verdoppelt, also die berechnete SDS-Puffer-Menge als 2x-Puffer zugesetzt. Es wurde pro 1 mg Pelletmaterial 12 μ l SDS-Puffer (2x) zugesetzt und für 4 Stunden bei 1400 U/min bei Raumtemperatur im Eppendorfschüttler inkubiert. Nach Auflösung der Pellets wurden die Proben für eine halbe Stunde bei 14000 U/min bei 4 °C zentrifugiert und die in SDS-Puffer gelöste Fraktion in neuen Eppendorfgefäßen vereinigt (Abb. 2.5, Schritt 4, rechter Zweig).

Für die Elektrophorese (SDS-PAGE) wurden von allen zellulären Fraktionen 1:2-Verdünnungen mit doppelt destilliertem Wasser hergestellt, und wie die ECM-

Fraktionen bei 95 °C denaturiert, abzentrifugiert und auf Eis aufbewahrt (Abb. 2.5, Schritt 5, rechter Zweig). Die verbleibenden Proben wurden auf -20 °C gelagert.

2.3.2 SDS-PAGE und Western Blot

Für die Analyse aller Proben wurden je Gel (5-20%iges Tris-Glycerin-Polyacrylamid-Gradientengel, 12 Probentaschen, siehe Anhang, Tab. C.1) Doppelbestimmung aller Proben durchgeführt. Dazu wurden jeweils in doppelter Auftragung STD, 4 Proben und ein vorgefärbter Protein-Größen-Marker (PageRulerTMPlus; Thermo Scientific; Prod.Nr: 26619) geladen. Für die ECM-Fraktionen wurden 13,3 µl je Tasche und für die zellulären Fraktionen 10 µl der 1:2-Verdünnung aufgetragen (Abb. 2.5, Schritt 5). Die eine äußere leere Tasche wurde entsprechend mit 1x SDS-Puffer gefüllt und vom Marker jeweils 3 µl pipettiert (Abb. 2.5, Gel; vgl. Tab. C.3). Die aufgetragenen Proteinproben wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (Bedingungen: ECM-Fraktionsgele 8 mA/Gel für Proteinfokussierung im Sammelgel als auch für Proteintrennung im Trenngel, Zellfraktionsgele 8 mA/Gel für Fokussierung und 10 mA für die Trennung). Die ECM-Fraktionsgele liefen dabei, bis die Markerbanden maximal aufgetrennt waren. Zellfraktionsgele hingegen liefen länger, bis die 35 kDa-Markerbande das Ende des Gels erreichte.

Nach erfolgter Elektrophorese und Abtrennen des Sammelgels wurden die Gele in destilliertes Wasser überführt und anschließend 5 Minuten unter UV-Licht (Intas science imaging, UV Transilluminator) aktiviert. Das im Gel befindliche 2,2,2-Trichlorethanol modifiziert Tryptophan (Ladner et al., 2004), dient der Proteinmengenbestimmung je Laufspur des Gels (siehe Abb. 2.5, Gel) und behindert nicht den Transfer der Proteine auf die Blot-Membran.

Für das Blotten wurden die Gele (Abb. 2.5, Schritt 6) und die kurz in Methanol aktivierten Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen in Legepuffer überführt und in das Blot-Sandwich (jeweils Puffer getränkt: Plastgitter, Schwamm, 2x Filterpapier, PVDF-Blot-Membran, Gel, 2x Filterpapier, Schwamm, Plastgitter) eingespannt. Im Anschluss wurden bis zu vier Blot-Sandwiches in einen Blot-Tank geschoben und dieser mit TG-Blot-Puffer (siehe Anhang, Tab. C.2) gefüllt. Der Transfer erfolgte in einem elektrischen Feld über einen Zeitraum von 1:45 Stunden (ECM-Fraktionsgele) bzw. 2:15 Stunden (Zellfraktionsgele) bei 200 mA. Alle Gele wurden in Richtung der Kathode und die Blot-Membran in Richtung der Anode geschichtet, um die durch das SDS negativ geladenen Proteine auf die PVDF-Membran zu übertragen. Nach Beendigung des Elektrotransfers wurden alle Blot-Membranen aus den Sandwiches entnommen, dann in Methanol fixiert und in destilliertes Wasser überführt. Unter UV-Licht wurden Aufnahmen der ent-

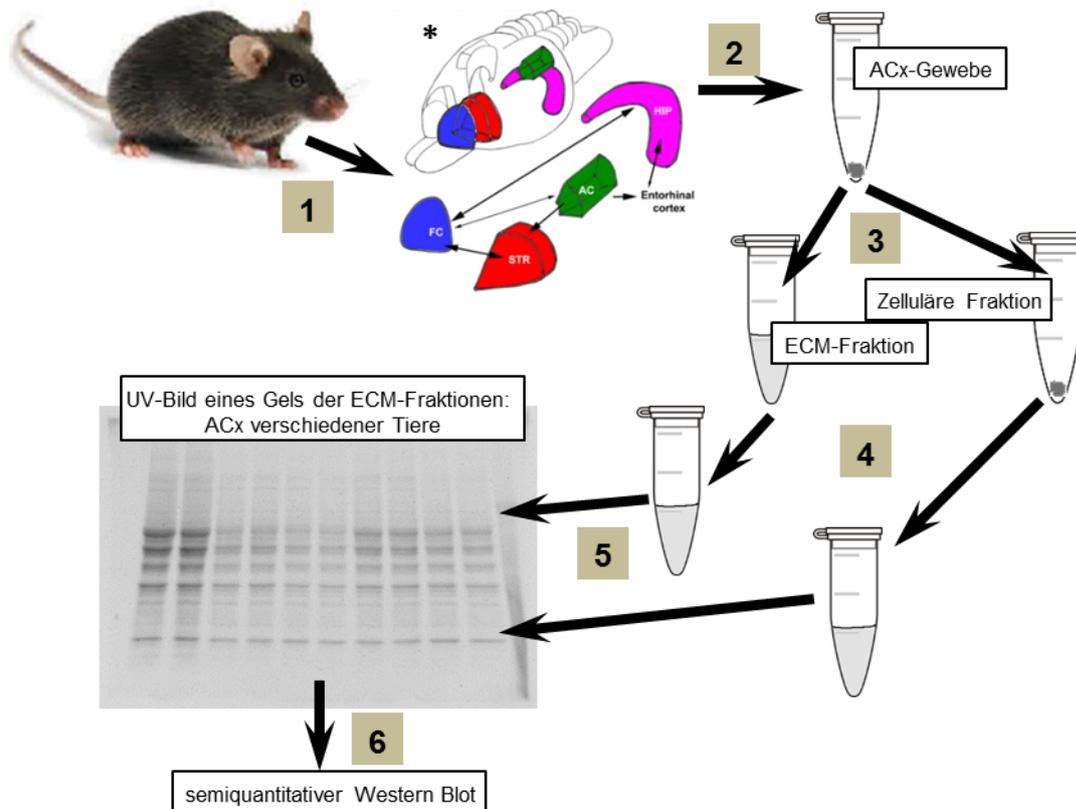


Abbildung 2.5 – **Der Weg vom trainierten Tier bis zur Protein-Gelelektrophorese.** Allen trainierten Tieren wurde nach dem Training das Gehirn entnommen (1) und die vier gezeigten Gewebe (ACx, CA, Striatum, PFC) herauspräpariert (* Kähne et al., 2016). Diese Gewebe sind bis zur Verwendung eingefroren in Eppendorfgefäßen bei -80°C gelagert worden (2). Die Proben wurden während der Aufarbeitung in eine ECM-Fraktion und eine zelluläre Fraktion getrennt (3). Alle Proben wurden entsprechend ihrer Gewichte in SDS-Puffer denaturiert (4). Entsprechende Mengen der Proben wurden auf 5-20%ige Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gradientengele aufgetragen, getrennt und mithilfe des im Gel enthaltenen und durch UV-Licht aktivierbaren Farbstoffes 2,2,2-Trichlorethanol sichtbar gemacht (5). Der aktivierte und damit an die Proteine gebundene Farbstoff wurde anschließend mit auf den Blot übertragen (6) und zur Quantifizierung der Proteingesamtmenge auf dem Blot herangezogen (Details siehe Text und Abb. 2.6).

sprechenden Blots erzeugt (INTAS ECL CHEMOCAM IMAGER), die zur späteren Proteinmengenbestimmung für jede Probe auf dem Blot herangezogen wurden (siehe dazu Abb. 2.6 A).

2.3.3 Fluoreszenzanalyse der Western Blots

Die PVDF-Membranen der Blots wurden auf die Größe der lichtdichten Boxen zugeschnitten und kurz in TWEEN 20-haltiger Tris gepufferte Salzlösung (TBS-T) gespült. Zur Reduktion von Hintergrundfluoreszenz erfolgte ein 45-minütiger Blockschritt in 5%igem Rinderserumalbumin (BSA in TBS-T, RT; vgl. Tab. C.4), um alle unspezifischen freien Bindungsstellen auf der PVDF-Membran mit BSA abzusättigen. Nach dieser Inkubation wurden die Blots kurz mit TBS-T gespült und mit primärer Antikörperlösung (ms α BC 1:1000, BD Transduction Laboratories™, Kat.Nr. 610894; gt α TNR 1:200, Santa Cruz (E - 18), Kat.Nr. sc-9875; jeweils in TBS-T + 2 % BSA) über Nacht bei 4°C überschichtet. Am Folgetag wurde 3x 10 min mit TBS-T gespült und mit dem fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörper (Donkey (do) α ms Alexafluor-680 nm, do α gt Alexafluor-800 nm, jeweils in TBS-T 1:15000) für 45 min bei RT inkubiert, anschließend gespült (3x TBS-T für 10 min, 1x TBS-T für 20 min, 1x Tris gepufferte Salzlösung, TBS; vgl. Tab. C.4) und der Blot am Scanner (Li-COR, Odyssey) entwickelt. Die Ermittlung der Grauwerte, als Maß für die nachweisbare Menge an spezifisch markierten Banden im Blot (Abb. 2.6 B) erfolgte mit Hilfe von ImageJ (Bildbearbeitungs- und Auswertungssoftware).

Der von uns verwendete primäre Antikörper gegen Brevican bindet am N-Terminus des Brevican-Moleküls. Die Schnittstelle, der im Lernprozess möglicherweise involvierten Protease für Brevican (ADAMTS-4/5), liegt in der lang gestreckten verbindenden Domäne des Brevican-Moleküls (siehe Abb. 1 (a) in [Valenzuela et al., 2014](#)). Mit demselben Antikörper kann also das Vollängenprotein, als auch das N-terminale Fragment nachgewiesen werden, da nach der lernabhängigen Proteolyse von Brevican durch ADAMTS-4/5 das Epitop nicht zerstört ist. Für TNR ist mit den von uns verwendeten Antikörpern nur das Vollängenprotein mit Sicherheit nachweisbar.

2.3.4 Semiquantitative Auswertung der Western Blots

Für alle sqWB wurden die spezifisch gefärbten Banden aller aufgetragenen Proben parallel über den jeweiligen Blot in ImageJ markiert und deren Grauwert als Fläche unter dem Grafen für jede Probenspur abzüglich des Hintergrunds bestimmt (vgl. Abb. 2.6 B, z. B. 145 kDa-Banden aller Probenspuren). Es wurde ebenfalls eine Grauwertbestimmung der UV-Aufnahmen desselben Blots für jeweils die kom-

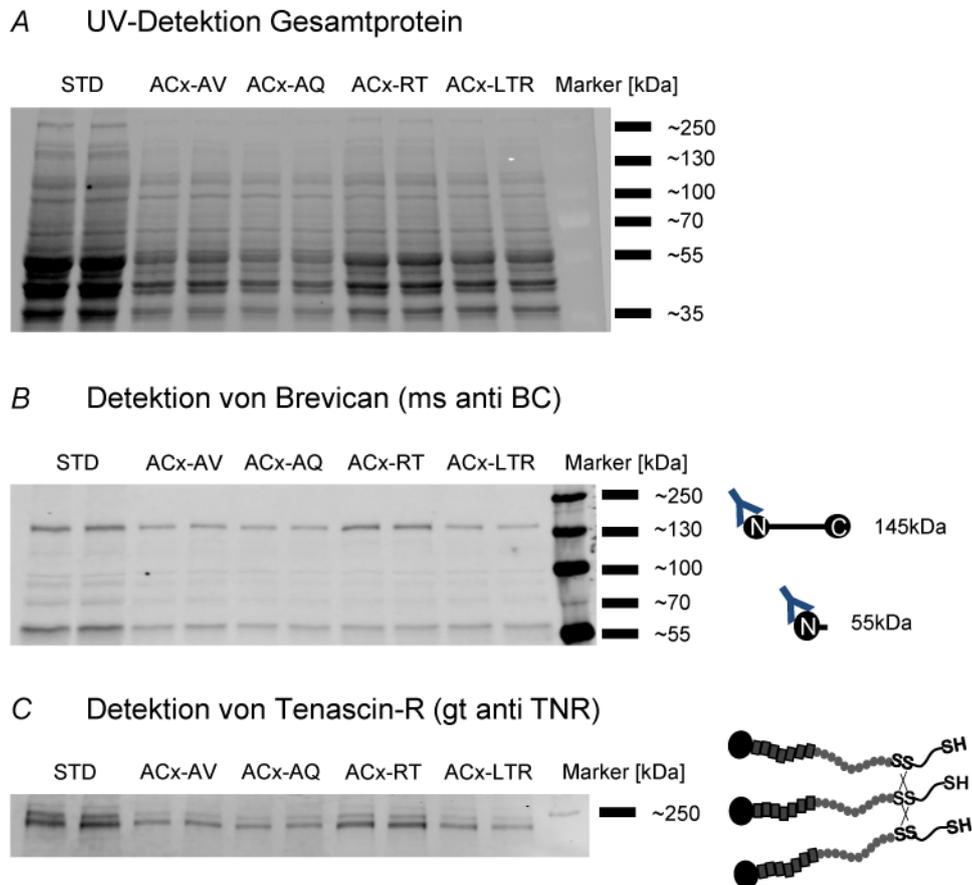


Abbildung 2.6 – **Repräsentatives Beispiel eines Western Blot der ECM-Fraktion der auditorischen Kortizes von Mäusen in unterschiedlichen Lernphasen.** Alle Aufnahmen zeigen denselben Blot mit doppelter Auftragung aller Proben der auditorischen Kortizes jeweils eines AV-, AQ-, RT- und LTR-Tieres. Der aufgetragene Standard (STD) diente zur Normalisierung aller Blots untereinander und bestand aus der ECM-Fraktion zweier Kompletthirne ohne Cerebellum und Riechhirn naiver Mäuse. In (A) ist der Gesamtproteinauftrag jeder Probe durch eine UV-Aufnahme des Blots gezeigt, der aus dem Gel aus Abbildung 3 entstand. Diese Aufnahme diente zur Quantifizierung der Gesamtproteinmenge jeder aufgetrennten Probe und somit auch der Fluoreszenzsignale der Einzelproteine jeder Probe. In (B) ist der Nachweis von Brevican als Volllängenprotein (~145 kDa) und proteolytisches Fragment (~55 kDa), sowie die drei charakteristischen Banden des Volllängenproteins von TNR (C) gezeigt. Die Piktogramme rechts zeigen die Proteine, wie sie in ihren spezifischen Banden des Blots vorliegen. Das Y in den Piktogrammen in (B) zeigt schematisiert den Antikörper und dessen Bindestelle am Brevican. Die Proteine wurden mittels spezifischer Antikörper und Fluoreszenzdetektion nachgewiesen. Details siehe Text. TNR ist selbst unter reduzierenden Bedingungen nicht vollständig zu denaturieren (Woodworth et al., 2004), deshalb wurden die drei Banden gemeinsam ausgewertet. Das Piktogramm in (C) zeigt das kovalent verbundene Protein.

pletten Probenspuren, inklusive der nur mit SDS-Puffer gefüllten Spur, als Hintergrundspur durchgeführt, um Unterschiede in der Proteinbeladung zu detektieren. Der Proteinladefaktor wurde für jede Protein tragende Spur gegen die Hintergrundspur korrigiert. Für die spezifischen Proteinbanden wurde jede Laufspur gegen den Ladefaktor (aus UV-Bild 2.6 A bestimmt) korrigiert. Jedes spezifische Proteinbandenpaar aus der doppelten Auftragung wurde dann gegen den Mittelwert derselben spez. Proteinbanden der STD-Laufspuren normalisiert, wobei der STD als Eins gesetzt wurde.

Für die Darstellung der absoluten Grauwerte für die betrachteten spezifischen Brevican- und TNR-Färbungen (Abb. 3.5, 3.7 A+B) wurden die Einzelwerte aller Gruppen gegen den Mittelwert der naiven Gruppe für die spezifischen Banden als Normalisierung durchgeführt. Des Weiteren war von Interesse, die relative Verteilung der Anteile der betrachteten Proteine nach Vollängenprotein und proteolytischem Fragment (Brevican) bzw. nach Anteilen zwischen zellulärer Fraktion und ECM-Fraktion (Brevican und TNR) zu quantifizieren.

Dazu wurden zunächst für alle Brevican- und TNR-Signale die prozentualen Anteile am jeweils zu betrachtenden Gesamtprotein nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{Anteil}[\%] = \frac{(\text{Prot. A} * 100)}{(\text{Prot. A} + \text{Prot. B})}$$

Für Brevican wurden die relativen Anteile an Vollängenprotein (Prot. A = 145 kDa) gegenüber dem proteolytischen Fragment (Prot. B = 55 kDa) für beide Fraktionen betrachtet. Für Brevican, wie TNR wurde die Verteilung zwischen ECM-Fraktion (Bsp: Prot. A = 145 kDa ECM-Fraktion) und zellulärer Fraktion (Bsp: Prot. A = 145 kDa zelluläre Fraktion) betrachtet. Dazu wurde jeweils die Differenz der beiden prozentualen Anteile bestimmt, um den relativen Überschuss eines der beiden Proteine zu bewerten. Für beide Brevican-Moleküle ergibt sich daraus je Fraktion:

$$\text{Differenz}[\%] = \text{Prot. A} - \text{Prot. B}$$

Für den Vergleich der gleichen Proteine in beiden Fraktionen:

$$\text{Differenz}[\%] = \text{Prot. A}(\text{Fraktion A}) - \text{Prot. A}(\text{Fraktion B})$$

Die Darstellung der ermittelten Werte und deren statistische Analyse erfolgten mit GraphPad Prism 6.

2.4 Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemische Untersuchung der ECM-Degradation wurden naive Tiere auf einer Seite mit 0,9 %iger physiologischer Kochsalzlösung und auf der anderen Seite mit HYase in die ACx injiziert. Zu bestimmten Zeitpunkten (3, 5, 7, 9, 12/13 Tage) nach der Injektion unter tiefer Anästhesie (Isofluran) dekapitiert, die Gehirne entnommen und über flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Aufarbeitung lagen die Gehirne in einer -80 °C-Truhe. Es wurden von den Gehirnen koronare Schnittserien (40 µm Schnittdicke) mit einem Gefriermikrotom über den Bereich des ACx hinaus angefertigt. Diese auf gekühlten gelatinierten Objektträgern aufgenommenen und mit Handwärme angeschmolzenen Schnitte wurden anschließend bis zur immunhistochemischen Färbung ebenfalls unter -80 °C-Bedingungen gelagert. Es wurden etwa äquidistante Objektträger für die Färbung ausgewählt. Für die endgültige Fixierung der Schnitte auf dem Objektträger wurden diese aufgetaut und solange gewartet, bis die Schnitte ausreichend luftgetrocknet waren. Danach wurden die Schnitte sofort für 5 Minuten in 4 % Paraformaldehydlösung (vgl. Tab. C.6) inkubiert, sowie anschließend einmal mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS; vgl. Tab. C.5) gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Wachsstift umrandet, in eine lichtdichte feuchte Kammer gelegt und mit 300 µl Blocklösung je Schnitt (10 % BSA in 1x PBS, 0,1 % Glycerin, 0,1 % TritonX-100) für 30-45 Minuten inkubiert, um alle unspezifischen Bindungsstellen auf den Schnitten zu blockieren. Anschließend wurden die Schnitte jeweils mit 300 µl primärer Antikörperlösung (Blocklösung + primäre AK) überschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS für 15 Minuten im Dunklen wurden die Schnitte mit den sekundären Antikörperlösungen (AK in Blocklösung) für 1-2 h bei Raumtemperatur in der dunklen feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS im Dunklen wurden die Schnitte eingedeckt (Vectorshield Eindeckmedium mit DAPI) und eine Stunde später mit Nagellack die Übergänge vom Deckglas zum Objektträger versiegelt. Die Lagerung bis zur mikroskopischen Aufnahme erfolgte bei 4 °C im Dunklen. Die verwendeten primären sowie sekundären Antikörperverdünnungen waren: Meerschweinchen anti Brevican (gp α BC, eigene Herstellung; 1:500), Kaninchen anti Aggrecan (rb α Agg, Millipore, Cat.Nr. AB1031; 1:200) und *Wisteria Floribunda* Agglutinin gekoppelt mit Fluorescein Isothiocyanat (WFA, Vector Laboratories, CAS [27072-45-3]; 1:100), sowie Ziege (gt) α gp Cy5 (Abcam, ab102472; 1:1000) und gt α rb Cy3 (Dianova, 111-165-144; 1:1000).

2.5 Mikroskopische Aufnahmen

Von den gefärbten Schnitten wurden mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss Axio Imager.A2) mit 2,5 fach Objektiv (Plan NEOFLUCAR 2,5x/0,07 ∞ /0,17) und geeigneter Anregungswellenlänge Aufnahmen im UV, grünen, roten und infraroten Wellenlängenbereich erstellt. Aus diesen Aufnahmen wurden anschließend am Computer, mithilfe von Bildverarbeitungssoftware (ImageJ, Photoshop CS3) die Gesamtansichten der Schnitte rekonstruiert und anschließend die Grauwerte verschiedener Areale (ACx, CC, CA) mit ImageJ bestimmt (vgl. Abb. 3.2, 3.10).

2.6 Statistische Auswertung

Alle zur Auswertung notwendigen Berechnungen, sowie die Darstellungen der Ergebnisse erfolgten mit Microsoft Excel, GraphPad Prism 6, Adobe Illustrator CS3 und Matlab. Für paarweise Vergleiche einzelner Gruppen (z. B. CR-Raten innerhalb eines Trainingstages, histologischer Vergleich injizierter Seiten innerhalb eines Schnittes) wurde ein zweiseitiger t-Test verwendet. Gruppenvergleiche wurden mittels Varianzanalysen ohne wiederholte Messungen (ANOVA) durchgeführt. Für die Vergleiche der sqWB wurden One-Way-ANOVAs herangezogen, da hier die Werte je Tier und Gruppe nur einmal aus einer doppelten Auftragung bestimmt wurden. Für die Verhaltensanalysen wurden Two-Way-ANOVAs für den Vergleich der trainierten Tiergruppen verwendet. Der statistische Parameter „Gruppe“ für jeden der Trainingsparameter war dabei der Vergleich der letzten drei Trainingssitzungen beider Tiergruppen. Für den statistischen Parameter „Phase“ wurden für jeden Trainingsparameter die initiale Lernphase bzw. der Langzeitabruf (LTR, aus dem Englischen *long-term retrieval*) beider Tiergruppen verwendet. Um signifikante Unterschiede zwischen Trainingsparametern der Tiergruppen als auch biochemische Unterschiede festzustellen, wurden Posthoc-Tests jeweils mittels eines multiplen Vergleichstests nach Šídák durchgeführt (GraphPad Prism 6). Das Signifikanzniveau aller Primärtests wurde mit $\alpha = 0,05$ bestimmt.

Kapitel 3

Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit hat den Einfluss der Extrazellulären Matrix auf einen hoch kortexabhängigen Lernprozess thematisiert. Dazu wurden drei aufeinander aufbauende Experimentalansätze verfolgt. Im ersten Teil ist der Einfluss der ECM in einem Umlernparadigma einer FM-Diskrimination mit aktivem Vermeidungslernen, kombiniert mit der Degradation der ECM in beiden auditorischen Kortizes von Gerbils, untersucht worden. Der zweite Ansatz untersuchte die intrinsischen Veränderungen der ECM während des primären Erlernens und späteren Abrufens des vergleichbaren Paradigmas in Mäusen, mittels sqWB-Analyse. Hierzu wurden Hirngewebe in bestimmten Lernphasen entnommen und proteinbiochemisch untersucht. Im dritten Ansatz wurde speziell der Langzeitabruf des erlernten FM-Diskriminationsparadigmas in Mäusen untersucht. Hierbei lag der Fokus auf dem Einfluss der Degradation der ECM in den ACx der Tiere vor Beginn der initialen Trainings und dessen Einfluss auf den Langzeitabruf. Die experimentelle Degradation der ECM in den beiden Studien wurde mithilfe immunhistologischer Färbung quantifiziert.

3.1 ECM-Degradation während aktiven Vermeidungslernens und Umlernen

In Vorarbeiten zur vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das Umlernverhalten in einem FM-Diskriminationsparadigma von Gerbils signifikant durch ECM-Degradierung in der Hörrinde beeinflussen lässt. Dazu wurden Tiere trainiert, die Modulationsrichtung zweier FM-Töne desselben Frequenzraumes (2–4 kHz vs. 4–2 kHz) in einem Go/NoGo-Shuttlebox-Paradigma zu diskriminieren. Nach erfolgreich erlernter Diskrimination nach 7 Trainingstagen (Phase 1) wurden die Tiere in der Folge durch einen Kontingenzwechsel der FM-Tonreize zum Umlernen der entsprechend zuvor erlernten Bedeutung trainiert (Phase 2). Zwischen beiden Trainingsphasen wurden in zwei verschiedenen Gruppen

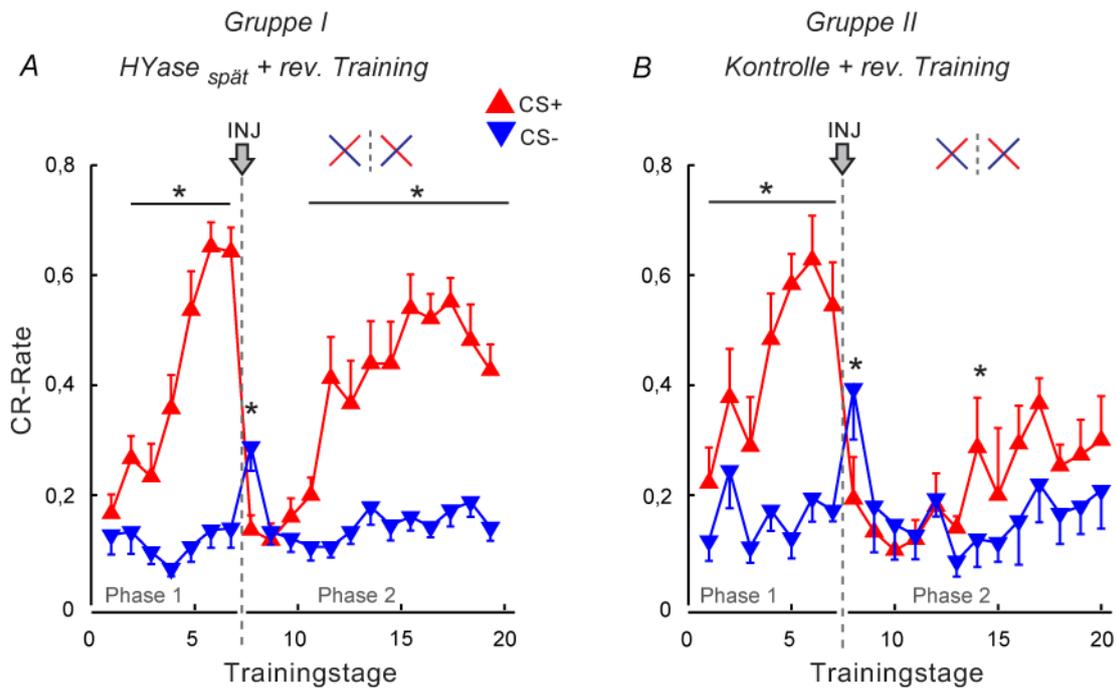


Abbildung 3.1 – **Lernkurven von Gerbils trainiert in einem FM-Diskriminationsparadigma.** Gezeigt sind die konditionierten Reaktionsraten auf ansteigende und abfallende FM-Töne zweier Gruppen trainierter Tiere. Die Farbgebung der schematisch skizzierten FM-Töne und der Lernkurven korrespondiert mit der Kontingenz (rot = Go-Stimulus, blau = NoGo-Stimulus). Beide Gruppen lernten die Diskrimination ähnlich gut bis in die RT-Phase. Nach 7 Tagen wurde den Tieren in (A) Hyaluronidase-lösung bzw. in (B) 0,9%ige Kochsalzlösung bilateral in den ACx injiziert. Anschließend wurden sie mit den physikalisch gleichen Reizen in umgekehrter Bedeutung während des Trainings konfrontiert. Die Tiere der Testgruppe (A) zeigten in der ersten Sitzung nach der OP weniger vorerfahrungsbedingte Fehler auf den nun neuen NoGo-Reiz und konnten die umgekehrte Bedeutung der physikalisch gleichen Reize innerhalb der Beobachtungszeit bis in einen Leistungsbereich vergleichbar mit dem Antraining umlernen. Die Kontrollgruppe (B) adaptierte das erlernte Verhalten in der ersten Sitzung nach der OP nicht so stark und erreichte auch im Beobachtungszeitraum keine signifikante Umlernleistung. Modifiziert nach [Happel et al. \(2014b\)](#).

bilateral in den ACx entweder HYase oder 0,9%ige Kochsalzlösung (Kontrolle) injiziert.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die HYase-injizierte Gruppe in der Lage war, die Umlernaufgabe zu bewältigen, wogegen die Kontrollgruppe dies nicht oder nur signifikant schlechter leisten konnte (Abb. 3.1, modifiziert nach [Happel et al., 2014b](#)). Gezeigt werden konnte auch, dass es sich tatsächlich um ein Umlernen und kein Neulernen nach potenzieller Auslöschung durch den ECM-Verdau handelt, da die Tiere einer weiteren Kontrollgruppe nach Anlernen und anschließender HYase-Injektion in der Lage waren, das Erlernte ohne signifikanten Leistungseinbruch weiter abzurufen (siehe [Happel et al., 2014b](#); Abb. 1 D). Auch

hatte die Injektion des Enzyms keinen Einfluss auf das initiale Akquisitionslernen der Tiere an sich.

Tiere, die direkt vor dem Antraining mit HYase injiziert wurden, zeigten weder einen statistisch signifikanten Unterschied im Erlernen des Paradigmas, noch waren sie dann aber 9 Tage nach Injektion in Phase 2 besser im Umlernen der Kontingenzzumkehr, als die Kochsalzinjizierte Kontrollgruppe (vgl. [Happel et al., 2014b](#); Abb 1 C).

In diesen Experimenten konnte also nachweislich das Umlernen der Bedeutungskontingenz einer hoch kortexabhängigen FM-Diskrimination durch bilaterale, kortikale HYase-Injektion verbessert werden. Welche expliziten Auswirkungen die Injektion der HYase im ACx jedoch auf zellulär-struktureller Ebene hatte, blieb zunächst unklar.

Zur exakten Interpretation der Befunde dieser Vorarbeiten war es nötig, die räumliche Ausdehnung der Degradation der ECM, sowie den zeitlichen Verlauf der Rekonstitution, zu quantifizieren. So war es beispielsweise wichtig, die Ausdehnung der Degradation in Richtung auf den Hippocampus und den umgebenen Kortexarealen zu falsifizieren. Dazu wurde bei naiven Tieren unilateral in den ACx das Enzym HYase und auf der anderen Seite 0,9 %ige Kochsalzlösung injiziert. Die Tiere wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der OP getötet und die Hirne anschließend immunhistochemisch analysiert (siehe Material und Methoden, Abschnitt 2.4). In den 40 µm dicken Frontalschnitten der Hirne wurden Proteoglykane mit fluoreszenzmarkiertem WFA angefärbt. Die Fluoreszenz wurde immer relativ zur Kontrollseite bestimmt. Das Ergebnis zeigte eine signifikante Reduktion der WFA-Fluoreszenz in der HYase-injizierten Hemisphäre um etwa 60 - 65 % im Vergleich zur Kontrollseite über einen Zeitraum von etwa 7 Tagen nach der Injektion. An Tag 9 nach Injektion ist ein Anstieg der WFA-Fluoreszenz auf etwa 50 % zu verzeichnen, gefolgt von einem Anstieg auf ein nicht mehr signifikant verschiedenes Niveau von etwa 80 % zwischen den Hemisphären an Tag 13 (Abb. 3.2 C).

Bringt man die immunhistochemischen Befunde der ECM-Degradation mit den Verhaltensexperimenten zusammen, so wird deutlich, dass die lokale Reduktion der ECM, welche sich auf den ACx begrenzt und über etwa 9 Tage erstreckt, das Umlernverhalten verbessert hat. Die Tiere der Gruppe mit HYase-Injektion zwischen Phase 1 und der entsprechenden Phase 2 starteten zwei Tage nach der ersten Injektion mit dem ersten Umlerntraining (Abb. 3.1 A). Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass sie über den Zeitbereich von etwa 7 Tagen während des Umkehrlernens eine Reduktion der ECM im ACx hatten. Im Mittel haben die Tiere etwa an Tag 4 - 5 des Umkehrlernens die korrekte Diskrimination der beiden Reize erlernt (vgl. Abb. 3 B aus [Happel et al., 2014b](#)). Des Weiteren ist zu beachten, dass

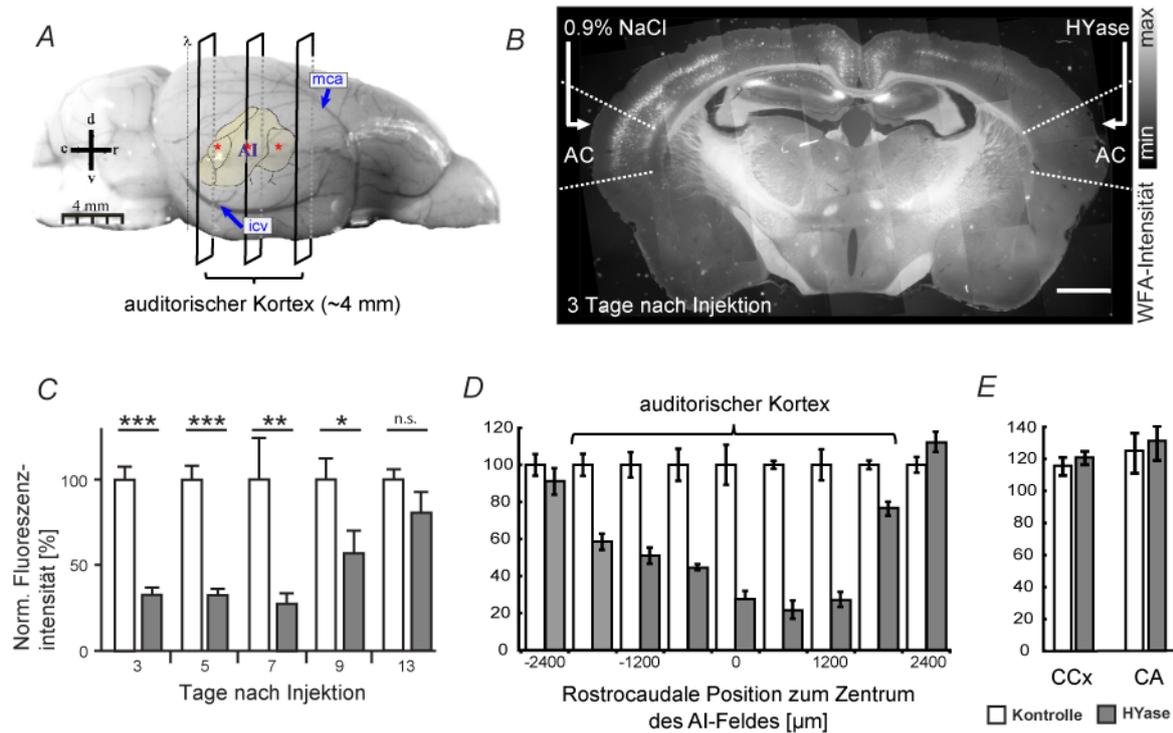


Abbildung 3.2 – **Histologische Analyse der zeitlichen und räumlichen Ausdehnung der ECM-Degradation bei Gerbils.** Gezeigt ist in (A) die seitliche Ansicht eines Gerbilgehirns inklusive der schematischen anatomischen Ortsangabe des auditorischen Kortex (gelb hinterlegte Fläche) und der Injektionsstellen (rote *). Die Rechtecke zeigen die schematischen Schnittebenen für die Quantifizierung der ECM-Degradation über den gesamten Bereich des ACx. (B) zeigt einen repräsentativen koronaren Schnitt durch ein Gerbilgehirn an Tag 3 nach Injektion von 0,9%iger Kochsalzlösung in den ACx der linken Hemisphäre und HYase in der rechten Hemisphäre. In (C - E) ist die Quantifizierung der Immunfluoreszenz der Schnitte (vgl. B) über das Zeitintervall von 13 Tagen (C), sowie die rostrocaudale Ausdehnung über den ACx (D), für den Cingulären Kortex (CCx) und den Hippocampus (CA) zu sehen (E). Verändert nach [Happel et al. \(2014b\)](#).

in der Gruppe, welche eine initiale Behandlung mit HYase vor dem ersten Akquisitionstraining erhalten hatte, die Injektion bereits 11 Tage her war, bevor die Tiere in Phase 2 auf die Kontingenzumkehr trainiert wurden (vgl. Abb. 1 C aus [Happel et al., 2014b](#)).

Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass flexibles Umlernen einer signifikanten Reduktion der ECM bedarf und die Rekonstitution der ECM in dieser Tiergruppe somit schon zu weit fortgeschritten war, was entsprechend die Verhaltensanpassung limitiert hat. Zusammenfassend konnten wir in dieser Verhaltensstudie erstmalig zeigen, dass ein experimentell erzeugter und lokal begrenzter, enzymatischer Abbau von ECM-Molekülen im primär sensorischen ACx die kognitive Flexibilität, welche in anspruchsvollen Umlernprozessen nötig ist, innerhalb eines ge-

benen Zeitfensters signifikant verbessert. Aus diesen Befunden ergab sich nun die Frage, ob im adulten Gehirn die Modulation der ECM ebenfalls als intrinsischer Mechanismus zur Realisierung von lernabhängigen, plastischen Reorganisationsprozessen nachweisbar ist?

3.2 Intrinsische Änderungen der ECM während aktiven Vermeidungslernens in Mäusen

Um diese Fragestellung einer intrinsischen Modulation der ECM im Zuge kognitiven Lernverhaltens zu untersuchen, eignet sich das biochemisch besser charakterisierte Nagetiermodell der Maus (C57Bl6/NCrl). Es existieren Antikörper zur spezifischen Detektion einzelner ECM-Moleküle in proteinbiochemischen Verfahren. Um das Lernverhalten der FM-Diskrimination mit den Ergebnissen aus der ersten Studie vergleichen zu können, wurde das Trainingsparadigma für das Training der Mäuse leicht abgewandelt und adaptiert (siehe Material und Methoden, Abschnitt 2.1).

In den Verhaltensanalysen wurden die Reaktionen der Tiere auf Go- bzw. NoGo-Stimuli sowie die Spontansprünge zwischen den Trials erfasst und der korrespondierende Sensitivitätsindex D-Prime (d') berechnet (Abb. 3.3). Basierend auf diesen Parametern wurden unterschiedliche Phasen des Lernverhaltens bestimmt. Jedes Individuum durchläuft verschiedene Phasen beim Erlernen der Diskrimination. Wenn die Tiere das erste Mal in der Shuttlebox trainiert werden, ist der Kontext komplett neu und die Tiere hören zum ersten Mal die beiden FM-Töne (Abb. 3.3). Sobald im ersten Training erstmalig der milde elektrische Fußreiz präsentiert wird, ist die Fluchtstrategie die einfachste und somit erste Strategie der Tiere. Hierbei lernen die Tiere das Kompartiment zu wechseln, sobald der Fußreiz bemerkt wird, was zunächst unabhängig von den FM-Tönen passiert, die als zu konditionierende Stimuli fungieren. Innerhalb der ersten Versuchsdurchläufe beginnen die Tiere dann die präsentierten Töne generell als Prädiktor des folgenden milden Fußreizes zu assoziieren und reduzieren entsprechend ihre Reaktionszeiten auf unter 1 s nach Beginn des Fußreizes (siehe Abb. 2.1). In einer sich darauf anschließenden Folge beginnen die Tiere dann mit einer Ausweichstrategie (AV, aus dem Englischen "*avoidance*"), in dem sie als Reaktion auf den konditionierten Stimulus eine konditionierte Reaktion, also das Überqueren der Hürde, zeigen. Dies fand in den meisten Fällen zunächst unspezifisch auf jeden Tonreiz, also Go- und NoGo-Reize, statt, obwohl den Tieren in den NoGo-Durchläufen zuvor kein Fußreiz präsentiert wurde.

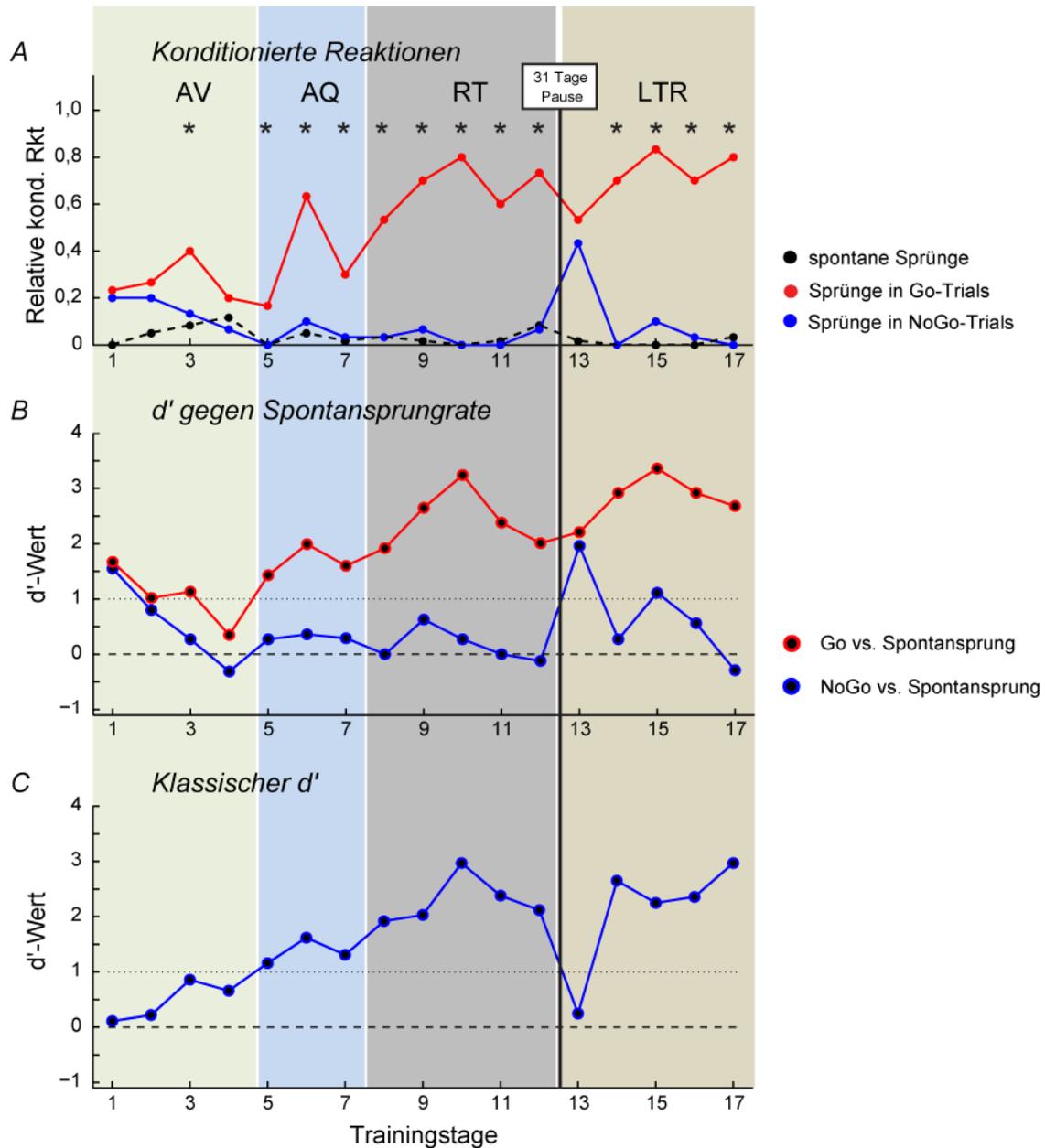


Abbildung 3.3 – **Repräsentatives Beispiel eines in FM-Diskrimination trainierten Tieres, mit Erläuterung der Lernparameter.** In dieser Abbildung ist die Lernleistung eines repräsentativen Tieres mit den unterschiedlichen Lernphasen (AV; AQ; RT; LTR) und Lernparametern über 17 Trainingstage inklusive einer Trainingspause dargestellt. In (A) ist die relative konditionierte Reaktion (rot: Hits, blau: FA, schwarz: Spontansprünge), in (B) die Sensitivitätsindizes d' gegen die Spontansprünge und in (C) der klassische d' -Wert gezeigt. Details siehe Text.

Das Lernniveau AV wurde in den Trainings als erreicht definiert, wenn das Tier signifikant häufiger auf den Go-Stimulus über die Hürde sprang, als spontan zwischen den einzelnen Trials (Zufallssprunglevel). Um dies festzulegen, wurde der d' -Wert zwischen Go-Reaktion und der gemittelten Spontansprungrate (ITS) über die gesamte tägliche Trainingszeit berechnet. Der d' -Wert ist definiert als die Differenz der z-transformierten Werte für den Go-Stimulus und der Spontansprungrate. Als zu erreichender Schwellenwert für das AV-Kriterium wurde $d' > 1$ gewählt (Abb. 3.3 B, rot). In dieser Phase wechseln die Tiere wie beschrieben auch auf NoGo-Stimuli hin das Kompartiment und perzipieren dort den aversiven Fehlerreiz auf der anderen Seite der Shuttlebox. Aufgrund aktiver Inhibition des Sprungverhaltens auf die NoGo-Stimuli erfolgt die Reaktion auf diese Töne innerhalb des Entscheidungsfensters (6 s) immer später und wird schließlich inhibiert. Der Moment, an dem sie anfangen signifikant häufiger auf den Go-Stimulus die Hürde zu überqueren, als auf den NoGo-Stimulus und der $d' > 1$ (berechnet aus Go- und NoGo-Sprungrate) ist, wird als Beginn einer signifikanten FM-Diskrimination angenommen. Die ersten drei Trainingssitzungen, welche konstant diesem Kriterium entsprechen, bezeichnen wir als Akquisitionsphase (AQ), beispielhaft gezeigt in Abb. 3.3 A und C (Tage 5 - 7). Dass die Tiere sich in der aufsteigenden Anlernphase der Diskrimination befinden, wird an der sich weiter steigenden Diskriminationsleistung deutlich. So zeigt Abb. 3.3 exemplarisch die größer werdenden Unterschiede zwischen Go- und NoGo-Reaktionen (Abb. 3.3 A) und einen entsprechend höheren d' -Wert (Abb. 3.3 C) über die Folgetage nach der AQ-Phase hinweg. Nachfolgend erreichen sie ein Lernplateau, was als reines Abrufverhalten (RT; aus dem Englischen "retrieval") gewertet wird (Abb. 3.3 A, C, Tage 8 - 12). In die Analysen wurde auch noch das LTR inkludiert (vgl. Abb. 3.3 A, C, Tag 13 - 17). Diese Gruppe Tiere absolvierte das Training über den Zeitraum von 10 - 12 Tagen erfolgreich, bis sie mindestens zweimal in Folge die RT-Phase erreichten. Anschließend verbrachten sie etwa vier Wochen ohne Training im Haltungskäfig und musste darauf folgend für fünf weitere Tage das erlernte Diskriminationsverhalten erneut in der Shuttlebox abrufen (komplettes Bsp. siehe Abb. 3.3).

Für die biochemischen Analysen mithilfe sqWB wurden folgende Trainingsgruppen definiert und trainiert (Abb. 3.4). Die AV-Gruppe enthält nur Tiere, die innerhalb von maximal vier aufeinanderfolgenden Versuchstagen zweimal in Folge das Trainingskriterium AV und entsprechend keine signifikante Unterscheidung der beiden Tonreize erreicht haben (vgl. oben, Abb. 3.3, 3.4). Für die AQ-Gruppe wurden nur Tiere verwendet, die an drei aufeinanderfolgenden Versuchstagen das Kriterium AQ erreichten und die RT-Gruppe beinhaltet nur Tiere, die anschließend

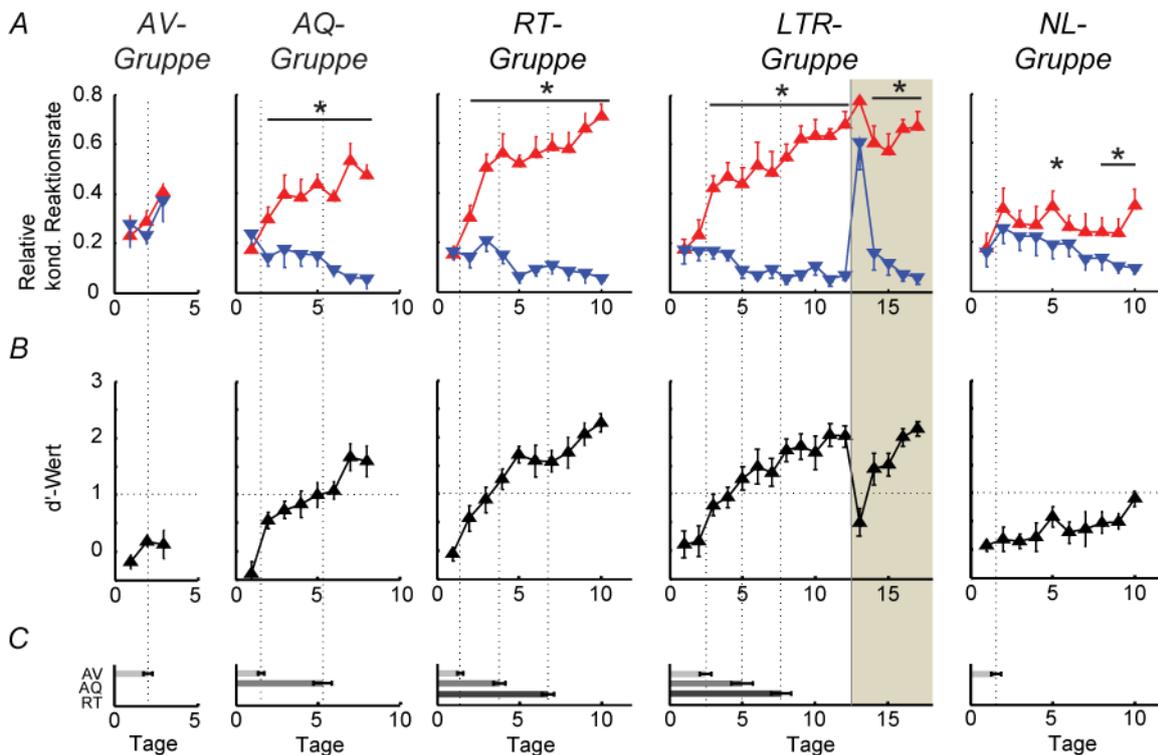


Abbildung 3.4 – **Trainingsgruppen biochemisch mittels semiquantitativem Western Blot analysierter Tiere.** Gezeigt sind die mittleren Lernkurven von 47 Tieren ($n=8$ für AV, AQ, RT und LTR; $n=7$ für NL), deren ACx anschließend durch sqWB analysiert wurden. Dargestellt sind Hit-Rate (rot), FA-Rate (blau) und d' -Werte (schwarz) als Gruppenmittelwerte jeder Trainingsgruppe (* gepaarter t -Test zwischen Hit und FA-Rate an individuellem Versuchstag; $P < 0,05$; vgl. Tab. A.2; CR-Raten der Einzeltiere siehe Abb. B.1). Der Beginn der Lernphasen ist durch senkrechte gestrichelte Linien abgegrenzt. Wie in den Balkendiagrammen verdeutlicht, sind keine signifikanten Unterschiede der Startpunkte aller Lernphasen zwischen den Lerngruppen vorhanden (One-Way-ANOVA $P < 0,05$; siehe Tab. A.1). Alle Daten sind als Mittelwerte (\pm SEM) angegeben und die Abkürzungen werden im weiteren Verlauf beibehalten.

mindestens zweimal in Folge auch die RT-Phase erreichten. Tiere, die nach 12 Trainingstagen nicht kontinuierlich das AQ-Niveau erreichten wurden in einer für die Biochemie notwendigen Kontrollgruppe, sog. Nichtlernergruppe (NL) zusammengefasst. Die Tiere der LTR-Gruppe zeigten am ersten Trainingstag nach der Pause ein Detektionsverhalten, das an die AV-Strategie zu Beginn des Trainings erinnert. Ab dem zweiten LTR-Versuchstag riefen sie jedoch direkt das Diskriminationsverhalten ab. Die Tiere dieser Gruppe wurden nach der LTR-Phase, wie alle Tiere dieser Teilstudie, der biochemischen Analyse zugeführt. Alle Mäuse wurden maximal 2 Stunden nach der letzten Trainingseinheit dekapitiert und die Hirnareale ACx, PFC, Striatum und CA entnommen (siehe Material und Methoden, Abschnitt 2.3). Auch eine naive Tiergruppe wurde als Kontrollgruppe präpariert. Die Verhaltensdaten aller trainierten Einzeltiere sind im Anhang (Abb. B.1) gezeigt, ebenso die

statistischen Analysen zu den Verhaltenstransitionen und signifikanter Diskrimination der FM-Töne (Tab. A.1 und A.2).

Betrachtung der absoluten Brevican-Änderungen

Die absoluten Mengen des 145 kDa-Brevican und seines 55 kDa-Fragments wurde je Probe zunächst auf den naiven Status normiert (Abb. 3.5). Im Vergleich der Tiergruppen wiesen die NL in der ECM-Fraktion signifikant weniger, etwa halb so viel des 55 kDa-Fragment auf, wie die naiven Tiere im ACx ($F_{(5,41)} = 3,433$; $P = 0,0111$; Tab. A.3). Alle anderen, in irgendeiner Weise im Diskriminationslernen befindlichen Gruppen, zeigten für das 55 kDa-Fragment keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu naiven Tieren (Abb. 3.5 A). Eine signifikante Erhöhung des Volllängenbrevicans zeigte hingegen die RT-Gruppe. Hier ergab sich ein etwa doppelt so hohes Niveau in der ECM-Fraktion, wie in der AV- und NL-Gruppe (Abb. 3.5 B; $F_{(5,41)} = 3,342$; $P = 0,0127$; Tab. A.3). In der zellulären Fraktion zeichnete sich ein anderes Bild ab. Die im Lernprozess befindlichen Tiergruppen (AV, AQ, RT, NL) zeigten ein etwa halb so hohes und signifikant verschiedenes Niveau an 55 kDa-Fragment im Vergleich zur naiven Tiergruppe und der LTR-Gruppe nach vierwöchiger Retention (Abb. 3.5 C; $F_{(5,41)} = 15,79$; $P < 0,0001$; Tab. A.4). Die Menge des Volllängenbrevicans in der zellulären Fraktion ist im Mittel zwischen den Tiergruppen nicht signifikant unterschiedlich und zeigt in etwa das gleiche Niveau (Abb. 3.5 D; $F_{(5,41)} = 1,778$; $P < 0,1388$; Tab. A.4).

Die beschriebenen extrazellulären und zellulären Änderungen von Brevican und seines geschnittenen Fragments weisen auf eine lernassoziierte Proteolyse und Synthese im ACx hin. Um Rückschlüsse über lernabhängige Verschiebungen der Verhältnisse zwischen Volllängenbrevican und seinem 55 kDa Spaltprodukt zu untersuchen, wurden weiterhin die absoluten Grauwerte beider Fragmente genutzt, um das relative Verhältnis beider in den verschiedenen Lernphasen zu vergleichen (zur Berechnung siehe Material und Methoden, Abschnitt 2.3.4; Abb. 3.6).

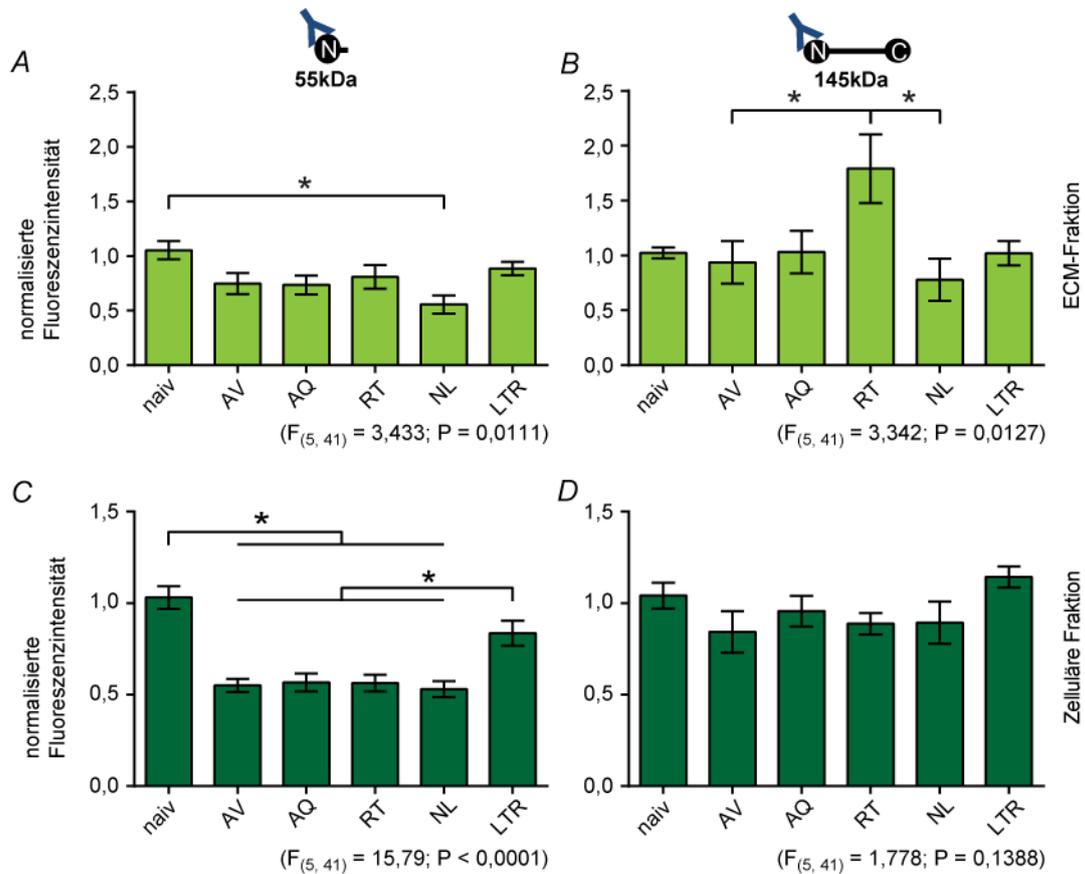


Abbildung 3.5 – Brevican-Quantifizierung des ACx in unterschiedlichen Lernphasen. Gezeigt sind die Mittelwerte der absoluten Grauwertmessungen der Fluoreszenzintensitäten der Western Blots von 47 Tieren ($n=8$ für AV, AQ, RT und LTR; $n=7$ für NL) normiert auf den Grauwert der naiven Gruppe (\pm SEM). Signifikante Unterschiede der Tiergruppen zeigen Effekte nach signifikanter One-Way-ANOVA und Posthoc-Analyse nach Šídák an (multipler Vergleichstest, * $P < 0,05$; berechnet mit GraphPad Prism 6, Details siehe Tab. A.3 und A.4). Die Teilabbildungen (A) und (C) zeigen die durch Proteolyse entstandenen 55 kDa-Spaltprodukte und die Teilabbildungen (B) und (D) die Vollängenproteine. Generell zeigt sich, dass in der ECM-Fraktion in den trainierten Gruppen tendenziell und in der NL-Gruppe signifikant ($F_{(5, 41)} = 3,433$; $P = 0,0111$) weniger 55 kDa-Fragment vorhanden ist. In der RT-Gruppe ist das 145 kDa-Brevican im Vergleich zu allen anderen Gruppen tendenziell erhöht, zu AV-Tieren und NL-Tieren zudem signifikant ($F_{(5, 41)} = 3,342$; $P = 0,0127$). Für das 55 kDa-Fragment in der zellulären Fraktion zeigen sich signifikant höhere Werte für naive und LTR-Tiere jeweils verglichen mit den initial trainierten Tieren ($F_{(5, 41)} = 15,79$; $P < 0,0001$). Das 145 kDa-Brevican zeigt keine Unterschiede zwischen allen Gruppen ($F_{(5, 41)} = 1,778$; $P = 0,1388$).

Betrachtung der relativen Brevican-Änderungen

Die naiven Tiere zeigten einen etwa 21 %igen relativen Überschuss an 55 kDa-Fragment gegenüber dem 145 kDa-Volllängenprotein in der ECM-Fraktion. In der zellulären Fraktion war der relative Überschuss etwa in gleichem Maße (24 %) in Richtung Volllängenprotein verschoben (Abb. 3.6 A). Von dieser Verschiebung in der zellulären Fraktion wichen alle im Lernprozess befindlichen Gruppen signifikant ab ($F_{(5,41)} = 6,418$; $P = 0,0002$; Tab. A.5). Die Verschiebung lag bei mindestens 40 % in Richtung des Volllängenproteins.

Der relative Überschuss an 55 kDa-Fragment in den naiven Tieren nahm in der ECM-Fraktion in den darauf folgenden Trainingsstadien hingegen schrittweise und signifikant ab. In der RT-Phase kehrte sich das Verhältnis beider Proteinanteile sogar um, sodass ein relativer Überschuss von etwa 16 % Volllängenprotein vorhanden war (Abb. 3.6 A). Die RT-Gruppe unterschied sich in der ECM-Fraktion tendenziell von allen Gruppen, signifikant von naiven Tieren mit 37 % relativem Überschuss an 145 kDa-Brevican und von im AV-Stadium befindlichen Tieren (etwa 30 % rel. Überschuss 145 kDa-Brevican), verglichen mit den jeweiligen mittleren relativen Überschusswerten der Gruppen. Auch gegenüber den LTR-Tieren (etwa 31 % rel. Überschuss 145 kDa-Brevican) und NL-Tieren (etwa 29 % rel. Überschuss 145 kDa-Brevican) wiesen sie einen signifikanten Unterschied in der ECM-Fraktion auf ($F_{(5,41)} = 4,596$; $P = 0,0020$; Tab. A.5). Die NL-Gruppe unterscheidet sich in ihrem relativen Überschuss an 55 kDa-Fragment in der ECM-Fraktion nicht signifikant gegenüber naiven Tieren, AV-, AQ- und LTR-Tieren (Abb. 3.6 A).

Des Weiteren ließen sich die Anteile an Brevican bzw. seinem Fragment in der extrazellulären Fraktion vs. der zellulären Fraktion vergleichen (Abb. 3.6 B). Hier zeigten alle Tiergruppen keine signifikanten Unterschiede ($F_{(5,41)} = 1,499$; $P = 0,2112$; Tab. A.6) bezüglich des 55 kDa-Fragmentes (im Mittel etwa 18 % rel. Überschuss intrazellulär). Das Volllängenbrevican hingegen wies eine signifikante Verschiebung in Richtung extrazellulärer Fraktion nur in der RT-Gruppe auf (rel. Überschuss in zellulärer Fraktion von 36 %). Damit unterschied sie sich tendenziell gegenüber allen anderen Tiergruppen (Mittelwert etwa 62 %), signifikant ($F_{(5,41)} = 2,957$; $P = 0,0227$; Tab. A.6) dabei gegenüber der NL- und LTR-Gruppe (66 % bzw. 65 %).

Somit bestätigten die Befunde, dass es im Zuge des erfolgreichen Lernprozesses zu einer Verschiebung der absoluten Volllängenbrevican-Level in den Extrazellulärraum kommt. Das 55 kDa-Fragment war in der intrazellulären Fraktion weniger stark nachweisbar, als in der extrazellulären Fraktion (Abb. 3.5 A, C), wohingegen das 145 kDa-Brevican in der zellulären wie extrazellulären Fraktion stabile Level in allen Tiergruppen aufwies, außer der selektiven Erhöhung in der ECM-Fraktion in der Tiergruppe mit erfolgreichem Abruf des Gelernten (RT; Abb. 3.5 B, D). Diese

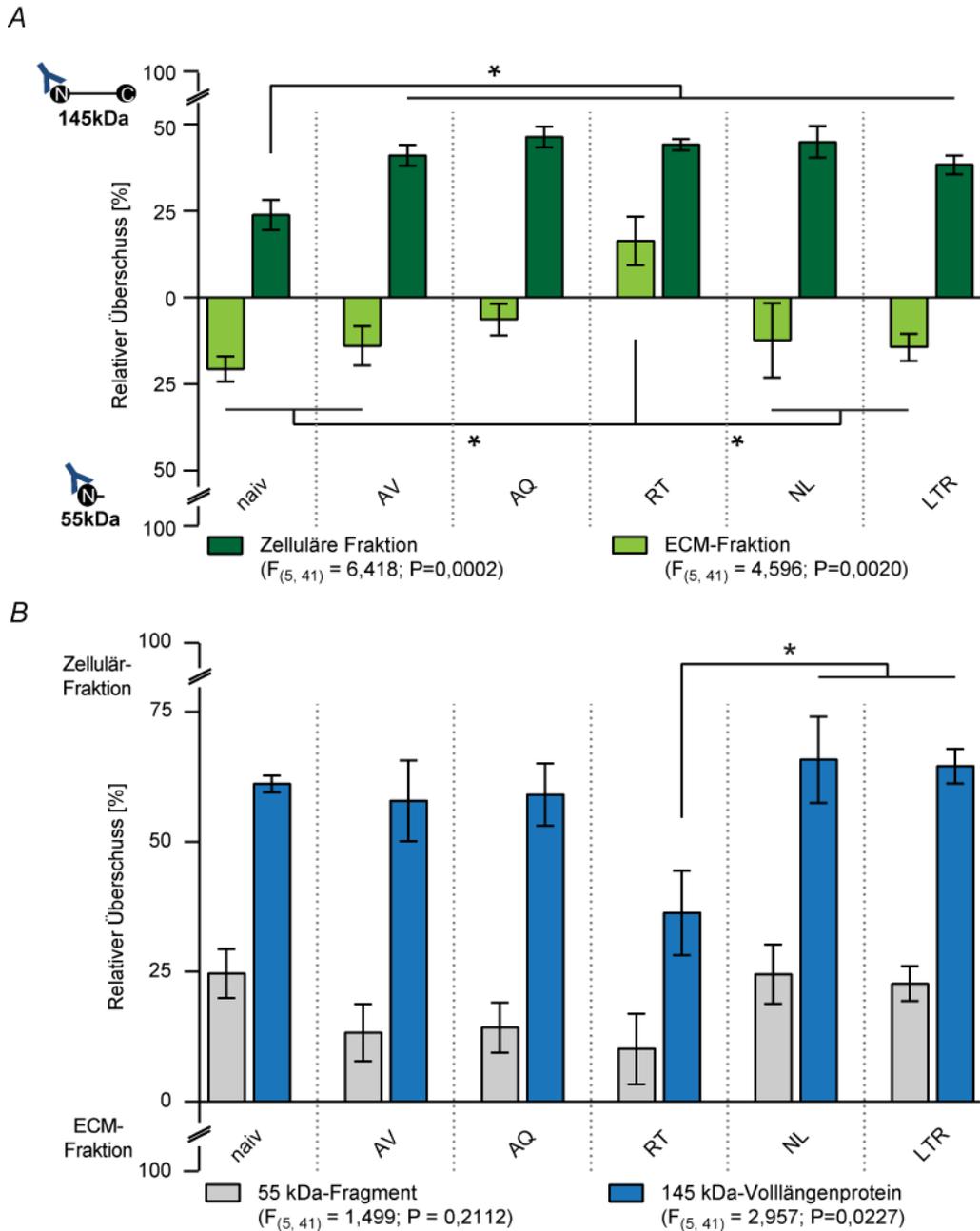


Abbildung 3.6 – Verschiebung der Brevican-Verhältnisse im ACx in unterschiedlichen Lernphasen. Gezeigt ist der relative Überschuss von Vollängenbrevican und proteolytischem Fragment am Gesamtbrevican im ACx (A) sowie der relative Überschuss an Brevican-Molekülen in zellulärer und extrazellulärer Fraktion (B), aus der Quantifizierung der Blots (47 Tiere: $n=8$ für AV, AQ, RT und LTR; $n=7$ für NL). Signifikante Posthoc-Unterschiede nach signifikanter One-Way-ANOVA sind berechnet nach Šidák (multipler Vergleichstest, *: $P < 0,05$; berechnet mit GraphPad Prism 6, Details siehe Tab. A.5 und A.6). In (A) zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Vollängenbrevicans in der zellulären Fraktion aller im Lernen befindlichen Gruppen gegenüber den naiven Tieren ($F_{(5, 41)} = 6,418$; $P = 0,0002$). In der ECM-Fraktion zeigte sich ein signifikant in Richtung Vollängenprotein verschobenes Verhältnis in der RT-Gruppe gegenüber allen anderen Tiergruppen ($F_{(5, 41)} = 4,596$; $P = 0,0020$), zu den AQ-Tieren nur tendenziell. Generell zeigte sich in (B) für beide betrachteten Brevican-Moleküle, dass sie in der intrazellulären Fraktion stärker vertreten waren als in der ECM-Fraktion. Der Überschuss an Vollängenprotein in der RT-Gruppe war dabei signifikant kleiner gegenüber der NL- und LTR-Gruppe ($F_{(5, 41)} = 2,957$; $P = 0,0227$). Die NL- und LTR-Tiere waren gegenüber naiven, AV- und AQ-Tieren nicht signifikant verschieden. Die 55kDa-Fragmente zeigten keine signifikanten Veränderungen in der Verteilung zwischen den Fraktionen.

Veränderungen waren spezifisch für verschiedene Lernphasen und zeigten vor allem für die RT- und NL-Gruppe signifikante Änderungen. Diese Tiere waren gleich lange trainiert, unterschieden sich jedoch ausschließlich in der Diskriminationsleistung. Die NL-Gruppe zeigte sehr ähnliche ECM-Verhältnisse, wie die im Anfangsstadium des Lernens befindlichen Tiere der AV- oder AQ-Gruppen.

Betrachtung der absoluten und relativen TNR-Änderungen

Dieselben Western Blots wurden verwendet, um TNR zu quantifizieren. Mit den verwendeten Antikörpern war es jedoch nur möglich, das Volllängenprotein nachzuweisen. Es zeigte sich optisch das gleiche Ergebnis wie für das Volllängenbrevican (siehe Abb. 3.7, Tab. A.7). Auch hier wiesen die in der Gruppe der in der RT-Phase befindlichen Tiere ein etwa 54 % höheres absolutes Niveau an Volllängenprotein in der ECM-Fraktion gegenüber naiven und den restlichen trainierten Tieren auf (siehe Abb. 3.7 A, Tab. A.7). Hier zeigte die One-way-ANOVA jedoch keinen signifikanten Effekt ($F_{(5, 41)} = 2,112$, $P = 0,0833$). Die zelluläre Fraktion zeigt für die NL-Gruppe ein um etwa 22 % niedrigeres absolutes Niveau an Volllängen-TNR als der Mittelwert aller anderen Gruppen (siehe Abb. 3.7 B, Tab. A.7). Mit ca. 40 % Überschuss an TNR-Volllängenprotein in der zellulären Fraktion, liegt die RT-Gruppe um etwa 17 % niedriger als der Mittelwert aller anderen Testgruppen mit 58 % (siehe Abb. 3.7 C, Tab. A.8). Die Ergebnisse der TNR-Quantifizierung bestätigten mit ihren prozentualen Veränderungen die ECM-Veränderungen der zuvor dargestellten Brevican-Befunde, wenn auch nicht mit statistisch signifikanten Änderungen.

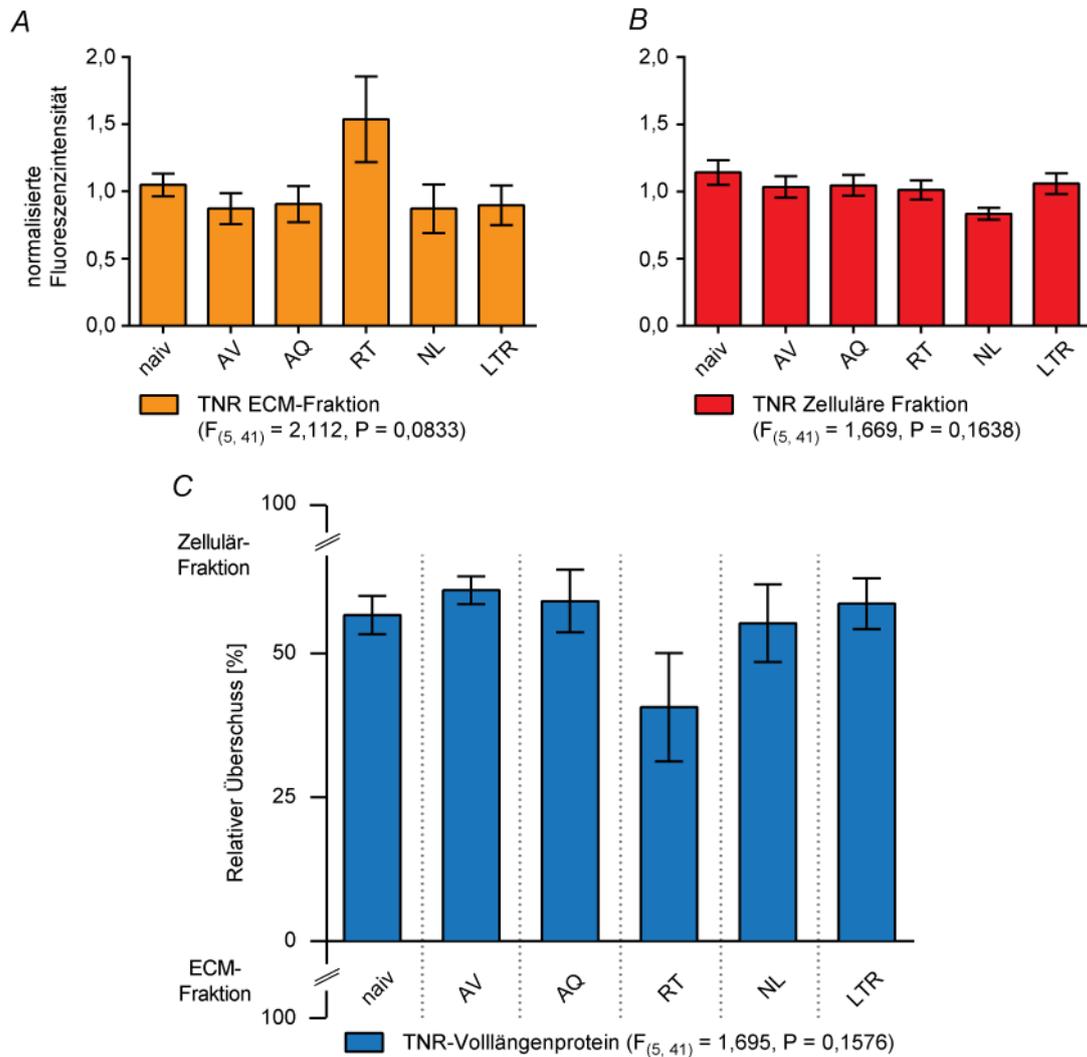


Abbildung 3.7 – Tenascin-R-Quantifizierung und deren Verhältnisse im ACx in unterschiedlichen Lernphasen. Mittelwerte (\pm SEM) der absoluten Grauwertmessungen der Fluoreszenzintensitäten der Western Blots in (A) der ECM-Fraktion und (B) der zellulären Fraktion aller Tiere (gesamt $n = 47$). In den ECM-Fractionen (A) zeigten sich tendenziell mehr TNR-Volllängenproteine in der RT-Gruppe verglichen mit allen anderen Gruppen ($F_{(5, 41)} = 2,112$, $P = 0,0833$; Tab. A.7). In den zellulären Fraktionen war kein Trend ($F_{(5, 41)} = 1,669$, $P = 0,1638$; Tab. A.7) erkennbar (B). Der relative Überschuss der TNR-Volllängenproteine zwischen extrazellulären und intrazellulären Fraktionen ist gezeigt in (C). Der Überschuss an Volllängen-TNR in der zellulären Fraktion nimmt in der RT-Gruppe gegenüber allen anderen Gruppen eher ab, wenn auch nicht signifikant ($F_{(5, 41)} = 1,695$, $P = 0,1576$; Tab. A.8).

3.3 Einfluss der ECM-Degradation auf aktives Vermeidungslernen und den Langzeitabruf des Erlernten

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde dargelegt, dass eine Degradation der ECM das Umlernen der FM-Diskrimination in Gerbils erleichtert (Happel et al., 2014b). Die Studie zeigte weiterhin, dass dies auf den initialen Anlernprozess keinen Einfluss zu haben scheint. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der biochemischen Analyse, dass Mäuse während dieser Lernphase jedoch signifikante intrinsische Veränderungen der ECM aufweisen. Somit stellten sich zwei Fragen: (1) Lassen sich die Befunde, dass eine initiale HYase-Injektion und eine entsprechende Interferenz mit intrinsischen Umbauprozessen keinen Einfluss auf das Akquisitionslernen haben, in Mäusen replizieren? Und (2) welchen Einfluss könnte die Reduktion der ECM in der initialen Lernphase weiterhin auf den Langzeitabruf haben, vor allem im Vergleich bei initial lernenden und nicht lernenden Tieren? Um diesen Fragen nachzugehen, wurden Mäuse mit HYase ($n = 17$) bzw. 0,9 % NaCl ($n = 21$) bilateral im ACx injiziert (vgl. Abschnitt 2.2) und 48 h später in demselben FM-Diskriminationsparadigma inklusive einer Pause (ca. 4 Wochen) und anschließender LTR-Phase trainiert (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.1). Statistisch verglichen wurden markante Zeitpunkte des Lernprozesses: Dazu wurden die gemittelten Werte der letzten drei Trainingstage (Lernplateau) in den beiden Phasen ausgewertet. Ebenso wurden die Verhaltensleistungen am ersten Tag beider Phasen, sowie der Eintritt in die unterschiedlichen Lernstadien (AV, AQ, RT, AV', LTR; vgl. Abb. 3.8) untersucht.

Beim Vergleich der CR-Lernkurven der enzyminjizierten und Kontrollgruppe zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich CR-Plateaus der ersten und zweiten Phase für den Go-Stimulus. Die Two-Way-ANOVA zeigte signifikante Haupteffekte für „Gruppe“ ($F_{(1,221)} = 10,504$, $P = 0,0014$), „Phase“ ($F_{(1,221)} = 3,927$, $P = 0,0487$) und eine signifikante Interaktion „Gruppe x Phase“ ($F_{(1,221)} = 7,675$, $P = 0,0061$). In der Posthoc-Analyse mit multiplem Vergleichstest nach Šídák, ergab sich das RT-Plateau der Kontrollgruppe als signifikant verschieden vom LTR-Plateau dieser Tiergruppe (Abb. 3.8 A, B; $P(\text{adjustiert}) = 0,0030$; Tab. A.9 - Hit) und auch gegen das RT-Plateau der HYase-injizierten Gruppe (Abb. 3.8 A, B; $P(\text{adjustiert}) = 0,0002$; Tab. A.9 - Hit). Für die Sprungquote auf NoGo-Stimuli zeigten die Gruppen signifikante Unterschiede in ihren Plateaus für „Gruppe“ ($F_{(1,221)} = 13,121$, $P = 0,0004$), „Phase“ ($F_{(1,221)} = 6,064$, $P = 0,0146$) aber keine signifikante Interaktion. Der Posthoc-Test nach Šídák zeigte das LTR-Plateau der HYase-injizierten Gruppe als signifikant

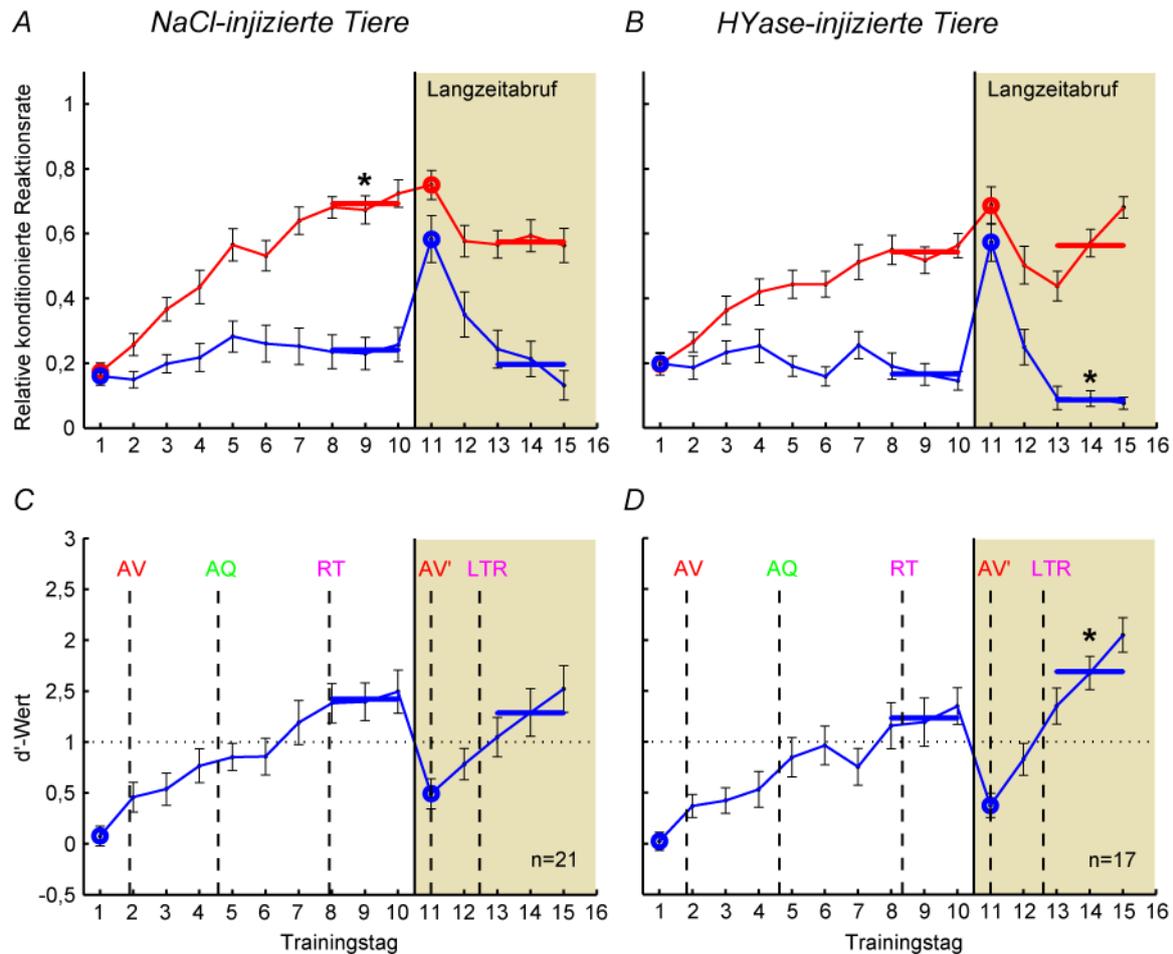


Abbildung 3.8 – Vergleich aller NaCl-injizierten Tiere vs. aller HYase-injizierten Tiere. Gezeigt sind in (A) und (B) die relativen konditionierten Reaktionen der Tiergruppen auf den Go-Stimulus (rot) und den NoGo-Stimulus (blau), in (C) und (D) jeweils der Sensitivitätsindex d' über die Gesamtzeit des Trainings. Die senkrechte, schwarze, durchgezogene Linie indiziert jeweils die Trainingspause von ca. 4 Wochen vor dem Langzeitabruf (Ocker unterlegt) des Erlernten. Durch senkrechte gestrichelte Markierungen sind die mittleren Startpunkte der Avoidance (AV; AV'), der Akquisition (AQ) und des Retrievals (RT) und des Langzeitabrufes (LTR) markiert. Zur Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen den Tiergruppen und deren Lernphasen wurden Two-Way-ANOVAS der CR-Werte bzw. der d' -Werte herangezogen. Dazu wurden die letzten drei Trainingssitzungen (waagerechte rote bzw. blaue Linien), die ersten Sitzungen vor bzw. nach der Pause (Punkte) und die Lernphasenwechsel auch Posthoc durch multiplen Vergleichstest nach Šidák untersucht (* markieren signifikante Haupteffekte; Details siehe Tab. A.9 und A.10). Die Tiere der enzyminjizierten und der Kontrollgruppe zeigten signifikante Unterschiede in den Plateaus („Gruppe“: $F_{(1,221)} = 10,504$, $P = 0,0014$; „Phase“: $F_{(1,221)} = 3,927$, $P = 0,0487$) und interagierten in der Hit-Rate (A, B) signifikant ($F_{(1,221)} = 3,927$, $P = 0,0061$). Für die FA-Sprungquote zeigten die Gruppen signifikante Unterschiede in ihren Plateaus in „Gruppe“ ($F_{(1,221)} = 13,121$, $P = 0,0004$) und „Phase“ ($F_{(1,221)} = 6,064$, $P = 0,0146$), gezeigt in (A, B; Tab. A.9). Im d' -Wert zeigte sich nur ein signifikanter Haupteffekt in den Plateaus bezüglich der Interaktion (C, D; $F_{(1,221)} = 6,648$, $P = 0,0106$; Tab. A.10). Der Posthoc-Vergleich zeigte, dass dies auf ein signifikant höheres d' -Plateau in der LTR-Phase der enzyminjizierten Gruppe zurückzuführen war. Allgemein war für alle Werte des ersten initialen und ersten LTR-Trainingstages für Hits, FAs und d' -Wert ein signifikanter Unterschied erkennbar (Two-Way-ANOVA, P-Werte siehe Tab. A.9, A.10). Die Lernphasenübergänge zeigten, dass die AV-Transition und auch die Diskriminationstransition im Langzeitabruf signifikant in beiden Tiergruppen schneller einsetzten als zu Beginn der Trainings, sich die Lerndynamik in beiden Gruppen jedoch sonst nicht unterschied (C, D; AV/AV': $F_{(1,64)} = 20,843$, $P < 0,0001$; AQ/LTR $F_{(1,46)} = 95,107$, $P < 0,0001$). Details zur statistischen Analyse sind in Tab. A.9 und A.10 gezeigt. Die Darstellung der Lernkurven und auszuwertenden Parameter wird im weiteren Verlauf beibehalten.

verschieden vom LTR-Plateau der Kontrollgruppe (Abb. 3.8 A, B; $P(\text{adjustiert}) = 0,0157$; Tab. A.9) auf. Im d' -Wert zeigte sich eine signifikante Interaktion bezüglich der Plateaus der Gruppen (Abb. 3.8 C, D; $F_{(1,221)} = 6,648$, $P = 0,0106$; Tab. A.10 - FA). Der Unterschied der HYase-injizierten Tiere im LTR-Plateau wurde im Posthoc-Test durch eine Tendenz im Vergleich der LTR-Phasen beider Gruppen (Abb. 3.8 C, D; $P(\text{adjustiert}) = 0,0838$; Tab. A.10) und dem signifikanten Vergleich der RT-Phase mit der LTR-Phase der HYase-injizierten Gruppe (Abb. 3.8 C, D; $P(\text{adjustiert}) = 0,0462$; Tab. A.10) bestätigt.

Für den Vergleich aller Werte der ersten initialen Trainingssitzung und der ersten LTR-Sitzung waren für Go- und NoGo-Stimuli (Abb. 3.8 A, B; Hit und FA jeweils: $P(\text{adjustiert}) < 0,0001$; Tab. A.9) und die d' -Werte (Abb. 3.8 C, D; $P(\text{adjustiert}) = 0,0013$; Tab. A.10) jeweils signifikante Unterschiede zwischen den Phasen erkennbar. Interaktionen zwischen den Tiergruppen und deren Phasen waren keine zu verzeichnen. Posthoc zeigten sich für Go und NoGo jeweils nur signifikante Unterschiede zwischen den Phasen innerhalb derselben Tiergruppe (Abb. 3.8; Posthoc-Analyse nach Šídák; adjustierte P-Werte siehe Tab. A.9 - Hit, FA). Für den d' -Wert zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Trainingssitzungen (vgl. Tab. A.10). Aus den Haupteffekten war zu schlussfolgern, dass beide Tiergruppen am ersten Trainingstag in beiden Phasen vergleichbare Verhaltensleistungen zeigten. Am ersten Versuchstag der LTR-Phase waren sie signifikant besser bei der Diskrimination der beiden CS im Vergleich zum ersten Trainingstag in der initialen Lernphase.

Wie in den Abbildungen 3.8 und 3.9 sowie in der LTR-Gruppe der Abbildung 3.4 zu erkennen ist, zeigten alle trainierten Tiere nach der Pause eine veränderte Lernstrategie in der LTR-Phase. Sie zeigten ein Detektionsverhalten mit Ansätzen zur Diskrimination, statt des Ausweichverhaltens der ersten Trainingssitzung im initialen Lernen. Deutlich wird dieser Strategiewechsel im statistischen Vergleich der Transition der Lernstrategien der injizierten Tiergruppen. Hier zeigte sich in der LTR-Phase ein signifikant schnellerer Beginn der AV-Phase (AV') innerhalb beider Tiergruppen, als zu Beginn der Trainings (AV, Abb. 3.8 C, D; $F_{(1,64)} = 20,843$, $P < 0,0001$; Tab. A.10). Auch war ein signifikant schnellerer Beginn der Transition zur Diskrimination in der LTR-Phase ($F_{(1,46)} = 95,107$, $P < 0,0001$) innerhalb beider Tiergruppen zu zeigen (Vergleich 1. AQ vs. 1. LTR). Zwischen beiden Gruppen war der Beginn der Transition in die unterschiedlichen Lernstadien (AV vs. AV', AQ vs. LTR) nicht signifikant verschieden (vgl. auch Posthoc-Analyse in Tab. A.10).

Die signifikanten Unterschiede beider Gruppen in der LTR-Phase (Abb. 3.8) wurden im Vergleich der Gesamtpopulationen ($n=21$ vs. $n=17$) betrachtet. Im zweiten Teil der Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass offensichtlich Unterschiede in

der ECM-Verteilung zwischen guten und schlechten Lernern bestehen. Daher wurde die statistische Auswertung der Gruppen jeweils für initial lernende und initial nicht lernende Tiere separat betrachtet.

In ihrer Diskriminationsleistung, gezeigt durch den d' -Wert, unterschieden sich initial diskriminierende Tiere nur in ihrer Leistung bezüglich der ersten Trainingssitzungen vor und nach der Pause (Abb. 3.9 A, B; $F_{(1,35)} = 6,029$, $P = 0,0192$; Tab. A.12), nicht jedoch in ihren Plateauphasen (vgl. Tab. A.12). Auch hier war, wie zuvor erläutert, die schnellere Transition der Lernstrategie der Tiere direkt in die AV-Phase nach der Pause signifikant erkennbar (Vergleich AV vs. AV'; Abb. 3.9 A, B; $F_{(1,28)} = 4,669$, $P = 0,0394$; Tab. A.12). Die Transition in die Diskriminationsphasen vor (1. AQ) und nach der Pause (1. LTR) waren zwischen beiden Gruppen nicht verschieden, jedoch jeweils in der LTR-Phase schneller als initial und entsprach demnach dem zuvor erläuterten Befund des Gesamtgruppenvergleichs (Abb. 3.9 A, B; $F_{(1,33)} = 69,625$, $P < 0,0001$; Posthoc-Test siehe Tab. A.12).

Anders war dies beim Vergleich der Tiere ohne erfolgreiche initiale Akquisition (Abb. 3.9 C, D). Beide Gruppen enthielten nur Tiere, die in der ersten Trainingsphase maximal in einzelnen Trainingssitzungen Diskriminationsverhalten zeigten, jedoch dem zuvor definierten Kriterium des „Lerners“ nicht gerecht wurden (siehe Abschnitt 3.2).

Im Vergleich dieser Tiere zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- ($n = 8$) und Testgruppe ($n = 10$; Tab. A.14) bezüglich der Lernplateaus in den Hauptfaktoren „Gruppe“ ($F_{(1,104)} = 25,212$, $P < 0,0001$) und „Phase“ ($F_{(1,104)} = 17,535$, $P < 0,0001$) sowie eine signifikante Interaktion ($F_{(1,104)} = 16,447$, $P < 0,0001$). Die Posthoc-Analyse nach Šídák zeigte, dass das Plateau in der LTR-Phase der HYase-injizierten Tiere signifikant höher lag, als das der Kontrollgruppe. Ebenso unterschied es sich signifikant vom Plateau der RT-Phase innerhalb der HYase-injizierten Tiere (Abb. 3.9 C, D; jeweils $P(\text{adjustiert}) < 0,0001$; Tab. A.14).

Die Lernstrategien beider Gruppen unterschieden sich, wie auch bei den initial lernenden Gruppen, in der jeweils ersten Trainingssitzung initial und nach der Pause, jedoch nicht zwischen den Trainingsgruppen (vgl. Tab. A.14). Die Transition in die AV-Strategie der Tiere fand auch in diesen beiden Gruppen im LTR schneller statt (Vergleich AV vs. AV'), jedoch nicht verschieden zwischen den Gruppen (Abb. 3.9 C, D; $F_{(1,32)} = 19,126$, $P = 0,0001$; Tab. A.14).

Der Vergleich der Transition in das Diskriminationsverhalten zeigte den entscheidenden Unterschied dieser beiden Gruppen. In der LTR-Phase zeigten 80% der HYase-injizierten Tiere eine stabile Transition zur Diskrimination (Abb. 3.9 C, D). Im Gegensatz dazu erreichten nur 2 Tiere (25%), der 0,9% Kochsalzlösung injizierten initial nicht diskriminierenden Tiere, diese Transition im Langzeitabruf

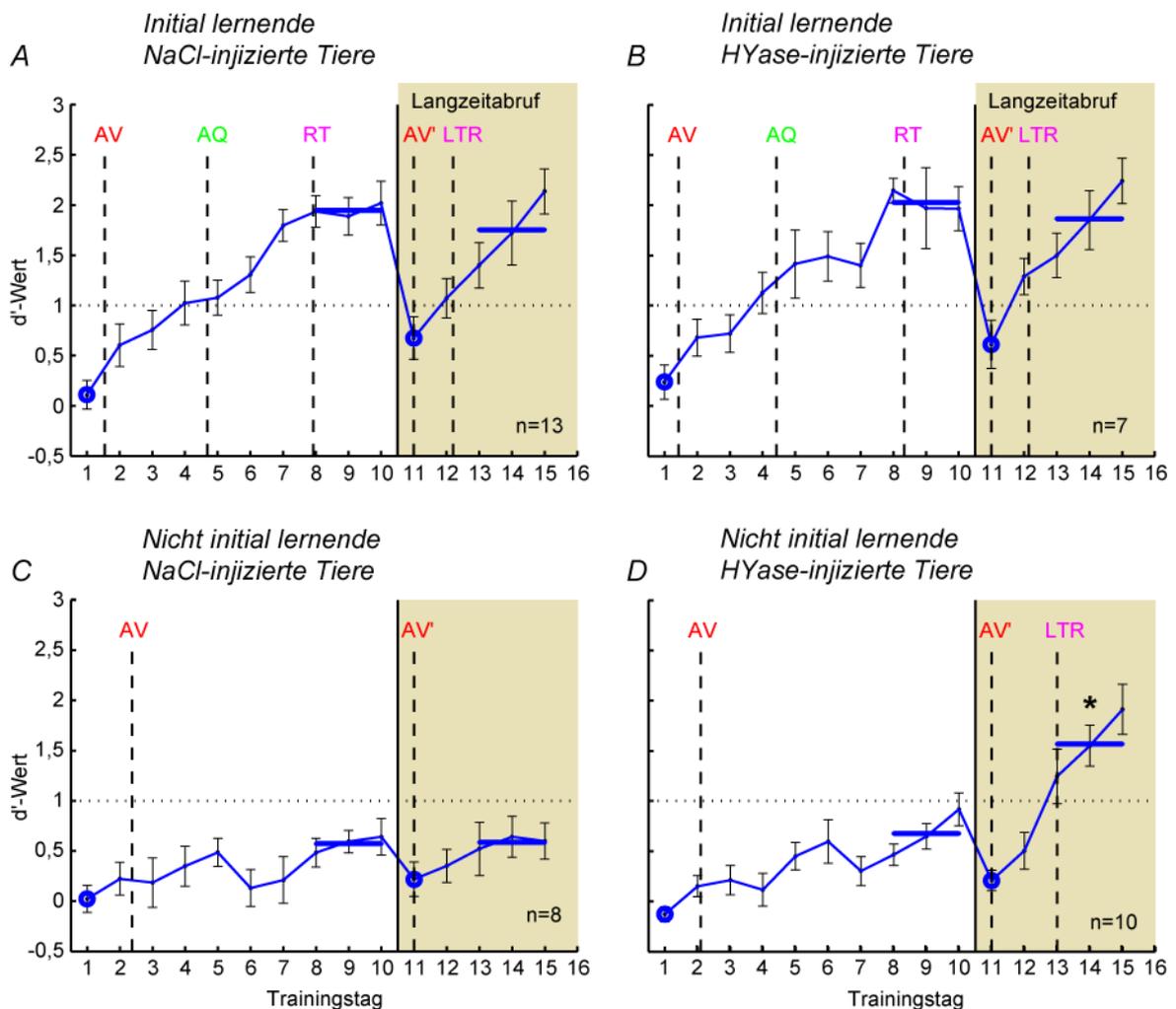


Abbildung 3.9 – Vergleich der NaCl-injizierten und HYase-injizierten Tiere aufgetrennt nach initialen Lernern und initialen Nichtlernern. Anhand des Sensitivitätsindex d' wird der Trainingsverlauf verglichen. Injizierte, initial lernende Tiere (A, B) unterschieden sich in ihrem Lernverhalten nicht voneinander. Injizierte, nicht initial lernende Tiere (C, D) zeigten signifikante Unterschiede bezüglich der Faktoren „Gruppe“, „Phase“ und eine signifikante Interaktion „Gruppe x Phase“. Eine Posthoc-Analyse zeigte, dass das Plateau in der LTR-Phase in der HYase-injizierten Gruppe signifikant höher lag, als in der Kontrollgruppe (markiert mit *; Two-Way-ANOVA und multipler Vergleichstest nach Šidák; P-Werte siehe Text und Tab. A.14). Der Vergleich der Transition in die Diskrimination in der LTR-Phase zwischen den drei Tiergruppen (A, B, D) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen allen Gruppen (vgl. Tab. A.15 im Anhang). Alle weiteren Vergleiche der vier Tiergruppen, für die jeweiligen hier nicht gezeigten CR-Raten, sind den Tabellen A.11 und A.13 und der Abbildung B.1 im Anhang zu entnehmen.

(vgl. Einzeltier-Abb. B.3). Ein statistischer Vergleich der Transition zur Diskrimination wurde deshalb zwischen den Tieren dieser Gruppe nicht vorgenommen. Stattdessen wurde verglichen, ob sich der zeitliche Verlauf des Überganges in die Diskrimination, der nicht initial diskriminierenden HYase-injizierten Tiere, von dem der initial lernenden Gruppen unterscheidet. Die Transition stellte sich dabei als nicht signifikant verschieden (One-Way-ANOVA, vgl. Tab. A.15) dar. Somit ist sie vergleichbar mit den Transitionen der initial lernenden Tiergruppen.

3.4 Zeitliche und räumliche Ausdehnung der ECM-Degradation in Mäusen

Um die zeitliche und räumliche Ausdehnung der ECM-Reduktion nach Injektion zu dokumentieren, wurden untrainierte Tiere unilateral mit physiologischer Kochsalzlösung und HYase injiziert (Abb. 3.10 A - C), vergleichbar mit den Experimenten aus Abschnitt 3.1. Es zeigte sich ein signifikant geringeres ECM-Niveau bei allen injizierten Tieren innerhalb der ersten 7 Tage nach Injektion. Eine signifikante Erhöhung der Menge an CSPGs an Tag 12 nach Injektion, verglichen mit allen anderen Zeitpunkten (Abb. 3.10 D; One-Way-ANOVA; $F_{(4,32)} = 47,270$, $P < 0,0001$; vgl. Posthoc-Analyse in Tab. A.16), war festzustellen. Ebenso ist die Immunfluoreszenz zwischen Enzym- und 0,9% Kochsalz-injizierter Seite der temporalen Kortex (TCx) an den Tagen 3, 6 und 7 nach Injektion jeweils signifikant geringer für die HYase-injizierte Seite (Abb. 3.10 D; ungepaarter t-Test TCx zw. Hemisphären; P-Werte siehe Tab. A.16). An Tag 9 nach Injektion ist kein signifikanter Unterschied erkennbar (Tab. A.16), jedoch an Tag 12 nach Injektion ein Überschießen der WFA-Fluoreszenz zu verzeichnen (Abb. 3.10 D; ungepaarter t-Test; $P = 0,0108$; Tab. A.16). Als Kontrollen der räumlichen Ausdehnung wurden der Cingulett Kortex (CC) und der Hippocampus (CA) herangezogen, welche beide an Tag 7 nach Injektion keinen signifikanten Unterschied zwischen den Hemisphären aufwiesen (vgl. Abb. 3.10 E; ungepaarter t-Test zw. Hemisphären; P-Werte siehe Tab. A.16).

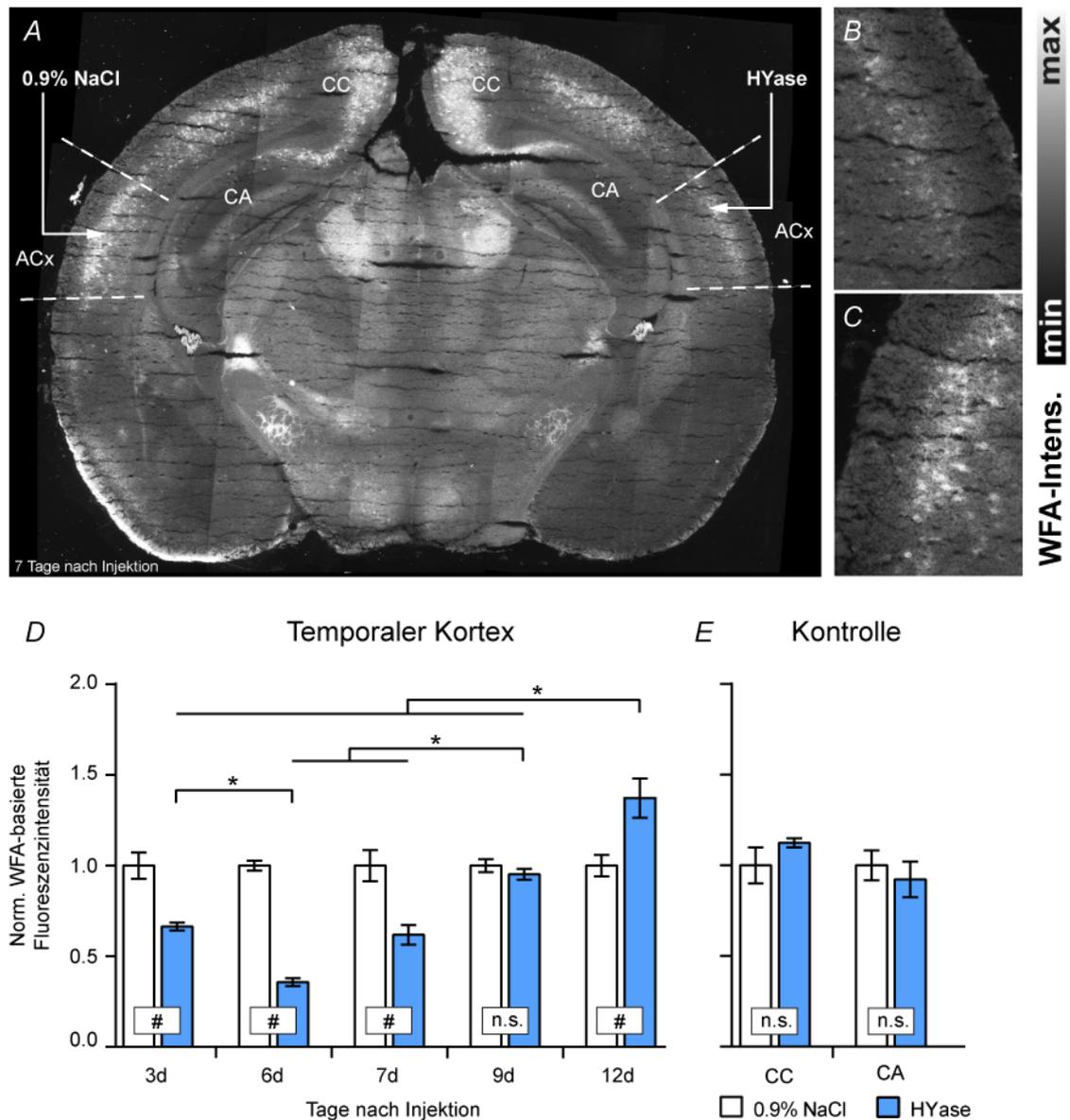


Abbildung 3.10 – **Repräsentatives Beispiel einer *Wisteria-Floribunda*-Agglutinin-Färbung und Quantifizierung der ECM in injizierten Tieren.** Gezeigt ist ein 40 µm dicker, WFA-gefärbter Frontalschnitt eines Mausgehirns (A) im Bereich des ACx, präpariert 7 Tage nach jeweils unilateraler Injektion von 0,9% NaCl (links) und HYase (rechts). In (B) ist die Ausschnittvergrößerung des ACx der HYase-injizierten und in (C) die der 0,9% NaCl-injizierten Seiten abgebildet. In (D) ist die Quantifizierung der WFA-Färbung im Bereich der Injektionsstellen zwischen den gestrichelten Linien (ACx in A) des temporalen Kortex dargestellt (* One-Way-ANOVA; $P < 0,05$; Posthoc-Analyse Šidáks multipler Vergleichstest; # zweiseitiger ungepaarter t-Test $P < 0,05$; Tab. A.16; n.s. nicht signifikant). (E) zeigt die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität für den Cingulet Kortex (CC) und den Hippocampus (CA) des Schnittes aus (A) (# zweiseitiger ungepaarter t-Test $P < 0,05$; Tab. A.16)

Kapitel 4

Diskussion

Frühe Erfahrungen während der juvenilen Entwicklung sorgen für die Ausbildung neuronaler Schaltkreise, welche das Grundgerüst für eine effiziente und lebenslange Verarbeitung von Sinnesinformationen darstellen. Dies manifestiert sich unter anderem in topografischen Karten der Umweltrepräsentation in sensorischen Systemen adulter Tiere (Luo & Flanagan, 2007; Schreiner & Winer, 2007). Parallel zur Ausbildung dieser erfahrungsabhängigen Strukturen entsteht die adulte ECM, welche somit den Wechsel von der juvenilen Flexibilität des Systems in sogenannten „kritischen Phasen“ hin zur höheren Stabilität und Konservierung von neuronalen Strukturen im adulten Gehirn steuert (Gundelfinger et al., 2010; Pizzorusso, 2002). Somit spielt die ECM im adulten Gehirn eine zentrale Rolle zur Steuerung der lernabhängigen Reorganisation synaptischer Netzwerke (Frischknecht & Happel, 2016), obwohl die zugrunde liegenden Mechanismen der adulten Gedächtniskonsolidierung und -flexibilität noch weitgehend unverstanden sind (Dudai, 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der ECM auf kognitiv herausfordernde Verhaltensaufgaben, deren Erlernen, Umlernen und den Langzeitabruf des konsolidierten Verhaltens im auditorischen Kortex von Nagetieren untersucht. Dazu wurden drei Ansätze verfolgt, die sich wie folgt darstellen: Im ersten Teil wurde untersucht, welchen Einfluss die Degradation der ECM zu bestimmten Zeitpunkten auf das Erlernen bzw. Umlernen eines FM-Diskriminationsparadigmas in Gerbils hat. Im Ergebnis war das Umlernen dieses kognitiv anspruchsvollen, erworbenen Verhaltens unter ECM-Degradation innerhalb eines bestimmten Zeitfensters möglich, jedoch ohne dabei den Abruf von Gedächtnisinhalten, oder das Erlernen an sich, negativ zu beeinflussen. Der zweite Teil beschreibt die Untersuchungen zu den intrinsischen ECM-Modulationen während unterschiedlicher Phasen des Erlernens der FM-Diskrimination und des Langzeitabrufes des Verhaltens in Mäusen. Hier zeigte sich, dass die ECM des ACx generell während kortexabhängiger Lernprozesse moduliert wird und zusätzlich entscheidenden Einfluss auf die Konsolidierung der Gedächtnisinhalte zu haben scheint. Der dritte Teil untersucht den

Einfluss der initialen ECM-Degradation im ACx während der FM-Diskrimination in Mäusen. Hier zeigte sich eine Abhängigkeit der Wirkung von der generellen Lernleistung der Tiere. Nur bei initial nicht diskriminierenden Tieren, nicht jedoch bei Kontrolltieren, erwirkte die Injektion der HYase eine Verbesserung des Langzeitabrufs. In der Folge werden diese Ergebnisse diskutiert, um die Rolle der kortikalen ECM zur Steuerung von Lern- und Gedächtnisprozessen im adulten Tier besser zu verstehen.

4.1 Einfluss der enzymatischen Degradation der ECM im auditorischen Kortex auf kognitiv komplexe Umlernprozesse

Im ersten Teil der vorliegenden Dissertation wurde der Einfluss der Degradation der ECM auf einen kortexabhängigen, kognitiv sehr anspruchsvollen, Verhaltensversuch untersucht.

Gerbils wurden in einem Go/NoGo-Shuttlebox-Paradigma auf die Diskrimination der Modulationsrichtung zweier FM-Töne trainiert. Aus der Literatur ist bekannt, dass dazu eine lerninduzierte Reorganisation der neuronalen Schaltkreise im ACx notwendig ist (Ohl et al., 1999; Ohl & Scheich, 2005). Nach erfolgreicher initialer Akquisition der Aufgabe wurde die Bedeutung beider Signale ins Gegenteil gekehrt, sodass die Tiere ihre vorherige Verhaltensstrategie inhibieren und umlernen mussten.

Ein solches Umlernen wird generell als kognitiv anspruchsvolle Aufgabe angesehen. Es basiert auf der Interaktion verschiedener Hirnareale, wie dem CA mit höheren kortikalen Arealen wie dem PFC (Diekamp et al., 2000; Stark et al., 2004). Durch entsprechende Anpassung der exakten Trainingsparameter kann die Aufgabe nochmals anspruchsvoller gestaltet werden. So fällt den Tieren das Umlernen noch schwerer wenn CS und US nicht zeitlich überlappend präsentiert werden. Diese Versuchsanordnung wurde für die Gerbil-Experimente im ersten Teil der vorliegenden Arbeit genutzt.

Tiere, die nach dem initialen Training mit 0,9 % Kochsalzlösung bilateral in die ACx injiziert wurden, konnten ihr Verhalten nur sehr schwer bis gar nicht adaptieren und haben kaum erfolgreich die neuen Bedeutungen der beiden CS erlernt. Eine Injektion von HYase direkt vor Beginn des Umlerntrainings förderte hingegen signifikant den Umlernprozess. Um nachzuweisen, dass ein erfolgreiches Umlernen tatsächlich auf einer höheren kognitiven Flexibilität und nicht auf einer Abschwächung der zuvor gelernten Gedächtnisinhalte zurückzuführen ist, wurde in

einer weiteren Kontrollgruppe das Enzym injiziert, aber ohne Kontingenzwechsel weiter trainiert. Die ECM-Reduktion zeigte dabei keinen Einfluss auf das Abrufen des zuvor erlernten Verhaltens.

Eine dritte Kontrollgruppe, die vor dem initialen Training mit HYase injiziert wurde, zeigte weder Einschränkungen im initialen Erlernen der Aufgabe, noch ein besseres Umlernverhalten. Durch die immunhistochemischen Analysen konnte ich zeigen, dass dies aufgrund der Rekonstitution der ECM nach Verdau zu erklären ist. Das Zeitfenster der ECM-Reduktion, welches mittels WFA-Färbung bestimmt wurde (Abb. 3.2 C), korreliert eng mit der Zeit des initialen Lernens der dritten Kontrollgruppe. Zum Zeitpunkt des Umlernens, Tag 10 nach Injektion, hatte der Prozess der Rekonstitution der ECM bereits eingesetzt. Die Befunde wiesen somit auf ein „zeitliches Fenster verbesserter Lernmöglichkeiten“ für den Zeitraum der Degradation der ECM hin. Es ließ sich weiterhin schlussfolgern, dass die ECM-Degradation auf die Gedächtnisbildung und dessen direkten Abruf in den initial lernenden Gerbils keinen Einfluss hatte. Die Verhaltensdaten zeigten, dass ein Umlernen der Verhaltensstrategie nur in diesem zeitlich begrenzten Rahmen reduzierter ECM möglich war (Happel et al., 2014b).

Offen ließ diese Studie hingegen, welchen Einfluss die ECM-Degradation auf den Langzeitabruf des Erlernten nach Schließen der Fenster hat, was im dritten Teil der vorliegenden Arbeit thematisiert wurde. Im zweiten Teil dieser Dissertation sollte zunächst untersucht werden, ob solche zeitlich begrenzten Änderungen der ECM auch intrinsisch im adulten lernenden Tier stattfinden? Unterstützt oder ermöglicht eine Modulation der kortikalen ECM das Lernen?

4.2 Intrinsische Umbauprozesse der ECM im auditorischen Kortex während verschiedener Lernphasen

Um Umbauprozesse der ECM zu charakterisieren, sollte der Aufbau der ECM in adulten Nagetieren erinnert werden (siehe Einleitung, Abschnitt 1.1). Das langkettige Zuckermolekül Hyaluronan bildet das Rückgrat für verschiedene CSPGs, wie Aggrecan und Brevican sowie Heparansulfat-Proteoglykanen und ihren Linkproteinen. CSPGs werden über TNR zu einem dreidimensionalen Netzwerk verbunden (Frischknecht & Happel, 2016). Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit ist Brevican. Es ist aus immunzytochemischen Untersuchungen (Blosa et al., 2013) bekannt dafür, speziell um Synapsen herum organisiert zu sein und *in vitro* aktivitätsabhängig durch Proteasen geschnitten zu werden (Valenzuela et al.,

2014). Ebenso stellt das TNR ein Molekül dar, welches für die Integrität der ECM-Netzwerke eine fundamentale Rolle spielt (für einen Überblick siehe [Dityatev et al., 2010](#)). KO-Mäuse des TNR weisen zudem eine Veränderung in ihrem Lernverhalten auf ([Bukalo et al., 2007](#)). Aus diesem Grund lag der Fokus auf der Untersuchung dieser beiden Proteine und ihrer Rolle bei Lernprozessen *in vivo* am Modell der kortexabhängigen FM-Diskrimination.

Wie aus Voruntersuchungen bekannt ist, erreichen Mäuse beim Erlernen der kortexabhängigen FM-Diskrimination mit den identischen Trainingsparametern, wie zunächst bei Gerbils angewendet, signifikant schlechtere Lernergebnisse (vgl. Abschnitt 2.1). In weiteren nicht gezeigten Experimenten stellten wir fest, dass diese Unterschiede durch eine Überlappung der CS (Töne) mit den US (Fußreizen) ausgeglichen werden können. Nach dieser Adjustierung waren die Mäuse in gleichem Maße in der Lage die FM-Diskrimination zu erlernen. Die Gruppengrößen wurden entsprechend der in der Literatur gängigen Größen auf $n = 8$ gesetzt.

Eine solche zeitliche Überlappung des CS und des US ermöglicht eine verbesserte Assoziation und wird als „Delay“-Konditionierung beschrieben. Im Gegensatz zur zuvor verwandten „Trace“-Konditionierung bei den Gerbils werden andere hierarchisch tiefer liegende Hirnareale verstärkt einbezogen. In der Literatur wird diskutiert, dass bei der „Delay“-Konditionierung Kortexareale mehr modulatorischen Einfluss auf die absolute Lernleistung haben, während beim „Trace“-Konditionieren verteilte kortikale Aktivierung notwendig für das Erlernen zu sein scheint (siehe dazu z. B. die Übersichtsartikel: [Freeman & Steinmetz, 2011](#); [Raybuck & Lattal, 2014](#)). Durch Anpassen der Verhaltensparadigmen in den Teilstudien von Gerbils und Mäusen wird der generell unterschiedlichen kognitiven Lernfähigkeit der beiden Spezies Rechnung getragen. Dies ermöglicht entsprechend das Studium des Einflusses der ECM im ACx auf auditorisches Lernen in Nagetieren.

4.2.1 Einteilung der Lernphasen und des individuellen Lernverhaltens

Das Erlernen der FM-Diskrimination verläuft bei allen Tieren über verschiedene Phasen im Lernprozess ([Stark et al., 2004](#)). Im ersten Schritt lernten die Tiere schnell auf den US auszuweichen und reduzierten entsprechend ihre Antwortlatenzen auf <1 s nach Einsetzen des Fußreizes, was zumeist innerhalb der ersten Trainings-sitzung passierte (vgl. Abb. 2.1). Anschließend begannen die Tiere damit konditioniert auf die Tonpräsentation hin, ohne auf die Richtung der Einzelstimuli zu achten, die Hürde zu überqueren, was man als Vermeidungsverhalten bezeichnet (AV). Diese erste Lernleistung war somit die erste biochemisch zu charakterisie-

rende Phase im gesamten Lernprozess für dieses Verhaltensparadigma. Zu große Unterschiede der Anzahl an Trainingssitzungen zwischen einzelnen Tieren innerhalb eines Lernstadiums waren jedoch nicht sinnvoll, um mögliche zu große interindividuelle Unterschiede der Lernfähigkeit auszuschließen. Im vorliegenden Datensatz ließen sich die Tiere, die eine FM-Diskrimination erlernten, schon ab der zweiten oder dritten Trainingssitzung von den nicht akquirierenden Tieren (sog. NL-Tieren) unterscheiden. Daher umfasst die Gruppe der AV-Lerner nur Tiere, die innerhalb von maximal 4 Trainingssitzungen zweimal in Folge das AV-Kriterium erfüllt haben. Die an die AV-Phase anschließende Akquisition, die den Zeitpunkt der beginnenden Diskrimination der Tonrichtungen darstellt, ist die zweit untersuchte Lernphase. In dieser AQ-Gruppe wurden dem entsprechend nur Tiere inkludiert, die nach dem AV-Verhalten drei Sitzungen in Folge die AQ-Kriterien erfüllten. Weiterhin wurde eine Tiergruppe untersucht, welche die Diskrimination über insgesamt mindestens 5 Trainingssitzungen vollzogen hatte (RT-Phase) und dem ausgelernten Zustand entsprechen sollte. Alle Tiere sind aber im Anlernprozess maximal 12 Tage trainiert worden.

In der vorherigen Studie wurde gezeigt, dass die experimentelle ECM-Modulation im ACx starken Einfluss auf Umlernprozesse, jedoch nicht auf Abrufverhalten hatte. Daraus ergab sich die Frage, wie sich die ECM intrinsisch im Langzeitabruf von erlerntem Wissen verhält, oder welchen Einfluss sie dabei hat? Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine weitere Gruppe von Tieren nach einer Pause von ca. vier Wochen weitere 5 Tage trainiert (LTR-Gruppe) und danach deren ACx biochemisch untersucht. Die Gruppe der LTR-Tiere begann konsistent am ersten Versuchstag nach der Pause mit einer erhöhten Sprungrate auf beide CS. Die Tiere erinnerten entsprechend das zuvor erlernte Vermeidungsverhalten (AV), jedoch nicht die zu diskriminierende Kontingenz der CS (vgl. Abb. 3.4 LTR-Gruppe, 3.8, 3.9 und Abb. B.1, sowie die, dem d' -Wert zugehörigen, statistischen Tabellen A.12, A.14 im Anhang). Dieses Verhalten unterschied sich entsprechend drastisch vom initialen Lernen, wenngleich die Diskrimination, gemessen am d' -Wert, ähnlich schlecht war. Ab dem zweiten Versuchstag in der LTR-Phase riefen Tiere, die das Paradigma vorher schon verstanden hatten, das erlernte Verhalten mit steigender Präzision auch ab.

Einige Tiere überschritten das Niveau der AV-Phase nie kontinuierlich bis zum Erreichen der 12. Trainingssitzung (NL-Gruppe). In dieser Gruppe war es ebenfalls wichtig die biochemische Konfiguration der ECM zu betrachten, da die Tiere eine andere Verhaltensstrategie verfolgten und sich möglicherweise biochemische Unterschiede zu lernenden Individuen zeigen könnten. Initial nicht diskriminierende Tiere, die nach der Pause weiter trainiert wurden, zeigten wenn überhaupt,

nur sehr schwach ausgeprägtes AQ-Verhalten in den letzten beiden Versuchen der LTR-Trainings. Die genauen Kriterien der Phaseneinteilung sind im Ergebnisteil, Abschnitt 3.2 erläutert.

4.2.2 Proteinbiochemische Untersuchung des ACx mittels sqWB

Für die proteinbiochemische Untersuchung mittels sqWB mussten verschiedene kritische Punkte beachtet und viele kleine Adaptationen vorgenommen werden.

Ein grundsätzliches Problem war die Größe des präparierten Gewebes des ACx. Üblicherweise wird bei Untersuchungen mittels SDS-PAGE mit einer doppelten Probenauftragung gearbeitet. Dazu kommt noch eine Sicherheitsreserve an Probenmaterial für mindestens einen zweiten SDS-PAGE derselben Proben. Die sehr geringe Gewebemenge des ACx je Tier machte es notwendig, das System in Vorversuchen auf möglichst kleinen Probeneinsatz bei genügender Nachweisgrenze der ECM-Proteine, zu optimieren.

Es wurde zunächst das beste Verhältnis an einzusetzendem Probenmaterial und Probenpuffer inklusive ChABC erarbeitet. Darauf folgend wurde die optimale im Gel aufzutragende Gesamtproteinmenge durch Proteinmengenbestimmungen (Amidoblack, Coomassie-Brilliant-Blue) ermittelt. Dabei stellte sich heraus, dass die Probenmengen für den ACx nicht ausreichend waren, um damit jeweils eine Proteinmengenbestimmung durchzuführen und zwei SDS-PAGE-Gele laden zu können. Ein essenzieller Schritt für die Lösung dieses Problems war die gleichbleibende Gesamtproteinmenge der Proben. Dazu war die präzise Massenbestimmung der Gewebeproben in den entsprechend vorgewogenen Eppendorfgefäßen notwendig (vgl. Abschnitt 2.3).

Zur weiteren Reduktion des einzusetzenden Probenmaterials wurden 5-20 %ige SDS-PAGE-Gele eingesetzt, um die großen Unterschiede in den molaren Massen der Proteine und deren Fragmente zu berücksichtigen. Damit wurde erreicht, dass Brevican als Volllängenprotein und als 55 kDa-Fragment gleichzeitig mit demselben Antikörper auf einem Gel nachgewiesen werden konnte. Mit der Beimischung von 2,2,2-Trichlorethanol (Ladner et al., 2004) in die selbst produzierten Gele, und damit der gleichzeitigen Nutzung dieses Farbstoffes als Marker für die aufgetragene Proteinmenge und dessen Nutzung als Proteinübertragungskontrolle der Blots, wurde die Untersuchung auf Einzeltierebene möglich (vgl. Abschnitt 2.3.2).

Da methodenbedingt eine direkte Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Blots nicht gegeben ist, wurde ein Standard nach den vorher bestimmten Vorgaben präpariert, der aus zwei kompletten Gehirnen ohne Cerebellum und Riechhirn naiver

Mäuse, jeweils für die ECM-Fraktion und die zelluläre Fraktion, hergestellt wurde. Durch die Auftragung derselben Standardproben auf allen Blots der Untersuchung und anschließender Normierung darauf, wurde die Vergleichbarkeit aller Blots gewährleistet (siehe Abschnitt 2.3.1).

Die aus den Blots letztlich gewonnenen absoluten Grauwerte wurden, durch Normierungen und Berechnungen die in Abschnitt 2.3.4 dargelegt sind, für die Analyse verwendet. Dabei wurden die absoluten Grauwerte jeder Probe auf den STD und auf den Mittelwert der jeweils betrachteten Moleküle der naiven Gruppe normiert (siehe Abb. 3.5, 3.7 A, B). Um die lernabhängigen Veränderungen innerhalb der betrachteten Proteine klar herauszustellen, wurden die Überschüsse zwischen den betrachteten Brevican-Molekülen innerhalb der Fraktionen (Abb. 3.6 A) und für Brevican und TNR im Vergleich der Fraktionen (Abb. 3.6 B, 3.7 C) dargestellt. Hierzu wurden die auf den STD normierten Werte verwendet, um den unterschiedlichen absoluten Werten der Vollängenproteine und Fragmente in den zellulären und ECM-Fraktionen Rechnung zu tragen.

4.2.3 Lernabhängige Veränderungen von Brevican und Tenascin-R in Abhängigkeit des individuellen Lernniveaus

Durch separate Analyse der Überstände sowie der Pellets der Proben nach Zentrifugation, lassen sich Aussagen über die locker im Extrazellulärraum vorliegenden und die in der zellulären Fraktion gebundenen Proteine treffen. Die absoluten Grauwerte der Vollängenproteine von Brevican (siehe Abschnitt 3.2, Abb. 3.5 D) und TNR (siehe Abschnitt 3.2, Abb. 3.7 B) zeigen über alle Lernphasen sowie das naive Stadium der Tiere keinen signifikanten Unterschied in der zellulären Fraktion. Dies lässt darauf schließen, dass innerhalb der Zelle ein homöostatisch gleich hohes Niveau an Vollängenbrevican und -TNR durch Speicher oder *de novo*-Synthese verfügbar gehalten wird (siehe Abschnitt 4.4.4).

Wie in Valenzuela et al. (2014) *in vitro* gezeigt wurde, spaltet die Protease ADAMTS-4/5 Brevican spezifisch. Dabei entstehen zwei Fragmente (~55 kDa, ~80 kDa) von Brevican, wobei das 55 kDa-Fragment eher membrangebunden ist, als das Vollängenprotein und das 80 kDa-Fragment. Kürzlich wurde am Institut gezeigt, dass die ECM einen höheren Umsatz in CA-Schnitten nach Induktion chemischer LTP hat (Jeet Singh, unveröffentlichte Daten). Da LTP als lernassoziertes Phänomen gilt, ließe sich ein lerninduzierter Anstieg der Fragmentkonzentration in der ECM-Fraktion, in den im Verhaltenstraining befindlichen Tieren, annehmen.

Entgegen dieser Erwartung ließ sich jedoch in akut lernenden Tieren für das 55 kDa-Fragment eine Abnahme in beiden aufbereiteten Fraktionen verzeichnen. Verglichen mit den naiven Tieren war in der ECM-Fraktion für die NL-Gruppe und in der zellulären Fraktion für alle im initialen Lernen befindlichen Gruppen ein signifikant niedrigeres Fragment-Level zu erkennen (vgl. Abb. 3.5 A, C und Tab. A.3, A.4).

Für die Betrachtung des Volllängenbrevicans zeigte die RT-Gruppe signifikante Unterschiede zu Tieren der AV-Lernphase und gleichzeitig zu den NL-Tieren, die beide recht ähnlich in ihrer ECM-Zusammensetzung bezüglich des Volllängenbrevicans waren (siehe Abb. 3.5 B und Tab. A.3, A.4).

Die LTR-Gruppe war bei der Betrachtung des Volllängenbrevicans in beiden Fraktionen eher vergleichbar mit naiven Tieren (vgl. Abb. 3.5 B, D), signifikant unterschied sie sich in der zellulären Fraktion von allen im Anlernprozess befindlichen Tieren (vgl. Abb. 3.5 C und Tab. A.4).

Zusammengenommen könnte dies auf einen durch den initialen Lernprozess initiierten verstärkten metabolischen Abbau der Fragmente im ACx hindeuten. Möglicherweise findet nach erfolgreicher Akquisition der FM-Diskrimination eine Überkompensation des aus der ECM entfernten Brevicans durch Volllängenbrevican aus intrazellulärer Produktion statt. Ob dieser Abbau und die Überkompensation ausschließlich durch Neuronen vollzogen wird, oder Gliazellen ebenfalls an der Homöostase der extrazellulären Bereiche beteiligt sind, kann anhand der vorliegenden Daten nicht differenziert werden.

Diese Schlussfolgerungen sind in Übereinstimmung mit dem relativen Überschuss des Volllängenbrevicans, was ausschließlich in der RT-Gruppe in der ECM-Fraktion (Abb. 3.6 A) auftrat. Dies deutet auf eine Fixierung aufgetretener verhaltensrelevanter synaptischer Veränderungen durch eine erhöhte Sekretion des Volllängenproteins in den Extrazellulärraum hin. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Tiere, die nicht in der Lage waren die Verhaltensaufgabe zu erlernen (NL-Gruppe), diese Erhöhung im Extrazellulärraum nicht aufwiesen. Hier zeigte sich in der zellulären als auch der ECM-Fraktion biochemisch eine sehr ähnliche Brevicanverteilung wie in der AV-Gruppe. In der zellulären Fraktion zeigte sich ein lerninduziert signifikant höherer Überschuss an Volllängenbrevican, in allen im akuten Lernprozess befindlichen Gruppen und auch in der langfristig erneut abrufenden LTR-Gruppe, verglichen mit dem naiven Niveau (Abb. 3.6 A und Tab. A.5). Dies könnte auf eine lerninduzierte Brevican- bzw. ECM-Synthese hinweisen. Auch hier ist aus den Ergebnissen nicht ablesbar, welchen Anteil dabei Neuronen und Gliazellen übernehmen.

Schaut man sich nun die Verteilungen der Fragmente und Volllängenproteine

zwischen den beiden biochemisch betrachteten Fraktionen an, so zeigt sich Folgendes. Für die Verteilung der 55 kDa-Fragmente von Brevican war kein signifikanter Unterschied zwischen den Fraktionen zu verzeichnen. Das Volllängenprotein war nicht signifikant unterschiedlich zwischen naiven, AV-, AQ-, NL-, und LTR-Tieren. Jedoch unterschieden sich die Tiere der RT-Gruppe signifikant von den NL- und LTR-Gruppen (Abb. 3.6 B und Tab. A.6).

Der signifikant niedrigere Überschuss an Volllängenbrevican in der RT-Gruppe in der zellulären Fraktion (Abb. 3.6 B) und gleichzeitig größere Überschuss an diesem Protein in der ECM-Fraktion (Abb. 3.6 A), könnte dabei einen Hinweis auf die lernerfolgsabhängige Sekretion von intrazellulärem Brevican darstellen (vgl. auch Tab. A.5 und A.6).

Betrachtet man zusätzlich die konstante absolute Menge an Volllängenbrevican (Abb. 3.5 D) über alle Tiergruppen, könnte dies einen Hinweis auf eine lernerfolgsabhängige *de novo* Synthese von Brevican geben, wobei eine Selektion der an der Synthese beteiligten Zellen des ACx nicht möglich ist.

Trotz signifikanter Abnahme an absolutem 55 kDa-Fragment in der ECM-Fraktion der NL-Gruppe gegenüber der naiven Gruppe (Abb. 3.5 A; Tab. A.3), zeigte sich keine Veränderung des Überschusses an selbigem Fragment in der NL-Gruppe in der zellulären Fraktion. Ebenso zeigte sich keine Verringerung des Überschusses an Volllängenprotein verglichen mit den naiven, AV-, AQ- und LTR-Tieren (Abb. 3.6 B). Diese Ergebnisse zusammen weisen möglicherweise auf einen fehlenden oder evtl. gegensätzlich agierenden biochemischen Trigger hin. Potenziell trägt die dadurch verursachte fehlende Sekretion an Volllängenprotein in den Extrazellulärraum dazu bei, dass es den Tieren nicht möglich ist, die Diskrimination zu konsolidieren.

Die beschriebenen lernassoziierten Ergebnisse und Schlussfolgerungen für das Volllängenbrevican und dessen Verteilung zwischen der zellulären und ECM-Fraktion, lassen sich mit den TNR-Daten (Abb. 3.7; vgl. auch Tab. A.7, A.8) tendenziell untermauern. Es zeigte sich auch hier ein Anstieg des absoluten Levels an TNR in der ECM-Fraktion der RT-Tiere (Abb. 3.7 A), bei gleichem Niveau in der zellulären Fraktion (Abb. 3.7 B). Bei gleichzeitig stabilem Niveau in der zellulären Fraktion und tendenzieller Verschiebung des Überschusses an Volllängenprotein in Richtung ECM-Fraktion (Abb. 3.7 C), lässt sich vermuten, dass es auch für TNR eine verstärkte lernassoziierte Sekretion in den extrazellulären Raum gibt. Diese Sekretion könnte für die Festlegung des neu erlernten Verhaltens in ECM-Netzwerken, um veränderte Synapsen herum, relevant sein.

Die LTR-Gruppe scheint trotz des Einbruches in der Diskriminationsleistung am ersten Versuchstag nach der Pause, biochemisch betrachtet, keinen großen

Veränderungen zu unterliegen. Sie zeigte in allen Vergleichen (Abb. 3.5, 3.6, 3.7) keinen signifikanten Unterschied in den Verhältnissen der betrachteten Proteine verglichen mit naiven Tieren bzw. Tieren der AV-Gruppe. Dies könnte darauf hinweisen, dass in erfolgreich lernenden Tieren über das Lernen und die biochemischen Prozesse Verknüpfungen etabliert bleiben, während sich der Umsatz der ECM wieder in den Ausgangszustand zurück entwickelt zu haben scheint. Möglicherweise spiegeln die Befunde wieder, dass die ECM jedoch durch das erneute Abrufen der Verhaltensaufgabe wieder formbar gemacht wird, vergleichbar mit den frühen lernassoziierten Änderungen der AV-Gruppe.

4.2.4 Lernabhängige Dynamik der kortikalen ECM im adulten Gehirn

Wie im vorherigen Abschnitt erläutert, war allgemein lerninduziert eine Reduktion der 55 kDa-Fragmente von Brevican in beiden Fraktionen und ein allgemein erhöhter Überschuss an Vollängenbrevican in der zellulären Fraktion festzustellen. Des Weiteren waren die größten Veränderungen der ECM in Bezug auf Brevican und TNR in den Gruppen der RT-Tiere und NL-Tiere zu verzeichnen. Die RT-Tiere zeigten absolut erhöhte Mengen an Vollängenprotein in der extrazellulären Fraktion, vermutlich bedingt durch verstärkte Sekretion aus zellulären Vorräten und *de novo* Synthese der Proteine. Die NL-Gruppe entsprach biochemisch eher einem frühen Lernstadium wie der AV-Gruppe.

Wird ein Tier einem Verhaltensparadigma unterworfen, könnte an lerngekoppelt verstärkt aktiven Synapsen die Proteolyse von extrazellulärem Brevican durch seine spezifischen Proteasen (z. B. ADAMTS-4/5) erhöht werden. Dies könnte zur verstärkten Endozytose von 55 kDa-Brevican-Fragmenten und deren erhöhter Degradation bei tatsächlich FM-diskriminierenden Tieren führen. Als Folge könnte das wiederum extrazellulär und intrazellulär zu einer Erniedrigung der 55 kDa-Brevican-Fragmente, bei gleich hohem 145 kDa-Brevicanniveau (Abb. 4.1, Mitte) führen. Gleichzeitig könnte bei verhaltensabrufenden Tieren (RT-Gruppe) eine signifikante Sekretion an Vollängenbrevican stattfinden und dies sogar eine Überkompensation an 145 kDa-Brevican im ECM-Raum (Abb. 4.1, rechts) hervorrufen. In der zellulären Fraktion hingegen ist die Gesamtmenge an Vollängenbrevican in allen Lernphasen auf gleiches Niveau einreguliert. Einzig in Tieren, die das Erlernete konsolidieren (RT-Gruppe), zeigte sich eine Verschiebung des relativen Überschusses an Vollängenbrevican in Richtung der ECM-Fraktion (Abb. 3.6 B), was darauf schließen lässt, dass mehr Vollängenproteine hergestellt und zur Stabilisierung synaptischer Kontakte sekretiert werden könnten (Abb. 4.1, rechts).

Tiere, die die Diskrimination nicht vollständig lernten, zeigten aus den biochemischen und den Trainingsdaten heraus betrachtet, ein Zwischenstadium im Prozess des Lernens. Sie scheinen sich zwar in dem lerninduziert verschobenen homöostatischen Brevican-Stoffwechsel und damit in einem biochemisch prinzipiell lernbefähigten Status (Abb. 3.6 A) zu befinden, jedoch scheint aber die Freisetzung des für das Konsolidieren möglicherweise notwendigen Vollängenbrevicans in die ECM unterbunden zu werden.

Dies könnte in Zusammenhang mit dem auf dem naiven Niveau befindlichen 55 kDa-Verhältniss zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Raum und entsprechenden Signalkaskaden stehen. Signalmoleküle wie Dopamin oder Serotonin sind als relevante Moleküle im Lernverhalten von Gerbils mittels Mikrodialyse gezeigt worden (Stark & Scheich, 1997).

Wie beschrieben, ist die ECM am natürlichen Lernprozess im adulten Gehirn beteiligt und beeinflusst diesen. Der Einfluss ist mit Beginn des Trainings in der AV- und AQ-Phase zu erkennen, indem Brevican, als ein Vertreter der CSPGs, im ECM-Raum möglicherweise verstärkt proteolytisch geschnitten und intrazellulär degradiert wird. Wenn ein Tier die Verhaltensaufgabe tatsächlich erlernt hat, werden anschließend lerninduzierte Änderungen im ECM-Maschenwerk um die Neurone herum möglicherweise durch erhöhte Freisetzung von Vollängenbrevican fixiert. Interessanterweise scheinen diese Prozesse bei Tieren, die die Verhaltensaufgabe nicht vollständig erlernen, gestört oder limitiert zu sein. Für solche Tiere stellte sich nun die Frage, ob sich deren Lernleistung durch experimentelle Manipulation, mit dem Ziel einer Verbesserung, beeinflussen lässt.

4.3 Einfluss der experimentellen Modulation der ECM auf langzeitliche Gedächtniskonsolidierung

4.3.1 Verbesserung des Langzeitabrufs von Vorerfahrungen bei schwacher initialer Lernleistung

Das Testen des Langzeitabrufs von auditorischem FM-Diskriminationslernen eignet sich als Modell zur Untersuchung der Gedächtniskonsolidierung (Ohl et al., 1999). In den Experimenten des ersten Teils dieser Dissertation ist an Gerbils gezeigt worden, dass die experimentelle Degradation der ECM zwar das Umlernen der Kontingenz während einer FM-Diskrimination positiv beeinflusste, jedoch keinen Einfluss auf das Abrufen des Verhaltens nach Injektion und kontinuierlichem Training hatte. Des Weiteren war das initiale Akquisitionslernen nach HYase-

Injektion nicht beeinflusst. Tiere mit bilateraler HYase-Injektion im ACx vor Beginn des Trainings zeigten keinen signifikanten Unterschied im initialen Lernverhalten für diese Verhaltensaufgabe.

Im Gegensatz zu den Gerbils in der vorangegangenen Studie (Happel et al., 2014b), zeigten Mäuse im Gruppenvergleich etwas langsamere Lerndynamiken in der FM-Diskrimination. Hauptursache dafür war, dass bei Mäusen die interindividuellen Schwankungen größer schienen und einige Tiere die Diskrimination gar nicht erlernten (initial nicht lernende Tiere). Aus diesem Grund war es interessant zu testen, ob auch hier die ECM-Degradation keinen Einfluss auf das initiale Lernen hat. Des Weiteren wurde in diesem dritten Teil der Arbeit auch die Fähigkeit des Langzeitabrufs getestet, da die Gerbil-Studie keine Rückschlüsse über langzeitliche Einflüsse der Degradation der ECM erlaubte.

Für diese Untersuchungen wurden Gruppen von Mäusen trainiert und verglichen, die jeweils bilateral in den ACx mit 0,9 % Kochsalzlösung oder HYase injiziert wurden. Beide Gruppen zeigten in den CR-Raten signifikante Unterschiede in den Haupteffekten (vgl. Abschnitt 3.3, Abb. 3.8). Für die Reaktion auf die Go-Stimuli zeigte die Kontrollgruppe posthoc im RT-Plateau eine signifikant höhere Sprungquote als im LTR-Plateau sowie eine signifikant höhere Quote als die HYase-injizierte Gruppe im RT-Plateau. Für die Plateaus der NoGo-Reaktionen zeigte sich die Sprungrate der LTR-Phase der HYase-injizierten Gruppe als signifikant niedriger als die des LTR-Plateaus der Kontrollgruppe (Abb. 3.8 A, B). Aus dem Zusammenspiel beider Haupteffekte zeigte sich im Sensitivitätsindex d' eine Verbesserung des Gesamtverhaltens der HYase-injizierten Gruppe im Sinne der Abruffähigkeit für das initial erlernte Wissen nach einer Pause von etwa vier Wochen (jeweils LTR-Phase in Abb. 3.8 C, D).

Diese sichtbare Verbesserung der Abruffähigkeit für die Verhaltensaufgabe findet erstaunlicherweise lange nach Regeneration der ECM statt. In korrespondierenden immunhistochemischen Färbungen, an unilateral mit 0,9 %iger Kochsalzlösung und HYase in beide ACx injizierten naiven Mäusen, zeigte sich nach etwa 9 Tagen ein vergleichbar starkes Fluoreszenzniveau zwischen den injizierten Hemisphären. Nach 12 Tagen folgte einer Überkompensation der ECM, gezeigt durch ein signifikant höheres Niveau an WFA-Fluoreszenz in der Enzym-injizierten Seite (vgl. Abschnitt 3.4; Abb. 3.10 D).

Die Tiere der HYase-injizierten Gruppe zeigten im LTR ebenso wie die Kochsalz-injizierten Tiere einen Rückfall in die AV-Phase, anschließend jedoch eine signifikante Steigerung der Gesamtverhaltensantwort im d' -Wert. Zugrunde liegt diesem Verhalten eine schnellere Reduktion der FA-Rate, bei besserem Erinnern und damit gleich hoher Hit-Rate (Abb. 3.8) der HYase-injizierten Tiere verglichen mit den

0,9% Kochsalz-injizierten Tieren, was eine bessere inhibitorische Verhaltenskontrolle impliziert.

Abgeleitet aus den eben beschriebenen Zusammenhängen scheint es bei Mäusen, im Gegensatz zu den im ersten Teil dieser Arbeit beschriebenen Gerbils, Einflüsse der ECM-Degradation auf das Lernverhalten zu geben. Aus dem zweiten Abschnitt dieser Dissertation gibt es nun Hinweise darauf, dass die ECM auf den initialen Lernprozess Einfluss hat. Es zeigte sich, dass es eine Gruppe Tiere gab, die das Verhaltensparadigma initial nicht komplett erlernen konnte (NL-Gruppe, Abb. 3.4). Diese Gruppe unterschied sich zugleich biochemisch in ihrem ECM-Stoffwechsel signifikant für Brevican von den RT-Tieren (vgl. Abschnitt 3.2, Abb. 3.5, 3.6).

Deshalb stellte sich die Frage, ob diese bessere Verhaltenskontrolle ein genereller Effekt ist, oder ob er eher auf dem Einfluss des individuellen Lernverhaltens beruht?

4.3.2 Abhängigkeit von initialer Lernleistung und Verbesserung des Langzeitabrufs

Zur Untersuchung des Einflusses der individuellen initialen Lernleistung auf den Effekt der besseren Verhaltenskontrolle HYase injizierter Tiere wurden die Gruppen der injizierten Tiere, in initial lernende und initial nicht oder nur schwach lernende Tiere, getrennt.

Der Vergleich beider Gruppen zeigte folgende Ergebnisse auf. Initial gut lernende Tiere wurden durch die Injektion nicht beeinflusst, aber auch nicht limitiert im Lernprozess (vgl. Abschnitt 3.3, Abb. 3.9 A, B). Somit ist die Aussage, des nicht vorhandenen Einflusses auf das initiale Lernen aus der Gerbil-Studie des ersten Teils dieser Arbeit, bestätigt. Alle Gerbils in dieser Studie haben die FM-Diskrimination erfolgreich initial erlernt und sind deshalb in diesem Punkt nur mit den initial lernenden injizierten Mäusegruppen, des dritten Teiles dieser Arbeit, bis zur Pause vergleichbar.

Eine verbesserte Verhaltenskontrolle im LTR-Plateau des d' -Wertes, nach Injektion von HYase zwei Tage vor Trainingsbeginn, war bei initial schwach lernenden Tieren zu zeigen (vgl. Abschnitt 3.3, Abb. 3.9 A, C vs. B, D). Dieser positive Effekt ist jedoch nicht innerhalb der ersten 12 Tage nach Injektion sichtbar, sondern erst in der LTR-Phase. Es handelt sich für die HYase-injizierte Gruppe dabei nicht um ein instantanes Abrufen des vorher unter Degradation der ECM erlernten Verhaltens. Beide Tiergruppen zeigten wiederum den Rückfall in die AV-Strategie in der ersten Trainingssitzung nach der Pause und damit das gleiche Transitionsverhalten für

die AV-Strategien, wie alle trainierten Tiergruppen. Nur die initial nicht diskriminierende HYase injizierte Tiergruppe zeigte eine zeitlich vergleichbare Transition zur Diskrimination in der LTR-Phase (vgl. Abschnitt 3.3, Abb. 3.9 A, B, D).

Die flexiblere Anpassung des Verhaltens erfolgte in der LTR-Phase hauptsächlich für den NoGo-Ton (siehe Anhang Tab. A.13, Abb. B.1). Ausgeschlossen werden kann hier jedoch nicht, dass die Inhibition des Sprungverhaltens auf den NoGo-Stimulus in den letzten drei initialen Trainingstagen, also im Zeitfenster einer überschießenden ECM im ACx (vgl. Abschnitt 3.4; Abb. 3.10 D), die Grundlage für die spätere Leistungssteigerung darstellt.

4.4 Die Rolle der ECM in juvenilen und adulten Gehirnen zur Steuerung flexibler Verhaltensanpassungen

4.4.1 Entwicklungsabhängiger ECM-Einfluss zur Steuerung der Plastizität in verschiedenen Hirnarealen

Erfahrungsabhängiges Lernen findet auf unterschiedlichen hierarchischen Ebenen im Gehirn statt. Beteiligt sind immer mehrere Stationen wie z. B. subkortikale Kerngebiete wie die Amygdala, aber auch kortikale Bereiche wie primäre Areale von visuellem, auditorischem, somatosensorischem und motorischem Kortex. Primäre Areale gelten als primär sensorische Areale und wurden daher bisher nicht als sehr lernrelevant betrachtet. Vielmehr galt dies für sekundäre und höhere Areale der Großhirnrinde (z. B. PFC), die unter anderem auch die Umschaltung verarbeiteter Informationen in die motorischen Ausgangssysteme vollziehen.

Es sind ebenfalls Lernprozesse im juvenilen Entwicklungsstadium eines Tieres, von denen im adulten Stadium zu unterscheiden. Während im juvenilen Stadium eher grundlegende Orientierungskarten und Verschaltungen der sensorischen Systeme fixiert werden müssen, um sich in der Umwelt zurechtzufinden, werden im adulten Zustand eher kognitiv anspruchsvollere Aufgaben vom Gehirn dazugelernt. In diesem Fall ist eine höhere Stabilität mit geringerer Plastizität etablierter Systeme hilfreich, um zuvor Erlerntes nicht durch Neues wieder zu ersetzen, sondern dazu zu lernen. Im Folgenden wird an Studien die offenbar wichtige Rolle der ECM diskutiert, die sie in allen diesen Bereichen einzunehmen scheint.

Die Verfestigung der ECM beim Übergang vom juvenilen zum adulten Tier spielt eine wichtige Rolle für die korrekte Organisation topografischer Karten in

sensorischen Arealen der Großhirnrinde. Fehlerhafte Verknüpfungen, die bis zum Abschluss der kritischen Perioden, z. B. in der Natur durch periphere Verletzungen, entstehen und manifestiert werden, sind später nach der Maturierung der ECM intrinsisch nicht wieder lösbar. Experimentell wurde dies anhand der juvenil entstehenden Okulardominanz im visuellen Kortex gezeigt (Pizzorusso, 2002). Nach experimenteller monokularer Deprivation während der kritischen Periode, war die abnormale Verschaltung im visuellen Kortex im adulten Stadium nicht wieder herstellbar. Jedoch konnte in im adulten Zustand monokular deprivierten Tieren, durch experimentelle Degradation der ECM im visuellen Kortex, eine vergleichbare abnormale Verschaltung hervorgerufen und festgelegt werden.

Des Weiteren wurde an der subkortikalen Struktur der Amygdala gezeigt, dass die Manifestierung von Angstverhalten stark mit der Maturierung der ECM während der kritischen Periode zusammenhängt (Gogolla et al., 2009). Tiere, die bis nach Beendigung der kritischen Periode einer Angstkonditionierung unterzogen wurden, waren zwar in der Lage nach Extinktionslernen das Angstverhalten zu unterdrücken, jedoch zeigten sie sofort wieder dieses Verhalten bei einmaliger Wiederholung des negativ assoziierten Reizes. Juvenile Tiere, die dem gesamten Trainingszyklus inklusive Extinktion vor Beendigung der kritischen Periode unterzogen wurden, zeigten bei Präsentation des negativ assoziierten Stimulus in der Testphase kein Angstverhalten. Adulte Tiere, die jedoch mit ChABC vor Beginn des Trainings in die Amygdala injiziert wurden, zeigten ein mit juvenilen Tieren vergleichbar überschreibbares Angstgedächtnis. Wurde das Enzym jedoch nach dem initialen Angstverhaltenstraining injiziert und anschließend die Extinktion trainiert, so konnte das Angstverhalten nicht ausgelöscht werden. Elektrophysiologisch wurde an Hirnschnitten der ChABC injizierten Tiere 24 h nach Injektion gezeigt, das LTP monosynaptischer Exzitation und disynaptischer Inhibition negativ beeinflusst war.

Angstgedächtnisse werden zumindest teilweise in der Amygdala über LTP in synaptischen Korrelaten manifestiert. Durch nachträgliche Degradation der PNNs waren diese Gedächtnisse nicht beeinflussbar. Die Autoren spekulieren deshalb, ob PNNs die Netzwerkplastizität derart beeinflussen und stabilisieren, dass auslöschungsresistente Gedächtnisspuren manifestiert werden. Es wird aber in diesem Zusammenhang und aufgrund der elektrophysiologischen Daten darauf hingewiesen, dass andere Strukturen möglicherweise relevanter für das gezeigte Verhalten sind und deshalb die Beeinflussung durch die Enzyminjektion nicht zum Tragen kommt.

Diese und Daten der Gerbil-Studie im ersten Teil dieser Arbeit zeigten, dass ein Erlernen des Verhaltens nach experimenteller Degradation der ECM, im Ver-

gleich zu Kontrollversuchen ohne Degradation, nicht beeinflusst war. Allerdings steht die nicht vorhandene Auslöschung des Angstverhaltens in der Studie von Gogolla et al. (2009) im drastischen Widerspruch zu den Daten der Gerbil-Studie. Hier zeigte sich ein verbessertes Umlernvermögen für die FM-Diskrimination im Zeitfenster degradierter ECM im ACx. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die von den Autoren implizierte parallele und somit von der Degradation unbeeinflusste Verarbeitung des Verhaltens sein. Eine zweite Erklärung könnte in der Verwendung unterschiedlicher Enzyme liegen. HYase hat nur eine Halbwertszeit von wenigen Stunden und damit schließt sich das Fenster erhöhter Plastizität durch Reparaturmechanismen des Körpers nach etwa 10 Tagen (vgl. Abschnitt 3.4, Happel et al., 2014b), ChABC öffnet ein plastisches Fenster von mehreren Wochen oder Monaten (Brückner et al., 1998). Möglicherweise wird das umgelernte Verhalten der Gerbils durch die beginnende Re-Etablierung der ECM verfestigt.

In Zebrafinken wurde im sensomotorischen HVC-Gebiet (aus dem Englischen, *high vocal area*) gezeigt, dass das Erlernen der arttypischen Gesänge während der kritischen Perioden stattfindet. Abhängig von den Lernerfahrungen des Tieres schwankt die Anzahl der PV-haltigen Interneurone, die von PNNs umgeben sind, im betrachteten Kortexareal (Balmer et al., 2009). Einfacher strukturierter Gesang korrelierte mit weniger und komplexer strukturierter mit mehr PNNs im HVC bei den untersuchten Vögeln. Bei Tieren, die depriviert gegenüber arttypischen Gesängen waren, verlängerte sich die kritische Periode. Ebenso war das Gleichgewicht zwischen PV-haltigen und nicht PV-haltigen PNN umgebenen Neuronen verändert. Auch die Anzahl PV-haltiger Neurone und PNNs war geringer als in gleichaltrigen Kontrolltieren. Der Gesang Tutor-deprivierter Vögel, als motorisch-sensorisches Verhalten, konnte nach Injektion von ChABC in das untersuchte HVC-Areal nicht wieder auf das Niveau der nicht deprivierten Kontrolltiere gebracht werden. Die Ursache dafür wird von den Autoren darin vermutet, dass sie unter anderem die Balance zwischen Exzitation und Inhibition durch Degradation der ECM nicht beeinflussen können.

In allen Studien wurde die Ausbildung der adulten ECM in Form der PNNs in Zusammenhang mit der Balance zwischen Exzitation und Inhibition gebracht. In der ersten Studie (Pizzorusso, 2002) wurde auf physiologischer Ebene eine Veränderung der funktionalen Verknüpfungen im visuellen Kortex durch die experimentelle Modulation der ECM gezeigt. Eine im Verhalten sichtbare Beeinflussung der adulten Netzwerke durch experimentelle ECM-Modulation war jedoch nicht in jedem Fall gegeben. Schon bei subkortikal in der Amygdala verankertem Angstverhalten (Gogolla et al., 2009) war dies nur teilweise möglich, da möglicherweise andere Hirnstrukturen parallel das Verhalten codieren und somit trotzdem zur

Ausprägung brachten. Bei kognitiv anspruchsvollem, kortexabhängigem Lernen in Vögeln (Balmer et al., 2009) bestand nicht die Möglichkeit, durch Eröffnen einer sekundären plastischen Phase im HVC-Gebiet durch Injektion von ChABC, ein Umlernen von rudimentären, durch Deprivation entstandenen Gesangsstrukturen, zu natürlichen adulten Gesangsstrukturen hervorzurufen.

An dieser Stelle kann man spekulieren, ob artspezifisch relevante Tonfolgen schon im primären ACx oder adäquaten Gebieten erlernt und codiert werden. Eine Injektion ECM-degradierender Enzyme in sekundäre oder höhere Kortexareale zeigt dann möglicherweise keine Auswirkungen mehr, da die Relevanz der Tonfolgen nicht im primären Areal gespeichert ist und dadurch auch keine artspezifisch sinnvolle neue Verknüpfung im höheren Areal sichtbar wird.

In einem Verhaltensversuch zur Objektwiedererkennung mit adulten Mäusen (Romberg et al., 2013) wurde anhand des Vergleiches von Wildtyp-Tieren (WT) und Crtl1-KO-Tieren für das Hyaluronan-Proteoglykan-Link-Protein 1 (Hapln1/Crtl1) gezeigt, dass eine verminderte Dichte an PNNs das Erinnern zuvor gesehener Objekte bis zu 48 h verlängert. WT-Tiere zeigten dieses Verhalten im Abruf nach 24 h und 48 h nur nach vorheriger Injektion von ChABC in den perirhinalen Kortex, einer für Objekterkennung wichtigen Struktur. Weiterhin zeigten die Autoren durch elektrophysiologische Messungen *in vitro*, dass die Crtl1-KO-Mäuse eine erhöhte LTD des Feld-EPSPs (aus dem Englischen: *excitatory postsynaptic potential*) in Schicht II/III im perirhinalen Kortex aufwiesen (*paired-pulse*-Stimulationsparadigma). LTD im perirhinalen Kortex wurde zuvor schon mit der Objektwiedererkennungsfähigkeit in Primaten (Brown et al., 1987) in Zusammenhang gebracht. Die Studie schlussfolgert, dass eine verminderte Dichte an PNNs im perirhinalen Kortex entsprechend die Fähigkeit für kurzzeitigen Abruf von vorherigen Erfahrungen auf bis zu 48 h verlängert. Rückschlüsse auf eine langzeitliche Verankerung von Gedächtnisinhalten lassen diese wie auch alle vorher genannten Studien hingegen nicht zu.

Der Einfluss der ECM auf drogen- und futterinduzierte Ortspräferenz wurde in einer weiteren Studie (Xue et al., 2014) untersucht. Hierbei wurden adulte Ratten unter systemischer Applikation von Kokain, Heroin, Morphin, 0,9 % NaCl sowie durch Futtergabe darauf trainiert, den Ort der Drogengabe bzw. Futtergabe wieder zu erkennen. Nach dem Antraining wurde den Tieren ChABC in die Amygdala injiziert und nach Degradation der ECM deren Einfluss auf die Extinktion des Verhaltens getestet. Nach ChABC-Injektion in zwei Kerngebiete der Amygdala (basolaterale- und zentrale A.) jeweils vor dem Extinktionslernen konnte dabei nach 10 Tagen Training das drogeninduzierte konditionierte Aufenthaltsverhalten ausgelöscht werden. Das Erlernen und Abrufen von kokain- bzw. morphin-

induziertem Verhalten und zusätzlich das Rekonsolidieren von morphininduziertem Präferenzverhalten war nicht beeinflusst. Futterinduziertes Präferenzverhalten in einem neuen Kontext sequenziell zum morphininduzierten Verhalten erlernt, wurde nach erfolgreicher selektiver Extinktion des Morphinverhaltens unbeeinflusst weiter abgerufen. In einem weiteren Test wurde das futterinduzierte Präferenzverhalten nach Injektion und Extinktionstraining inhibiert, im Gegensatz zur Morphingabe aber nach erneuter Futtergabe, vergleichbar zu allen Kontroll- und Trainingsgruppen, unverändert wieder abgerufen. Gezeigt wurde in dieser Studie ebenfalls, dass ECM Degradation in der Amygdala Einfluss auf das Ortspräferenzverhalten für Kokain und Heroin nach Selbstapplikation hat. Nur Tiere, die mit dem Enzym injiziert wurden, zeigten schnelleres Extinktionsverhalten und nach dem Extinktionstraining weder spontane noch experimentell induzierbare Rückfälle des konditionierten Verhaltens.

Diese Studie zeigt in Übereinstimmung zu der Studie von [Gogolla et al. \(2009\)](#), dass möglicherweise bestimmte Verhaltensweisen, nach Erlernen des Verhaltens im adulten ECM-Zustand, durch nachträgliche ECM-Degradation in der Amygdala und anschließendem Extinktionslernen nicht ausgelöscht werden können. Drogeninduziertes konditioniertes Verhalten scheint diesem Phänomen in der Amygdala nicht zu unterliegen.

Auch diese Studie lässt nur wenige Schlüsse auf Langzeitverankerung von Gedächtnisinhalten zu. Bis auf eine sich selbst stimulierende Tiergruppe wurden alle Rückfall Testdaten unter Degradation der PNNs in der Amygdala erhoben (12 bzw. 13 Tage nach Injektion), also in einem Fenster sehr hoher ECM bedingter Plastizität. Die auf spontanen Rückfall getestete Tiergruppe zeigte 40 Tage nach Injektion des Enzyms ebenso wie die rückfallinduzierten Gruppen nach etwa 14 Tagen ein signifikant reduziertes Rückfallverhalten. Dies zeigt, dass die ECM-Degradation mit ChABC ein recht schnelles Umlernen und Konsolidieren ermöglicht, auch wenn nach 4 Wochen die ECM nicht vollständig regeneriert zu sein scheint, wie in [Brückner et al. \(1998\)](#) in kortikalen Bereichen der Ratte gezeigt wurde.

WB-Analysen der Amygdala 24 Stunden nach Extinktionslernen unter ChABC-Behandlung zeigten, dass die PNN-Degradation ausreichend für die Erhöhung der Levels von BDNF, GluR1 und GluR2 war. Da BDNF und AMPA-Rezeptoren eine wichtige Rolle für die Auslöschung drogeninduzierter Gedächtnisse spielen ([Sutton et al., 2003](#)) spekulieren die Autoren, dass die PNN-Degradation metaplastische Zustände ermöglicht die das Extinktionstraining fördert und dem Rückfallverhalten vorbeugen könnte. Diese Studie zeigt ebenfalls, dass bestimmte basale Verhaltensweisen, wie die Futtersuche, trotz experimenteller Degradation der ECM in bestimmten Kerngebieten nicht auslöschar sind.

In Hippocampusschnitten von KO-Tieren für TNF wurde gezeigt, dass sie Defizite für LTP in der CA1-Region aufweisen (Bukalo et al., 2001). Gleichzeitig wurde auch gezeigt, dass die Degradation der ECM mit ChABC zu sehr ähnlichen Resultaten in WT-Tieren führte, jedoch in TNF-KO-Tieren keinen Einfluss auf die LTP zeigte. KO-Tiere für HAPLN1/Crt11, die schwächer ausgeprägte PNNs im perirhinalen Kortex aufweisen, zeigten ein verbessertes Langzeitgedächtnis für die Objektwiedererkennung. Lokale Injektion von ChABC in diese Region hatte, zeitlich begrenzt, in WT-Tieren denselben gedächtnisverlängernden Effekt (Romberg et al., 2013). Einschränkend ist allerdings für alle konstitutiven KO-Modelle, dass kompensatorische Mechanismen nicht ausgeschlossen werden können.

Im adulten, alternden Gehirn ist es im Zusammenhang mit der ECM auch notwendig sich mit pathologischen Veränderungen zu beschäftigen. Altersbedingte Demenzerkrankungen, wie z. B. Morbus Alzheimer, werden auch in Hinsicht auf die Beteiligung der ECM am Krankheitsbild sehr kontrovers diskutiert. Morawski et al. (2012) geben in ihrer Einleitung eine Zusammenfassung dieser Diskussion. So sind Matrixkomponenten an der Bildung der Amyloid Beta ($A\beta$)-Plaques beteiligt, gleichzeitig allerdings interagiert das Amyloidprotein mit Cofaktoren in der ECM, zu denen Glukosaminoglykane (GAGs) und Proteoglykane (PGs) gehören. Auch ist gezeigt, dass Amyloidproteine zerstörerische Wirkung auf die ECM haben, was als Folge eine Störung der physikochemischen Eigenschaften der ECM hat. Der umgekehrte Fall, Zerstörung normaler ECM durch freie Radikale, Entzündungsreaktionen oder falsch gesteuerten Abbau durch MMPs, ist aber ebenso vorstellbar.

Im Ergebnis dieser postmortalen Untersuchung im visuellen Kortex menschlicher Gehirne (Morawski et al., 2012) resultierte die Aussage, dass ECM-Proteine, die mit stark aggrecanassozierten PNNs und stark brevicanassozierten perisynaptisch-axonalen Ummantelungen, in ihrem Auftreten nicht beeinflusst waren. Dies weist auf die Aufrechterhaltung ihrer physiologischen Rolle hin, die möglicherweise auch die neuroprotektiven Eigenschaften umfasst. Hyaluronan wurde vermehrt in $A\beta$ -Plaques identifiziert und in Verbindung mit der Reorganisation neuronaler Strukturen sowie auch von Gliazellinteraktionen mit den Plaques gebracht.

Die in Morbus Alzheimer-Patienten zuerst auftretenden Gedächtnisverluste und kognitiven Einschränkungen treten schon vor dem ersten Erscheinen von $A\beta$ -Plaques in gedächtnisrelevanten Strukturen wie dem Hippocampus auf. Die klinische Festlegung der Erkrankung findet aber erst anhand der $A\beta$ -Plaques statt (Végh et al., 2014). So sind für die Untersuchung auch der präklinischen Einschränkungen der Erkrankung, in Plastizität und Gedächtnis, einige Tiermodelle entwickelt worden.

In der Studie von Végh et al. (2014) konnte gezeigt werden, dass ECM-Proteine wie Neurocan, Brevican, TNF und HAPLN1 in Alzheimer-Modell Tieren (APP/PS1-Mäuse) ab einem Alter von 3 Monaten stärker ausgeprägt werden, zu einem Zeitpunkt an dem noch keine A β -Plaques im CA zu erkennen sind. Zu diesem Zeitpunkt weisen unbehandelte Tiere im Vergleich zu WT-Tieren schon erste Lerndefizite für Angstkonditionierung auf, was dem präklinischen Einschränkungsbild des Menschen als adäquat gilt.

Durch Injektion von ChABC lokal in den CA der 3 Monate alten APP/PS1-Tiere zeigten diese Tiere wildtypisches Angstverhalten nach Konditionierung. In der Studie wurden zusätzlich, 24 h - 48 h nach ChABC-Injektion in den CA, Feld-EPSPs in der CA1-Region in Hirnschnitten gemessen. Es zeigten sich keine Unterschiede mehr zwischen Hirnschnitten ChABC-injizierter APP/PS1- und WT-Tiere. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass die ChABC-Behandlung 3 Monate alter APP/PS1-Mäuse sie vor frühen physiologischen und Verhaltensdefiziten bewahrt.

Bei Morbus Alzheimer scheint also die Balance des Auf- und Abbaus der ECM gestört zu sein. Diese ist für Lernprozesse von entscheidender Bedeutung, wie in den Experimenten zu dieser Arbeit gezeigt wurde. Lernprozesse scheinen nur zu funktionieren, wenn der metaplastische Grundzustand der ECM durch aktivitätsabhängige Exozytose von Proteasen auf synaptischem Level beeinflusst wird (Frischknecht et al., 2008). Die dadurch möglicherweise induzierte Proteolyse könnte Signalmoleküle freisetzen, die ihrerseits die intrazelluläre Produktion von Vollängenproteinen, wie Brevican oder TNF, hochregulieren. Dies könnte im späteren Verlauf deren selektive synaptische Freisetzung zur Verfestigung der ECM bewirken.

Im Falle von Morbus Alzheimer scheint eine globale Verfestigung einzusetzen, die dann neben dem Plastizitätsverlust, eventuell als Folge, die Anreicherung von z. B. A β -Proteinen zu Plaques ermöglicht. Wie in dem Übersichtsartikel von Ariga et al. (2010) zur Rolle von PGs und GAGs beschrieben, fördern diese Moleküle durch ihre sulfathaltigen Seitenketten die Aggregation von A β -Proteinen. Unter normalen Bedingungen beeinflussen PGs und GAGs die Assemblierung der Matrix, regulieren Hydratation und Wasserhomöostase in Knorpel, halten Strukturen und Funktionen aufrecht, modulieren Wachstumsfaktorenaktivität und regionale inflammatorische Prozesse, beeinflussen Gewebereparaturen und Remodulierung (Ariga et al., 2010). Möglicherweise spielen PGs in Verbindung mit inflammatorischen Komponenten, in den bei Morbus Alzheimer typischen Plaques, eine Rolle bei Gehirnentzündungen und Pathogenese dieser und anderer neurodegenerativer Erkrankungen (Leveugle & Fillit, 1994).

Aus dem bisher Beschriebenen kann man schlussfolgern, dass das ganze ECM-

System hochgradig reguliert werden muss und sich im Alzheimer-Krankheitsbild durch fehlgesteuerte Mechanismen immer weiter pathologisch aufschaukelt.

Zusammenfassend stellt die ECM eine Struktur des Gehirns dar, die beim Übergang vom juvenilen zum adulten Individuum erfahrungsbedingte Gedächtnisse und Verhaltensweisen stabilisiert. Dies geschieht auf Kosten der hohen juvenil vorhandenen Flexibilität, birgt aber im adulten Tier den Vorteil eines stabilen Langzeitgedächtnisses. Dabei bleibt das System individuell adjustierbar und flexibel genug, um kognitiv anspruchsvolle Aufgaben weiterhin zu erlernen.

Auch an typischen Alterserkrankungen wie dem Spektrum der Demenzerkrankungen, von denen hier nur Morbus Alzheimer thematisiert wurde, ist die ECM mit beteiligt. Hierbei spielt die im Laufe des Lebens immer weiter fortschreitende Verfestigung eine wichtige Rolle. Fehlerhafte Steuerungen zur Freisetzung von ECM-Proteinen aus der Familie der PGs und GAGs könnten mit Ursache der parallelen bzw. induziert vermehrten Einlagerung krankheitsrelevanter Proteine wie $A\beta$ sein. Durch die bekannten nachteiligen Eigenschaften, die die natürliche altersbedingte Verfestigung der ECM im Sinne der langzeitlichen Speicherung neuer und auch im Abrufen alter Gedächtnisinhalte mit sich bringt, könnte die ECM auch bei Demenzerkrankungen eine wichtige Rolle spielen.

4.4.2 Zugrunde liegende zelluläre Mechanismen der plastischen Anpassung nach dynamischer ECM Modulation

Der Einfluss der ECM auf neuronale Plastizität prägt unterschiedliche Verhaltensweisen nachhaltig. Entsprechend sind auch kurz- wie langfristige Änderungen der molekularen und zellulären Prozesse in den entsprechenden neuronalen Schaltkreisen zu erwarten. In der Literatur sind einige solcher Mechanismen beschrieben, die auf zellulärer Ebene plastische Anpassungen an dynamische ECM-Modulationen beschreiben. In [Frischknecht et al. \(2009\)](#) wird die ECM als passive Diffusionsbarriere vorgeschlagen, die unterschiedlich große Oberflächenbereiche an Synapsen modelliert. So ist als Grundlage kurzzeitlicher plastischer Änderungen der synaptischen Übertragung die laterale Mobilität von AMPA-Rezeptoren in Synapsen hippocampaler primärer Zellkulturen nach Verdau der ECM durch HYase erhöht. Durch den erhöhten Austausch von desensitivierten mit naiven Rezeptoren ist eine verringerte Abschwächung kurz aufeinander folgender Aktionspotenziale, im Zuge eines sogenannten *paired puls depression* (PPD)-Protokolles nach lokaler Applikation von Glutamat, beschrieben worden.

Die Autoren spekulieren über unterschiedliche Mechanismen. Die Größe des AMPA-Rezeptorreservoirs ist bei dieser Betrachtungsweise ebenso entscheidend

für die synaptische Übertragung, wie die Zusammensetzung der ECM-Barriere. Es würde gelten: Je größer das mobile Rezeptorreservoir desto resistenter wäre die Synapse gegen PPD. Somit könnten über die Rekrutierung von ECM-Molekülen subtil die synaptischen Eigenschaften aktivitätsabhängig moduliert werden. Eine zweite Möglichkeit der Einflussnahme der ECM könnte ihre hohe negative Ladung sein, die evtl. einen großen Einfluss auf Glutamat-Signale aufgrund der Beeinflussung der Glutamat-Beseitigung im synaptischen Spalt haben.

Für die Orchestrierung der ECM in diesem Rahmen werden transmembrane Proteine genannt, die mit dem Zytoskelett in Verbindung stehen, somit könnte das System von intrazellulärer als auch extrazellulärer Seite beeinflusst werden.

Lerninduzierte ECM-Veränderungen könnten über die Wirkung von Dopamin an D1/D5-Rezeptoren verursacht werden und dabei quasi parallel mehrere lernrelevante zelluläre Signalkaskaden aktivieren. D1-Rezeptoren bilden in Hippocampusneuronen dynamische Cluster mit NMDA-Rezeptoren an glutamatergen Synapsen. Aufgrund der Ausschüttung von Dopamin zerfallen diese Cluster und die laterale Diffusion der NMDA-Rezeptoren wird erhöht. Dabei werden die NMDA-Rezeptoren verstärkt in die Postsynaptische Dichte der Synapsen integriert und LTP gesteigert (Ladepêche et al., 2013). Die Ausprägung von LTP über D1-NMDA-Rezeptor-Cluster könnte unter anderem über kalziumabhängige Mechanismen und Aktivierung von CaMKII ablaufen (Nai et al., 2010). Kurze Stimulation von D1-Rezeptoren in PFC-Neuronen bewirkt PKA-abhängig eine verstärkte extrasynaptische Oberflächenexpression von AMPA-Rezeptoren mit GluR1-Untereinheiten. Diese Kanäle könnten durch die beschriebene laterale Diffusion verstärkt NMDA-abhängige LTP erzeugen. Somit könnten D1-Rezeptoren an der LTP-Verstärkung, über erhöhte extrasynaptische Freisetzung von AMPA-Rezeptoren, beteiligt sein (Sun, 2005).

In der Studie von Karunakaran et al. (2016) wurde der Einfluss von Dopamin über D1/D5-Rezeptoren in hippocampalen parvalbuminhaltigen Korbzellen auf den Lernprozess eines Angstverhaltensparadigmas untersucht. Es wurde gezeigt, dass lernevozierte D1/D5-Dopamin-Rezeptorsignale über 12-14 Stunden nach Akquisition des Verhaltens anhalten, um Langzeitgedächtnisse zu etablieren. Dabei wurde gezeigt, dass die Proteinkinase ERK in PV-Korbzellen phosphoryliert und damit aktiviert wird. Auch c-Fos als Cofaktor von Transkriptionsfaktoren wird in Pyramidenzellen verstärkt exprimiert. Die Aktivierung von ERK durch ADAMTS-4/5, ausgelöst durch proteolytische Auflockerung der ECM, wurde in Kortexzellkulturen bereits im Zusammenhang mit dem Auswachsen von Axonen gezeigt (Hamel et al., 2008).

Synaptische Plastizität wird neben der Modulation synaptischer Übertragung

auch durch physiologische Umformung erzeugt. Wachstumsfaktoren wie BDNF könnten an der synaptischen Plastizität, in Zusammenhang mit ECM-Modulation, eine Rolle spielen (Iwakura et al., 2008). Hier wurde gezeigt, dass nach Aktivierung von D1-Rezeptoren TrkB- und Ca^{2+} -abhängige Mechanismen aktiviert werden. ECM-modulierende Enzyme, die Metalloproteasen, sind dabei wichtige Faktoren. ADAMTS-4/5 spielt für die homöostatische Plastizität eine wichtige Rolle (Yamaguchi, 2000). Der am besten untersuchte Vertreter der Metalloproteasen ist MMP9. Ein Zielmolekül ist unter Aktivierung von synaptischen Netzwerken β -DG, welches direkt oder indirekt an ERK- und FAK- Kaskaden (LTP) gekoppelt und auch an der Veränderung der Morphologie synaptischer Dornen über das Actin-Zytoskelett beteiligt ist (Michaluk et al., 2007).

Wie in einem Überblicksartikel von Kim et al. (2011) beschrieben haben viele verschiedene Moleküle der ECM, wie Tenascin und Brevican, vermittelt durch in der ECM vorhandene Wachstumsfaktoren, Wechselwirkungen mit Integrinen, die als Transduktionsmoleküle ins Zellinnere fungieren und intrazelluläre Wachstumsmechanismen beeinflussen. TNR kann dabei je nach Ligand und Rezeptormolekül (z. B. CSPGs, Contactin) mit dem es interagiert unterschiedliche Funktionen verwirklichen. Diese reichen von Effekten auf die Zelladhäsion und neuronale Migration, bis hin zur Regulation von Zell-Matrix-Interaktionen (Brösicke & Faissner, 2015).

Brevican ist Zielmolekül unter anderem der Metalloproteasen ADAMTS4/5 (Valenzuela et al., 2014) und der Umsatz an Brevican wird induziert durch LTP gesteigert (Jeet Singh, unpublizierte Daten). Kürzlich wurde in unserem Institut, ebenfalls *in vitro*, die dopaminabhängige und über D1/D5-Rezeptoren gekoppelte verstärkte Proteolyse von Brevican gezeigt (Jessica Mitlöhner, unpublizierte Daten). Dies impliziert, dass über den lernrelevanten Neurotransmitter Dopamin direkte und aktivitätsabhängige Modulationen der ECM möglich sein könnten. Durch die verstärkte Proteolyse von ECM-Proteinen könnten Fragmente entstehen, die wiederum Signalgeber für die Aktivierung intrazellulärer Kaskaden sein könnten. Über z. B. Integrine (siehe Kim et al., 2011) vermittelt könnten verschiedenste zuvor beschriebene intrazelluläre Mechanismen (vgl. z. B. Frischknecht et al., 2009) aktiviert werden.

4.4.3 Regulation der ECM zur Verfestigung adulter Lernprozesse und der Gedächtniskonsolidierung

Die Änderung der ECM im Laufe der Hirnreifung ist von entscheidender Bedeutung für die Fixierung von funktionalen neuronalen Schaltkreisen im adulten Ge-

hirn. Die im Zuge der ersten Erfahrungen etablierten und somit konservierten Verknüpfungen sind eine wichtige Voraussetzung für unsere stabile Wahrnehmung der Umwelt. Für die flexible Anpassung an immerwährende Änderungen der Umwelt spielt die ECM eine essenzielle Rolle. In Experimenten von Pizzorusso (2002) zeigte sich wie wichtig die durch die ECM hervorgerufene Änderung der Hirnplastizität im Zuge des Schließens der kritischen Phasen ist. Durch monokulare Deprivation während dieser Phasen konnten experimentell Fehlverschaltungen im visuellen Kortex manifestiert werden. Ebenso konnten an adult monokular deprivierten Tieren, durch Degradation der ECM in dieser Region, ähnliche experimentelle Fehlverschaltungen hervorgerufen werden (Pizzorusso, 2002).

Ähnliche entwicklungsabhängige Änderungen der Flexibilität in der Anpassung fanden andere Studien ebenfalls, zum Beispiel bei der Generierung und Auslöschung von Angstgedächtnissen (Gogolla et al., 2009). Es wurde zuvor verdeutlicht, dass nicht jede Form neuronaler Plastizität im adulten Tier durch den Verdau der ECM gefördert wird. Das Erlernen und Wiedergeben von Vogelgesängen ist eine kognitiv sehr anspruchsvolle Lernleistung, die bei Zebrafinken im HVC-Gebiet verankert wird (Balmer et al., 2009). Eine Degradation der ECM in diesem sensomotorischen Areal ermöglicht es Zebrafinken nicht ihre arttypischen Gesänge wieder zu erzeugen, wenn sie diese nicht bis zum Ende der kritischen Periode durch einen Tutor gelernt haben (Balmer et al., 2009). Offen bleibt bislang, ob die Komplexität der Verhaltensaufgabe bzw. das hohe Maß an sensomotorischer Integration, welche für das Gesanglernen notwendig ist, die Unterschiede zu anderen entwicklungsabhängig erworbenen Verhaltensweisen erklärt. Auch wie die ECM dieses System beeinflusst ist nicht endgültig beantwortet.

Neben entwicklungsabhängigen Lernprozessen konnten einige neuere Studien zuvor aufzeigen, dass auch assoziative Lernprozesse im adulten Gehirn durch die ECM beeinflusst werden. Dabei scheinen kognitiv einfache Lernleistungen ebenfalls nicht in jedem Fall durch eine Degradation der ECM in entsprechend beteiligten Hirnarealen beeinflussbar. Sind Gedächtnisinhalte vermeintlich parallel in mehreren Strukturen verankert, so lässt sich bereits fixiertes Angstgedächtnis nicht durch experimentelle Degradation in der Amygdala, einer der beteiligten Strukturen, und anschließendem Extinktionstraining beeinflussen (Gogolla et al., 2009). Auch Ortspräferenzverhalten lässt sich nicht in jedem Fall beeinflussen. In der Amygdala codiertes drogeninduziertes konditioniertes Aufenthaltsverhalten ist durch experimentelle Degradation der ECM in diesem Hirnareal beeinflussbar, jedoch futterinduziertes Präferenzverhalten nicht (Xue et al., 2014).

Es könnte sich hier also ein signifikanter Unterschied zwischen adult erweitertem Wissen, was auf juvenil erlerntem und lebensnotwendigem Verhalten basiert,

und rein im adulten Zustand neu erworbenen Wissens zeigen. Adult erworbene Verhaltensweisen könnten also leichter durch Modifikation der ECM beeinflussbar sein. Auf die Objektwiedererkennung haben die besonders um PV-haltige Interneuronen dicht gepackten PNNs im perirhinalen Kortex großen Einfluss. Es wurde gezeigt, dass Verminderung der PNN-Dichte in diesem Kortexareal die Wiedererkennung von Objekten um bis zu 48 h verlängert (Romberg et al., 2013). Hier wurde also gezeigt, dass eine Steigerung der Plastizität im Kortex, eine Verhaltensanpassung aufgrund Trainings verursachen kann. Ebensolche Effekte konnten im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt werden, denn nur Gerbils deren ECM im ACx degradiert war, konnten innerhalb dieses Fensters höherer Plastizität die FM-Diskrimination umlernen. Gleichzeitig konnte an Kontrollgruppen aber nachgewiesen werden, dass es sich um keine einfache Auslöschung und nachfolgendes neu Erlernen handelt, da die Tiere das vorher erlernte Verhalten auch nach Degradation der ECM weiter abrufen konnten (vgl. Happel et al., 2014b). Was beide Studien jedoch offen ließen, ist die Untersuchung der langzeitlichen Wirkung der höheren Plastizität im Kortex, als auch intrinsische Einflüsse der ECM während der Lernprozesse.

Den Änderungen von erlernten Verhaltensweisen durch Modulation der ECM müssen auf molekularer Ebene transiente Veränderungen zugrunde liegen. Die in Abschnitt 4.4.2 beschriebenen molekularen Mechanismen zielen dabei eher auf Anpassungen im Sinne der Kurzzeitplastizität ab, beispielsweise im Zuge der Verstärkung von LTP und LTD. Für plastische Prozesse scheinen dabei Matrixmetalloproteasen wie ADAMTS-4/5 eine wichtige Rolle zu spielen (vgl. dazu Frischknecht et al., 2009; Valenzuela et al., 2014). Die experimentelle Aktivierung von Dopamin-D1/D5-Rezeptoren am Fuß von Synapsen nimmt z. B. Einfluss auf NMDA- und AMPA-Rezeptoren (Ladepêche et al., 2013). Dabei werden über verschiedene Mechanismen intrazellulär mehr NMDA-Rezeptoren mit anderer Domänenzusammensetzung bereitgestellt und auch die Aggregation in den aktiven Zonen der Synapse beeinflusst. Wachstumsfaktoren, die in die ECM-Struktur eingebettet sind, spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der kurzfristigen morphologischen Anpassung synaptischer Kontakte (Iwakura et al., 2008). Sie werden durch aktivitätsabhängig in der näheren Umgebung der Synapsen wirkende Metalloproteasen für die Signalbildung an den Zellen verfügbar, ebenso wie ECM-Moleküle die durch Proteolyse entstehen. Die Signalübertragung findet z. B. über β -DG (Michaluk et al., 2007) und Integrine (Kim et al., 2011) statt, die direkt oder indirekt mit dem Actin-Zytoskelett in Verbindung stehen und somit in morphologische Veränderungen der Zellen involviert sind.

Die hier vorliegende Arbeit ermöglicht es, die bisweilen widersprüchlichen Befunde aus der Literatur zu einem differenzierten und kohärenten Bild des Einflus-

ses der kortikalen ECM und ihrer Rolle beim adulten Lernen zusammenzuführen. [Romberg et al. \(2013\)](#) konnten eine Verbesserung der Merkfähigkeit für Objekte durch Degradation der ECM im perirhinalen Kortex im Bereich bis zu 48 h zeigen. Die Rolle der ECM im sensorischen Kortex für perzeptuelles Lernen und auch langzeitliche Effekte waren aber weiterhin unklar.

Wie im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit gezeigt ist der initiale Anlernprozess, für vom sensorischen Kortex abhängiges perzeptuelles Lernen, wie bei der FM-Diskrimination, durch Degradation der ECM im sensorischen Kortex akut nicht beeinflussbar. Einen Unterschied hierzu findet man bei der kognitiv noch komplexeren Aufgabe des Umlernens der Kontingenzen zweier physikalisch gleicher FM-Stimuli. Nur durch experimentelle Abschwächung der ECM vor der Umlernphase ist es den Tieren möglich, gegen die sonst intrinsisch hohe Stabilität nach Erwerb des Gedächtnisses, die Verhaltensaufgabe neu zu interpretieren und das korrekte Verhalten zu etablieren ([Happel et al., 2014b](#)).

Aufbauend auf dem komplexen Lernparadigma, der FM-Diskrimination in der Shuttlebox, sollte im zweiten Teil dieser Arbeit das initiale Lernverhalten und die zugehörigen intrinsischen ECM-Veränderungen untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich intrinsische Umbauprozesse in der ECM des ACx der Tiere vollziehen. Unabhängig vom Lernniveau scheint die anfängliche Modulation der ECM generell ähnlich vonstattenzugehen. Für eine erfolgreiche Akquisition bzw. Konsolidierung des Verhaltens scheint jedoch nicht die anfängliche Auflockerung der ECM, sondern vielmehr die Verfestigung des nativ plastischen Zustandes, durch Freisetzung von Vollängenproteinen in den ECM-Raum, entscheidend zu sein. Findet diese Freisetzung von Brevican und tendenziell auch TNR als Vollängenproteine nicht statt, findet weder eine Konsolidierung der FM-Diskrimination statt, noch wird im Langzeitabruf eine entscheidende Verbesserung des Verhaltens bewirkt.

Es ist also anzunehmen, dass zusätzlich zur ECM-Mobilisierung auch mechanistische Trigger, wie z. B. Dopamin, den Unterschied zwischen einem lernenden und einem nicht lernenden Tier ausmachen. Werden Tiere einem Lernparadigma unterworfen, wird die auf das assoziative Lernverhalten positiv wirkende Substanz Dopamin im ACx freigesetzt, wie durch Mikrodialyse im ACx im auditorisch lernenden Gerbil gezeigt wurde ([Stark & Scheich, 1997](#)).

Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass ein Agonist für Dopamin-Rezeptoren des Typs D1 bei systemischer Applikation den Lernprozess für die FM-Diskrimination in Gerbils signifikant in den ersten Tagen des initialen Lernens steigern kann, jedoch bei späterer Gabe keinen signifikanten Einfluss mehr hat ([Schicknick et al., 2008](#)). Dies zeigt, dass adultes Lernen offensichtlich in engem

Zusammenhang mit dem Neurotransmitter Dopamin steht. Es ist wichtig für die Abspeicherung von initial Erlerntem und hat Einfluss auf wichtige biochemische Regelkreise, wie z. B. mTOR. Dieser Regelkreis umfasst u. a. die *de novo* Proteinbiosynthese, Nukleotidsynthese und Lipidsynthese (Shimobayashi & Hall, 2014; Schicknick et al., 2008). Dopamin hat speziell D1/D5-Rezeptor-vermittelt über PV-haltige Interneuronen Einfluss auf die Langzeitkonsolidierung von Erlerntem (Karunakaran et al., 2016). Durch lang anhaltende Aktivierung dieser Neuronen wird u. a. ERK-vermittelt verstärkte Ripple-Aktivität erzeugt, die wiederum in Pyramidenzellen verstärkt c-Fos-Aktivierung verursacht. Die Aktivierung einer solchen Masse an biochemischen Synthesekreisläufen in den Zellen des Gehirns impliziert eine Beeinflussung der Konsolidierung von erlerntem Verhalten, Tage nach der eigentlichen Akquisition.

Für die Umbauprozesse der beteiligten neuronalen Netzwerke ist der Umbau der ECM, als die Zellen des Gehirns umspinnendes Molekülnetz, sehr wahrscheinlich. In der Literatur gibt es aber nur wenige Angaben dazu.

In einer Untersuchung von Nagai et al. (2004) wurde das Zusammenspiel von Dopamin mit direkt an ECM-Proteolyse beteiligten Faktoren (tPA, *tissue plasminogen activator*) in lernassoziierten Gebieten des Gehirns von Ratten gezeigt. Induziert durch systemische Morphingabe, und damit stark erhöhter Dopaminausschüttung im Nucleus Accumbens, wurde in den anatomisch verknüpften lernassoziierten Gebieten, wie u. a. frontaler Kortex, Striatum und Hippocampus, eine signifikant erhöhte tPA-mRNA-Expression gemessen.

Das Beschriebene impliziert somit eine wichtige Rolle der ECM in Lernprozessen. Die ECM ist als PNNs zum Großteil besonders dicht gepackt um PV-haltige Neuronen anzutreffen. Es scheint also denkbar, dass gerade die inhibitorischen Schaltkreise eine wichtige Rolle im Zusammenspiel natürlicher aktivitätsabhängiger ECM-Plastizität, gesteuert über z. B. D1/D5-Rezeptoren, und bei adultem Lernen spielen.

Bei der Betrachtung der Masse an biochemischen Prozessen, die beim Lernen induziert werden, darf ein Punkt nicht unterschlagen werden. Neben den auf das Lernen positiv wirkenden Mechanismen mit der Beteiligung von Dopamin über möglicherweise die D1/D5-Rezeptoren, könnten andere Transmitter wie das Serotonin zumindest bei einigen Tieren den positiven Effekt des Dopamins beeinträchtigen. Stark & Scheich (1997) zeigten neben der kurzzeitigen starken Dopaminfreisetzung, gleichzeitig auch länger anhaltend eine erhöhte Serotoninfreisetzung. Dieser Neurotransmitter ist stark in Angstverhalten involviert, was bei aversivem Shuttleboxtraining sicher auch eine Rolle spielt.

Möglicherweise ist der Unterschied zwischen Tieren, die die FM-Diskrimination

erlernen oder eben nicht erlernen, in der Balance zwischen den vermeintlich gegenläufig agierenden Botenstoffen zu suchen. Die Balance zwischen all diesen Faktoren und biochemischen Kaskaden könnte aktivitätsabhängig die Modulation der ECM beeinflussen und damit den adulten Tieren zum Lernerfolg verhelfen oder ihn eher behindern.

4.4.4 Dynamische Regulation lernabhängiger Plastizität im adulten Gehirn

In dieser Dissertation wurden erstmalig Trainingsdaten und Einflüsse der ECM auf das Verhalten von Tieren, in verschiedenen Betrachtungsebenen in Verbindung gebracht. Dabei wurden Versuche eines reversen FM-Diskriminationsparadigmas kombiniert mit Versuchen zum Langzeitabruf dieses Paradigmas, jeweils unter Nutzung der bilateralen ECM-Degradation im ACx. Ebenso wurden die intrinsischen Veränderungen der ECM biochemisch mittels sqWB in verschiedenen Tiergruppen bis hin zum Langzeitabruf des FM-Diskriminationsparadigmas untersucht. Das mechanistische Schaubild der Funktion der ECM im adulten lernenden Tier ist in Abb. 4.1 gezeigt.

In den Ausführungen der Einleitung (Abschnitt 1.4) und Diskussion (Abschnitt 4.4.1) ist eine signifikante Abhängigkeit des Lernens von der ECM aufgezeigt worden. Es gibt dabei große Unterschiede in der Speicherung und Modulierbarkeit von Gedächtnisinhalten.

Einfache Verschaltungskarten in primären sensorischen Arealen, die aus der Wahrnehmung der Umwelt bis zum Ende der kritischen Perioden entstehen, sind dabei in einer experimentellen sekundär-plastischen Phase veränderbar. Grundsätzliches und lebensnotwendiges Verhalten, das über die kritische Periode hinaus erlernt wird und möglicherweise auch parallel in mehreren hierarchischen Verschaltungsebenen gespeichert wird, kann durch anschließende Degradation der ECM nicht beeinflusst werden. Ausschließlich adult erlerntes Verhalten hingegen ist, durch sekundäre ECM-Modulation und gezieltes Training, beeinflussbar (vgl. Abschnitt 4.4.1).

Diese unterschiedlich effektive Einflussnahme der ECM auf Netzwerkprozesse, die dem Lernen ja immer unterliegen, ist eine biologisch sehr sinnvolle Lösung für unterschiedliche Probleme in der Individualentwicklung von höheren Tieren. In der juvenilen Phase ist die maximale Flexibilität und anschließende Fixierung wichtig, um die sensorischen Informationen aus der Umwelt koordiniert und möglichst präzise für die spätere Nutzung zu speichern. Hierbei werden auch die grundlegenden lebenserhaltenden Verhaltensweisen auf unterschiedlichen hierar-

chischen Ebenen festgelegt und sind anschließend sehr schwer beeinflussbar. Beim adulten Lernen handelt es sich um Adaptationen an die sich ständig ändernden Umwelteinflüsse und nutzt die schon vorhandenen grundlegenden Verhaltensweisen als Ressourcen für adaptives Lernverhalten.

Mit der Studie [Happel et al. \(2014b\)](#) konnte nun erstmalig der Einfluss der ECM auf kortexabhängiges sensorisch-auditorisches Diskriminationslernen durch enzymatische Degradation der ECM im ACx gezeigt werden. Hier konnten die Tiere durch experimentelles Eröffnen einer sekundär-plastischen Phase im selben Kontext auf physikalisch identische Reize, sogar völlig entgegengesetztes Verhalten erlernen (vgl. Abschnitt 4.1). Es bedurfte also unter denselben Bedingungen eines experimentellen Eingriffs in das System, um erneut eine hohe Flexibilität für das Umlernen zu generieren. Gleichzeitig hatte die ECM-Degradation keinen Einfluss auf das Anlernverhalten der Tiere, um die Aufgabe zu bewältigen. Dies zeigte mögliche Ähnlichkeiten zur intrinsischen Plastizität der ECM auf.

Die Ausführungen in Abschnitt 4.2.3 zeigten statt einer enorm stabilen ECM einen eher metaplastischen Zustand dieser in naiven Tieren (siehe Abb. 4.1 A), wie er z. B. bei [Frischknecht et al. \(2009\)](#) *in vitro* anhand von Ideen zum ECM-Einfluss auf synaptischer Ebene beschrieben ist.

Spaltprodukte von ECM-Proteinen könnten in dem Zusammenhang wichtige Transduktionsmoleküle für die Signalgebung ins Zellinnere, über integrale Membranproteine wie Integrine, sein ([Kim et al., 2011](#)). Aus verschiedenen Verhaltensstudien ist Dopamin als wichtiger Faktor für adultes Lernen bekannt (vgl. Abschnitt 4.4.3). Dieses könnte also lerninduziert die Freisetzung von Metalloproteasen im Bereich des ACx bewirken, bei gleichzeitiger Aktivierung von endozytischen Prozessen von ECM-Fragmenten, gefolgt von der Degradation dieser Moleküle (siehe Abb. 4.1 B).

Die in Abschnitt 4.2.3 diskutierte erhöhte homöostatische Produktion von ECM-Volllängenproteinen in Neuronen oder/und Gliazellen und verstärkte Sekretion von Volllängenproteinen im erfolgreich lernenden Tier, könnte ebenfalls durch solche Signalwirkungen verursacht werden. Diese Fakten zeigen mechanistisch eine Stabilisierung der ECM in der RT-Phase, induziert durch erfolgreiches Lernen (siehe Abb. 4.1 C).

Nicht erfolgreich diskriminierende Tiere (NL-Gruppe) zeigten ECM-biochemisch sehr ähnliche Parameter den frühen lernenden Gruppen (AV-, AQ-Gruppen, vgl. Abschnitt 4.2.3). Es scheint ihnen aber möglicherweise aufgrund externer Trigger, oder auch des Fehlens selbiger, nicht möglich zu sein, produzierte oder aus internen Speichern stammende ECM-Volllängenproteine in den extrazellulären Raum zu sekretieren und damit Erlerntes zu fixieren (vgl. Abb. 4.1 B, NL-Tiere).

Zum ersten Mal wurde in den Versuchen zu dieser Dissertation auch der Langzeiteinfluss der ECM untersucht. Als Hauptergebnis zeigte sich hier, dass die Tiere der LTR-Gruppe trotz leicht verbesserter Diskriminationsleistung (Abb. 3.4, LTR-Gruppe), eine Verteilung der ECM-Proteine von naiven und AV-Tieren (Abb. 3.5, 3.6, 3.7) aufwiesen.

Daraus lässt sich folgende Hypothese ableiten: Nach erfolgreicher Konsolidierung erfolgt eine Pause von etwa 4 Wochen, sodass sich die ECM wieder in ihren metaplastischen naiven Zustand zurückbilden kann (vgl. Abb. 4.1). Wird das Tier erneut in dem gleichen Paradigma unter gleichen Bedingungen trainiert, wird die ECM global biochemisch betrachtet wieder aktiviert, um etwaige neue Lerninhalte fixieren zu können. Dabei könnte es Unterschiede zwischen bereits bestehenden Synapsen und naiven oder *de novo* entstehenden Synapsen geben. Erstere blieben dabei eher unverändert, was das stabile Abrufen des vorher Erlernten ermöglichen könnte. Naive und *de novo* Synapsen würden bei neuen Lerninhalten entsprechend den initialen Anlernprozess mit all seinen molekularen Änderungen durchlaufen (vgl. Abschnitte 4.4.2, 4.2.3). Als Konsequenz würden die Trainingsphasen zeitlich deutlich schneller durchlaufen.

Diesem Prinzip könnten die initial nicht diskriminierenden HYase-injizierten Tieren entsprechen. Diesen Tieren blieb selbst unter erzwungener ECM-Aktivierung der sichtbare Lernerfolg verwehrt. In der LTR-Phase durchliefen aber 80 % der Tiere erfolgreich in kurzer Zeit das Training (vgl. Abschnitt 4.3). Unter Degradation der ECM zeigen Neuronen eine verstärkte Beweglichkeit synaptischer Dornen (de Vivo et al., 2013), was die Wahrscheinlichkeit neuer Verknüpfungen erhöht und damit möglicherweise für naive Synapsen sorgt. Dies könnte den schlecht lernenden Tieren helfen, wenn die ECM bis Tag 9 wieder regeneriert und dann sogar überkompensiert wird (vgl. Abschnitt 3.4).

Wie in Dzyubenko et al. (2016) aufgelistet, werden ECM-Komponenten neben den Neuronen auch in hohem Maße von Gliazellen produziert. In experimentell unbeeinflusst lernenden Tieren könnten Umbauprozesse in der ECM lernabhängig über neuronal gesteuerte Signale, relativ begrenzt um Synapsen herum, stattfinden. Da in diesem Fall jedoch die ECM experimentell degradiert wurde und damit eher einem biochemisch sehr plastischen Zustand (vgl. Abb. 4.1 B) entspricht, könnten hier durchaus eher Reparaturmechanismen ablaufen, die die Integrität des Gewebes nach der Wirkung des Enzyms wieder herstellen. Forciert durch das Lernparadigma (vgl. Abb. 3.9 C, D, jeweils Tage 7-10) könnte als Nebenprodukt, durch die möglicherweise erhöhte Menge an fixierten naiven Synapsen, das schnelle Lernen in der LTR-Phase ermöglicht werden.

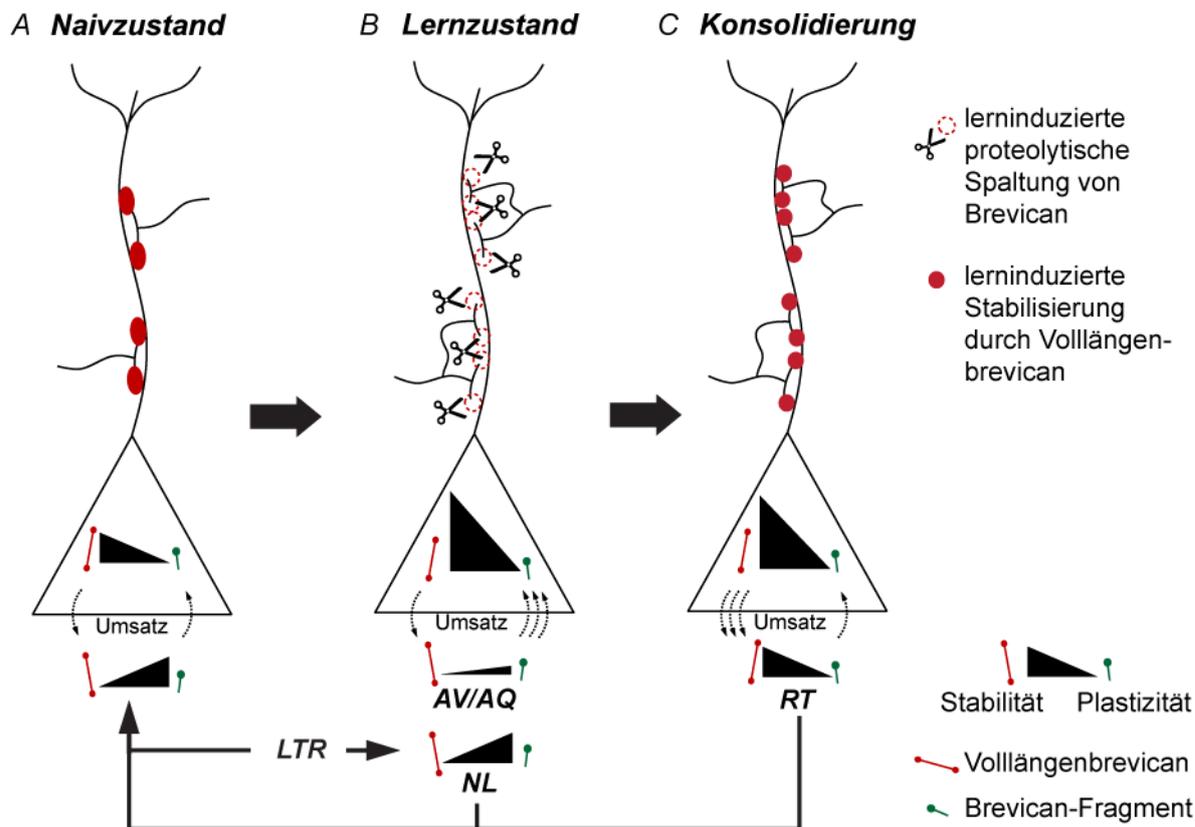


Abbildung 4.1 – Postulierter Mechanismus des Einflusses der ECM auf das Lernverhalten adulter Mäuse. Diese Abbildung zeigt den potenziellen Mechanismus des Einflusses der ECM auf Lernen im adulten Tier am Beispiel des CSPG Brevican. Startpunkt eines jeden Lernprozesses ist offensichtlich nicht, wie bisher angenommen, ein starres ECM-Netzwerk, sondern ein metaplastischer Zustand im naiven Tier (A). Diese intrinsisch vorhandene Plastizität wird durch Lernen angeregt. Bekannte Triggermoleküle wie Dopamin könnten eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des Systems spielen. Die Menge an intrazellulär produzierten und vorhandenen Vollängenproteinen wird homöostatisch gleich gehalten und im Verhältnis zu den ECM-Proteinfragmenten sogar gesteigert. Durch aktivitätsabhängig aktivierte Matrixmetalloproteasen wie z. B. ADAMTS-4/5 werden ECM-Moleküle zusätzlich gespalten, was den Umsatz an Fragmenten steigert. Damit wird das System lerninduziert plastischer und die Fragmente könnten gleichzeitig als Signalmoleküle für intrazelluläre Kaskaden dienen, die in Zusammenhang mit morphologischen und elektrochemischen Veränderungen an Synapsen stehen (B). Im erfolgreich lernenden Tier wird die ECM, in der Konsolidierungsphase nach Akquirieren der Aufgabe, wieder stabilisiert. Dazu werden Vollängenproteine aus dem Vorrat der Neuronen und/oder Gliazellen in den extrazellulären Raum sezerniert und dort in die neu zu formierende ECM integriert. In diesem Lernzustand zeigt die ECM eine erhöhte Stabilität (C). In der trainingsfreien Zeit sollte die ECM wieder ihren ursprünglich metaplastischen Zustand einnehmen, um auf neue Lernereignisse reagieren zu können. Ein anschließendes Langzeitabrufen des Erlernten aktiviert das System intrazellulär erneut, am metaplastischen Zustand der ECM ändert sich dabei aber nichts (B).

Tiere deren ECM experimentell degradiert wurde können ebenso in diesen Mechanismus integriert werden. Die ECM-Abschwächung unterstützt den dynamischen Wechsel zwischen metaplastischem Zustand (A) und verstärkter anschließender ECM-Proteinsekretion (C). Lernen die Tiere, gesteuert durch natürliche Triggermoleküle wie Dopamin die Aufgabe, so legen sie das Erlernte, vermutlich durch Reparaturmechanismen der ECM, genauso fest wie nicht injizierte Tiere. Tiere die das Verhalten initial nicht vollständig lernen, könnten durch die Reparatur alle angeregten synaptischen Veränderungen festlegen und im Nachtraining schneller die Aufgabe erlernen (vgl. Abb. 3.9).

Wenn es gelänge, neben der Degradation der ECM auch die bei Morbus Alzheimer typischen A β -Plaques aufzulösen, könnte dieser Mechanismus hilfreich für die Entwicklung neuer Therapieansätze sein.

Der aufgezeigte Mechanismus könnte in Zukunft in der Behandlung von Demenzerkrankungen hilfreich sein. Sollte es zunächst im Tiermodell gelingen parallel zur Degradation der ECM auch die Plaques fehlgeleiteter Proteinaggregationen aufzulösen, könnte möglicherweise mit parallelem Training oder Re-Training eine wesentliche Verbesserung des Krankheitsbildes einhergehen.

4.4.5 Ausblick und Perspektiven

In der vorliegenden Arbeit sind fundamentale Mechanismen aufgezeigt worden, die belegen könnten, wie die dynamische Anpassung der ECM die Hirnplastizität steuert. Das im Grundzustand metaplastische System der ECM ist dafür ausgelegt, über einen sehr plastischen Zwischenschritt, neue lerninduzierte Gedächtnisinhalte zu etablieren und zu stabilisieren. Es bedarf enorm großen Aufwandes, um festgelegte Gedächtnisse zu revidieren, wenn dies intrinsisch überhaupt der Fall ist.

Dies zeigt sich besonders in Krankheitsbildern, wie Schlaganfall oder Hörverlust, die mit entstehenden neurologischen Defiziten einhergehen. Hier versucht das Gehirn, durch ECM-Stabilisierung Verluste kompensatorisch zu minimieren. Für regenerative Therapien wäre es jedoch günstig die Plastizität der ECM zu steigern und in der direkt folgenden Zeit diese Therapien durch sinnvolles Lernen bzw. Training und evtl. auch Implantaten zu unterstützen.

Mit solchen Ansätzen könnte man also zielgerichtet Plastizität steuern, um völlig neue Strategien der restaurativen Plastizität für neurologische Erkrankungen zu entwickeln. Das Hauptproblem bei solchen Eingriffen ist, dass es lokal an involvierten Stellen erfolgen muss, damit keine unkontrollierte Plastizität entsteht. Nach heutigem technischem Stand ist dies nur invasiv zu bewerkstelligen.

Eine sehr vielversprechende Idee für zukünftige Forschung ist die Interaktion zwischen Dopamin und der ECM. Es ist bis heute bekannt, dass Dopamin anfänglich in Lernprozessen verstärkt freigesetzt wird (Stark & Scheich, 1997) und auch auf Ebene der Genregulation für ECM-beeinflussende Faktoren involviert ist (Nagai et al., 2004), jedoch ist der konkrete intrinsische Zusammenhang weitestgehend unklar. Wenn dieser Zusammenhang gezeigt werden kann, dann könnten evtl. Konzepte entwickelt werden, die eine Interaktion der ECM-Modulation und dem Lerntrigger Dopamin, in aufeinander abgestimmten Reorganisationsprozessen, optimal unterstützen könnten.

Auch das Beispiel Tinnitus sollte angeführt werden, denn hier könnten kompensatorische Mechanismen für den Verlust von Eingangssignalen aus dem Innenohr in den hierarchisch höchsten Verarbeitungszentren des Gehirns auftreten. Solche Mechanismen sind in Krauss et al. (2016) in einem mathematischen Modell

beschrieben. Therapien, die direkt am Ort des Hörverlustes ansetzen, jedoch auch lernunterstützende Therapien im ACx welche der Phantomgeräuschbildung entgegenwirken, wären sehr wünschenswert.

Bei vielen Patienten mit Cochleaimplantaten ist gezeigt, dass sie wieder etwas hören können. Das Gehirn hat aber Schwierigkeiten die neuen Informationen sinnvoll zu nutzen. In Untersuchungen an frühzeitig nach der Geburt ertaubten Tieren (Jakob et al., 2015) wurde gezeigt, dass nach Implantation und Aktivierung von Cochleaimplantaten innerhalb aller Kerngebiete der aufsteigenden Hörbahn eine breite Aktivierung von Neuronen unabhängig von der Tonotopie stattfindet. Sollte es gelingen die tonotope Organisation der Kerngebiete durch experimentelle Modulation der ECM und assoziative Trainings neu zu gestalten, könnte dies ein Durchbruch in der Erforschung und Etablierung von z. B. Cochleaimplantaten sein.

Die Prozesse, die in der ECM bei altersbedingten Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer stattfinden, sind bisher nur wenig untersucht. Hier könnte der Einfluss der ECM im Sinne der Prävention und Rehabilitation mit Hilfe von Alzheimer-Modell-Tieren (APP/PS1-Mäuse) untersucht werden. Es ist gezeigt worden, dass bei Degradation der ECM vor dem ersten Auftreten von $A\beta$ -Plaques im Hippocampus die Gedächtnisleistung von Mäusen für Angstverhalten verbessern kann (Végh et al., 2014). Daraus könnten sich Therapieansätze ergeben, die, z. B. durch Injektionen von ECM-modulierenden Enzymen in Hirnareale, eine Verbesserung der Lernleistung oder Gedächtnisabrufe dementer Versuchstiere erreichen.

Es ist von großem Interesse, ob die $A\beta$ -Plaque Bildung durch Modulation der ECM beeinflusst werden kann. Mittels CSD (*current source density*)-Analysen und Thallium-Aufnahme-Untersuchungen im ACx (Lison et al., 2014) ist der Einfluss von $A\beta$ -Plaques auf rekurrente Schleifen, die auf Schicht 5 Neuronen des Kortex verschalten, untersucht worden. Das Verstummen supragranulärer pyramidaler Zellen war dabei auf einen Verlust exzitatorischer Eingänge in infragranulären Schichten zurückzuführen. Die Untersuchung der PNNs in den oberen Kortexschichten und deren Einfluss auf den Krankheitsverlauf in diesen Alzheimer-Tieren könnte helfen, präventive Maßnahmen zu entwickeln.

Um weitere Grundlagenmechanismen, die auch den Bezug zu den bei (Gogolla et al., 2009) diskutierten parallel verarbeitenden Systemen herstellen, aufzudecken, sollten in Folgestudien auch noch andere Hirnregionen untersucht werden. Einige Kandidatenproteine könnten β -DG als Ziel von Matrixmetalloproteasen in Verbindungen zur Plastizität dendritischer Dornen (Michaluk et al., 2007) sein, aber auch Wachstumsprozesse steuernde Moleküle wie Contactin-1, RPTP σ , LAR und NgR

(Miao et al., 2014). Auch Tenascin sollte Untersuchungsobjekt sein, da es u. a. mit Contactin interagiert (Brösicke & Faissner, 2015).

In weiteren Verhaltensversuchen könnte der Einfluss der ECM, durch eine gezielte Modulation der Proteolyse von ECM-Proteinen durch Proteaseinhibitoren, untersucht werden. Auch KO-Tiermodelle für z. B. Brevican oder Neurocan könnten in die Analysen einbezogen werden, um die Rolle der ECM spezifischer zu untersuchen. Der Nachteil bei konstitutiven KO-Tieren sind kompensatorische Mechanismen des Körpers, um die Nachteile des Verlustes eines Proteins auszugleichen. Allerdings könnte gerade auch dies Informationen über die spezifischen Aufgaben einzelner Proteine während des Lernens liefern. In all diesen Beispielen könnten mittels sqWB-Analysen oder Massenspektrometrie die Verhältnisse von ECM-Proteinen in unterschiedlichen Geweben, Subfraktionen und verschiedenen Lernstadien untersucht werden.

Weitere Ziele von Untersuchungen könnten kortikale Netzwerkmechanismen auch im auditorischen System sein. Der Einfluss der ECM im adulten Kortex könnte hier durch chronische CSD-Ableitungen mit und ohne Degradation der ECM im ACx untersucht werden. Wie im visuellen Kortex von Ratten gezeigt wurde (Lensjø et al., 2017), verschiebt die Degradation der PNNs mit ChABC im visuellen Kortex, die kortikale Verarbeitung von visuell erzeugten Stimuli in Richtung verstärkter Eingangsverarbeitung, statt der im adulten Tier üblichen erfahrungsbasierten Verarbeitung. Aufgrund der nach Injektion von ChABC stark veränderten inhibitorischen Schaltkreise PV-haltiger Neuronen entspricht die kortikale Verarbeitung eher der im juvenilen Tier.

Anhang A

Statistische Tabellen

Vergleich der Phasenübergänge biochemisch untersuchter Tiergruppen

Tabelle A.1 – One-Way-ANOVA (Signifikanzlevel $P < 0,05$) der Lernphasenübergänge der biochemisch analysierten Gruppen (signifikante Werte kursiv und fett gedruckt; vgl. Abb. 3.4)

Vergleich	F-Wert	P-Wert
1. AV-Session	$F_{(4,28)} = 1,877$	0,1713
1. AQ-Session	$F_{(2,14)} = 1,754$	0,2191
1. RT-Session	$F_{(1,7)} = 1,485$	0,2625

Tabelle A.2 – Gepaarter t-Test (Signifikanzlevel $P < 0,05$) zwischen Hit- und FA-Raten der Einzeltiere der biochemisch analysierten Gruppen (signifikante Werte kursiv und fett gedruckt; vgl. Abb. 3.4)

Versuchstag	AV-Gruppe	AQ-Gruppe	RT-Gruppe	LTR-Gruppe	NL-Gruppe
1	0,1192	0,1382	0,5490	1,0000	0,6540
2	0,1090	0,0053	0,0185	0,2757	0,2457
3	0,7103	0,0015	0,0017	0,0013	0,2356
4	0,1821	0,0079	0,0003	0,0011	0,4148
5		0,0006	<0,0001	0,0006	0,0148
6		0,0001	0,0004	0,0006	0,1046
7		0,0008	<0,0001	0,0006	0,1523
8		0,0018	0,0001	<0,0001	0,0475
9		0,0972	<0,0001	<0,0001	0,0110
10			<0,0001	0,0002	0,0042
11			<0,0001	<0,0001	
12			0,2780	<0,0001	
13			0,0448		
14			0,0008		
15			0,0001		
16			<0,0001		
17			<0,0001		

Biochemische Analyse

Tabelle A.3 – One-Way-ANOVA (Signifikanzniveau $P < 0,05$) der Quantifizierung der absoluten Brevican-Werte der ECM-Fraktion (Posthoc-Analyse: Šídáks multipler Vergleichstest; signifikante Werte kursiv und fett gedruckt; vgl. Abb. 3.5)

145 kDa-Brevican	Haupteffekte durch One-Way-ANOVA	P-Wert
	$F_{(5,41)} = 3,342$	<i>0,0127</i>
	Šídáks multipler Vergleichstest	Adjustierte P-Werte
	Naiv vs. AV	>0,9999
	Naiv vs. AQ	>0,9999
	Naiv vs. RT	0,1014
	Naiv vs. NL	0,9993
	Naiv vs. LTR	>0,9999
	AV vs. AQ	>0,9999
	AV vs. RT	<i>0,0434</i>
	AV vs. NL	>0,9999
	AV vs. LTR	>0,9999
	AQ vs. RT	0,1082
	AQ vs. NL	0,9991
	AQ vs. LTR	>0,9999
	RT vs. NL	<i>0,0121</i>
	RT vs. LTR	0,0981
	NL vs. LTR	0,9994
55 kDa-Brevican-Fragment	Haupteffekte durch One-Way-ANOVA	P-Wert
	$F_{(5,41)} = 3,433$	<i>0,0111</i>
	Šídáks multipler Vergleichstest	Adjustierte P-Werte
	Naiv vs. AV	0,2307
	Naiv vs. AQ	0,1849
	Naiv vs. RT	0,569
	Naiv vs. NL	<i>0,0053</i>
	Naiv vs. LTR	0,9492
	AV vs. AQ	>0,9999
	AV vs. RT	>0,9999
	AV vs. NL	0,8983
	AV vs. LTR	0,9912
	AQ vs. RT	>0,9999
	AQ vs. NL	0,937
	AQ vs. LTR	0,9803
	RT vs. NL	0,565
	RT vs. LTR	> 0,9999
	NL vs. LTR	0,1858

Tabelle A.4 – One-Way-ANOVA (Signifikanzniveau $P < 0,05$) der Quantifizierung der absoluten Brevican-Werte der zellulären Fraktion (Posthoc-Analyse: Šídáks multipler Vergleichstest; signifikante Werte kursiv und fett gedruckt; vgl. Abb. 3.5)

145 kDa-Brevican	Haupteffekte durch One-Way-ANOVA	P-Wert
	$F_{(5,41)} = 1,778$	0,1388
	Šídáks multipler Vergleichstest	Adjustierte P-Werte
	Naiv vs. AV	0,8038
	Naiv vs. AQ	>0,9999
	Naiv vs. RT	0,967
	Naiv vs. NL	0,9824
	Naiv vs. LTR	0,9995
	AV vs. AQ	0,9983
	AV vs. RT	>0,9999
	AV vs. NL	>0,9999
	AV vs. LTR	0,2107
	AQ vs. RT	>0,9999
	AQ vs. NL	>0,9999
	AQ vs. LTR	0,8636
	RT vs. NL	>0,9999
	RT vs. LTR	0,4392
	NL vs. LTR	0,5305
55 kDa-Brevican-Fragment	Haupteffekte durch One-Way-ANOVA	P-Wert
	$F_{(5,41)} = 15,79$	<0,0001
	Šídáks multipler Vergleichstest	Adjustierte P-Werte
	Naiv vs. AV	<0,0001
	Naiv vs. AQ	<0,0001
	Naiv vs. RT	<0,0001
	Naiv vs. NL	<0,0001
	Naiv vs. LTR	0,1538
	AV vs. AQ	>0,9999
	AV vs. RT	>0,9999
	AV vs. NL	>0,9999
	AV vs. LTR	0,005
	AQ vs. RT	>0,9999
	AQ vs. NL	>0,9999
	AQ vs. LTR	0,0098
	RT vs. NL	>0,9999
	RT vs. LTR	0,0083
	NL vs. LTR	0,0032

Tabelle A.5 – One-Way-ANOVA (Signifikanzniveau $P < 0,05$) der Quantifizierung der Überschüsse zwischen Vollängenbrevican und dem 55 kDa-Fragment in der ECM-Fraktion und der zellulären Fraktion (Posthoc-Analyse: Šídáks multipler Vergleichstest; signifikante Werte kursiv und fett gedruckt; vgl. Abb. 3.6)

ECM-Fraktion	Haupteffekte durch One-Way-ANOVA	P-Wert
	$F_{(5,41)} = 4,596$	0,0020
	Šídáks multipler Vergleichstest	Adjustierte P-Werte
	Naiv vs. AV	0,9998
	Naiv vs. AQ	0,8082
	Naiv vs. RT	0,0015
	Naiv vs. NL	0,9987
	Naiv vs. LTR	>0,9999
	AV vs. AQ	0,9992
	AV vs. RT	0,0153
	AV vs. NL	>0,9999
	AV vs. LTR	>0,9999
	AQ vs. RT	0,1591
	AQ vs. NL	>0,9999
	AQ vs. LTR	0,9987
	RT vs. NL	0,0361
	RT vs. LTR	0,0135
	NL vs. LTR	>0,9999
Zelluläre Fraktion	Haupteffekte durch One-Way-ANOVA	P-Wert
	$F_{(5,41)} = 6,418$	0,0002
	Šídáks multipler Vergleichstest	Adjustierte P-Werte
	Naiv vs. AV	0,0092
	Naiv vs. AQ	0,0003
	Naiv vs. RT	0,0012
	Naiv vs. NL	0,0011
	Naiv vs. LTR	0,0481
	AV vs. AQ	0,9871
	AV vs. RT	>0,9999
	AV vs. NL	0,9997
	AV vs. LTR	>0,9999
	AQ vs. RT	>0,9999
	AQ vs. NL	>0,9999
	AQ vs. LTR	0,7478
	RT vs. NL	>0,9999
	RT vs. LTR	0,9731
	NL vs. LTR	0,9415

Tabelle A.6 – One-Way-ANOVA (Signifikanzniveau $P < 0,05$) der Quantifizierung der Brevican-Überschüsse in der ECM-Fraktion vs. der zellulären Fraktion (Posthoc-Analyse: Šídáks multipler Vergleichstest; signifikante Werte kursiv und fett gedruckt; vgl. Abb. 3.6)

145 kDa-Brevican	Haupteffekte durch One-Way-ANOVA	P-Wert
	$F_{(5,41)} = 2,957$	0,0227
	Šídáks multipler Vergleichstest	Adjustierte P-Werte
	Naiv vs. AV	>0,9999
	Naiv vs. AQ	>0,9999
	Naiv vs. RT	0,1066
	Naiv vs. NL	>0,9999
	Naiv vs. LTR	>0,9999
	AV vs. AQ	>0,9999
	AV vs. RT	0,2481
	AV vs. NL	0,9994
	AV vs. LTR	0,9999
	AQ vs. RT	0,1862
	AQ vs. NL	>0,9999
	AQ vs. LTR	>0,9999
	RT vs. NL	0,0360
	RT vs. LTR	0,0383
	NL vs. LTR	>0,9999
55 kDa-Brevican-Fragment	Haupteffekte durch One-Way-ANOVA	P-Wert
	$F_{(5,41)} = 1,499$	0,2112
	Šídáks multipler Vergleichstest	Adjustierte P-Werte
	Naiv vs. AV	0,8721
	Naiv vs. AQ	0,9313
	Naiv vs. RT	0,5700
	Naiv vs. NL	>0,9999
	Naiv vs. LTR	>0,9999
	AV vs. AQ	>0,9999
	AV vs. RT	>0,9999
	AV vs. NL	0,9051
	AV vs. LTR	0,9688
	AQ vs. RT	>0,9999
	AQ vs. NL	0,9516
	AQ vs. LTR	0,9884
	RT vs. NL	0,6361
	RT vs. LTR	0,7767
	NL vs. LTR	>0,9999

Tabelle A.7 – One-Way-ANOVA (Signifikanzniveau $P < 0,05$) der Quantifizierung der absoluten TNR-Werte für die ECM-Fraktion und die zelluläre Fraktion (Posthoc-Analyse: Šídáks multipler Vergleichstest; signifikante Werte kursiv und fett gedruckt; vgl. Abb. 3.7)

Vollängen TNR ECM-Fraktion	Haupteffekte durch One-Way-ANOVA	P-Wert
	$F_{(5,41)} = 2,112$	0,0833
	Šídáks multipler Vergleichstest	Adjustierte P-Werte
	Naiv vs. AV	>0,9999
	Naiv vs. AQ	>0,9999
	Naiv vs. RT	0,6096
	Naiv vs. NL	>0,9999
	Naiv vs. LTR	>0,9999
	AV vs. AQ	>0,9999
	AV vs. RT	0,1650
	AV vs. NL	>0,9999
	AV vs. LTR	>0,9999
	AQ vs. RT	0,2214
	AQ vs. NL	>0,9999
	AQ vs. LTR	>0,9999
	RT vs. NL	0,2014
	RT vs. LTR	0,2066
	NL vs. LTR	>0,9999
Vollängen TNR zelluläre Fraktion	Haupteffekte durch One-Way-ANOVA	P-Wert
	$F_{(5,41)} = 1,669$	0,1638
	Šídáks multipler Vergleichstest	Adjustierte P-Werte
	Naiv vs. AV	0,9966
	Naiv vs. AQ	0,9990
	Naiv vs. RT	0,9779
	Naiv vs. NL	0,1123
	Naiv vs. LTR	0,9998
	AV vs. AQ	>0,9999
	AV vs. RT	>0,9999
	AV vs. NL	0,7019
	AV vs. LTR	>0,9999
	AQ vs. RT	>0,9999
	AQ vs. NL	0,6219
	AQ vs. LTR	>0,9999
	RT vs. NL	0,8455
	RT vs. LTR	>0,9999
	NL vs. LTR	0,5288

Tabelle A.8 – One-Way-ANOVA (Signifikanzniveau $P < 0,05$) der Quantifizierung der TNR Überschüsse für ECM-Fraktion vs. der zellulären Fraktion (Posthoc-Analyse: Šídáks multipler Vergleichstest; signifikante Werte kursiv und fett gedruckt; vgl. Abb. 3.7)

Vollängen TNR	Haupteffekte durch One-Way-ANOVA	P-Wert
	$F_{(5,41)} = 1,695$	0,1576
	Šídáks multipler Vergleichstest	Adjustierte P-Werte
	Naiv vs. AV	>0,9999
	Naiv vs. AQ	>0,9999
	Naiv vs. RT	0,5617
	Naiv vs. NL	>0,9999
	Naiv vs. LTR	>0,9999
	AV vs. AQ	>0,9999
	AV vs. RT	0,2085
	AV vs. NL	>0,9999
	AV vs. LTR	>0,9999
	AQ vs. RT	0,3369
	AQ vs. NL	>0,9999
	AQ vs. LTR	>0,9999
	RT vs. NL	0,7458
	RT vs. LTR	0,3751
	NL vs. LTR	>0,9999

Vergleich NaCl-injizierter Tiere vs. HYase-injizierter Tiere

Tabelle A.9 – ANOVAs zwischen Hit- bzw. False-Alarms-Raten-Plateaus, sowie deren 1. Versuchssitzungen, der initialen und LTR-Phasen aller 0,9 % Kochsalz- (n = 21) und HYase-injizierten (n = 17) Tiere (Posthoc-Analyse: Šídáks Multipler Vergleichstest; signifikante Werte kursiv und fett gedruckt; vgl. Abb. 3.8)

Hit: Plateaus	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	F _(1, 221) -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	10,504	0,0014
	„Phasen“	3,927	0,0487
	„Gruppe x Phase“	7,675	0,0061
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1:RT vs. Gruppe 1:LTR		0,0030
	Gruppe 1:RT vs. Gruppe 2:RT		0,0002
	Gruppe 1:LTR vs. Gruppe 2:LTR		0,9997
	Gruppe 2:RT vs. Gruppe 2:LTR		0,9955
Hit: 1. Versuchstag	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	F _(1, 71) -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	0,251	0,6178
	„Phasen“	173,001	<0,0001
	„Gruppe x Phase“	1,144	0,2884
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1:RT vs. Gruppe 1:LTR		<0,0001
	Gruppe 1:RT vs. Gruppe 2:RT		0,9991
	Gruppe 1:LTR vs. Gruppe 2:LTR		0,8524
	Gruppe 2:RT vs. Gruppe 2:LTR		<0,0001
FA: Plateaus	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	F _(1, 221) -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	13,121	0,0004
	„Phasen“	6,064	0,0146
	„Gruppe x Phase“	0,496	0,4819
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1:RT vs. Gruppe 1:LTR		0,7241
	Gruppe 1:RT vs. Gruppe 2:RT		0,2131
	Gruppe 1:LTR vs. Gruppe 2:LTR		0,0157
	Gruppe 2:RT vs. Gruppe 2:LTR		0,1839
FA: 1. Versuchstag	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	F _(1, 71) -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	0,070	0,7917
	„Phasen“	61,587	<0,0001
	„Gruppe x Phase“	0,228	0,6346
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1:RT vs. Gruppe 1:LTR		<0,0001
	Gruppe 1:RT vs. Gruppe 2:RT		0,9959
	Gruppe 1:LTR vs. Gruppe 2:LTR		>0,9999
	Gruppe 2:RT vs. Gruppe 2:LTR		<0,0001

Tabelle A.10 – ANOVAs zwischen d' -Werten der Plateaus und der 1. Versuchssitzungen, sowie zwischen den Lernphasenwechseln der initialen und LTR-Phasen, aller 0,9 % Kochsalz- (n = 21) und HYase-injizierten (n = 17) Tiere (Posthoc-Analyse: Šídáks Multipler Vergleichstest; signifikante Werte kursiv und fett gedruckt; vgl. Abb. 3.8)

d': Plateaus	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	$F_{(1, 221)}$ -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	0,858	0,3554
	„Phasen“	1,927	0,1665
	„Gruppe x Phase“	6,648	0,0106
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1:RT vs. Gruppe 1:LTR		0,9420
	Gruppe 1:RT vs. Gruppe 2:RT		0,8093
	Gruppe 1:LTR vs. Gruppe 2:LTR		0,0838
	Gruppe 2:RT vs. Gruppe 2:LTR		0,0462
d': 1. Versuchstag	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	$F_{(1, 71)}$ -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	0,550	0,4608
	„Phasen“	11,179	0,0013
	„Gruppe x Phase“	0,077	0,7824
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1:RT vs. Gruppe 1:LTR		0,0525
	Gruppe 1:RT vs. Gruppe 2:RT		0,9997
	Gruppe 1:LTR vs. Gruppe 2:LTR		0,9793
	Gruppe 2:RT vs. Gruppe 2:LTR		0,2256
1.AV-Session	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	$F_{(1, 64)}$ -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	0,036	0,8505
	„Phasen“	20,843	<0,0001
	„Gruppe x Phase“	0,0358	0,8505
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1: 1. AV vs. Gruppe 1: 1. AV'		0,0057
	Gruppe 1: 1. AV vs. Gruppe 2: 1. AV		0,9999
	Gruppe 1: 1. AV' vs. Gruppe 2: 1. AV'		>0,9999
	Gruppe 2: 1. AV vs. Gruppe 2: 1. AV'		0,0224
1. AQ / 1. LTR	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	$F_{(1, 46)}$ -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	0,053	0,8189
	„Phasen“	95,107	<0,0001
	„Gruppe x Phase“	0,010	0,9194
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1: 1.AQ vs. Gruppe 1: 1. LTR		0,0023
	Gruppe 1: 1. AQ vs. Gruppe 2: 1. AQ		>0,9999
	Gruppe 1: 1. LTR vs. Gruppe 2: 1. LTR		>0,9999
	Gruppe 2: 1. AQ vs. Gruppe 2: 1. LTR		0,0135

Tabelle A.11 – ANOVAs zwischen Hit- bzw. False-Alarms-Raten-Plateaus, sowie deren 1. Versuchssitzungen, der initialen und LTR-Phasen, initial lernender 0,9 % Kochsalz- (n = 13) und HYase-injizierter (n = 7) Tiere (Posthoc-Analyse: Šídáks Multipler Vergleichstest; signifikante Werte kursiv und fett gedruckt; vgl. Abb. B.1)

Hit: Plateaus	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	F _(1, 113) -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	5,891	0,0168
	„Phasen“	10,006	0,0020
	„Gruppe x Phase“	0,569	0,4523
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 1: LTR		0,0086
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 2: RT		0,1429
	Gruppe 1: LTR vs. Gruppe 2: LTR		0,8113
	Gruppe 2: RT vs. Gruppe 2: LTR		0,5815
Hit: 1. Versuchstag	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	F _(1, 35) -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	0,250	0,6202
	„Phasen“	133,681	<0,0001
	„Gruppe x Phase“	0,198	0,6589
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 1: LTR		<0,0001
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 2: RT		0,9853
	Gruppe 1: LTR vs. Gruppe 2: LTR		>0,9999
	Gruppe 2: RT vs. Gruppe 2: LTR		<0,0001
FA: Plateaus	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	F _(1, 113) -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	8,908	0,0035
	„Phasen“	0,135	0,7137
	„Gruppe x Phase“	0,090	0,7646
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 1: LTR		0,9944
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 2: RT		0,1199
	Gruppe 1: LTR vs. Gruppe 2: LTR		0,3191
	Gruppe 2: RT vs. Gruppe 2: LTR		>0,9999
FA: 1. Versuchstag	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	F _(1, 35) -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	0,034	0,8551
	„Phasen“	27,838	<0,0001
	„Gruppe x Phase“	0,397	0,5328
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 1: LTR		0,0027
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 2: RT		0,9933
	Gruppe 1: LTR vs. Gruppe 2: LTR		0,9998
	Gruppe 2: RT vs. Gruppe 2: LTR		0,0045

Tabelle A.12 – ANOVAs zwischen d' -Werten der Plateaus und der 1. Versuchssitzungen, sowie zwischen den Lernphasenwechseln der initialen und LTR-Phasen, initial lernender 0,9% Kochsalz- ($n = 13$) und HYase-injizierter ($n = 7$) Tiere (Posthoc-Analyse: Šídáks Multipler Vergleichstest; signifikante Werte kursiv und fett gedruckt; vgl. Abb. 3.9)

d': Plateaus	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	$F_{(1, 113)}$ -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	0,458	0,4998
	„Phasen“	1,616	0,2062
	„Gruppe x Phase“	0,012	0,9115
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 1: LTR		0,8237
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 2: RT		0,9991
	Gruppe 1: LTR vs. Gruppe 2: LTR		0,9946
	Gruppe 2: RT vs. Gruppe 2: LTR		0,9779
d': 1. Versuchstag	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	$F_{(1, 35)}$ -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	0,031	0,8610
	„Phasen“	6,029	0,0192
	„Gruppe x Phase“	0,247	0,6224
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 1: LTR		0,1080
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 2: RT		0,9976
	Gruppe 1: LTR vs. Gruppe 2: LTR		>0,9999
	Gruppe 2: RT vs. Gruppe 2: LTR		0,7905
1.AV-Session	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	$F_{(1, 28)}$ -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	0,067	0,7973
	„Phasen“	4,669	0,0394
	„Gruppe x Phase“	0,067	0,7973
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1: 1. AV vs. Gruppe 1: 1. AV'		0,2957
	Gruppe 1: 1. AV vs. Gruppe 2:1. AV		0,9992
	Gruppe 1: 1. AV' vs. Gruppe 2:1. AV'		>0,9999
	Gruppe 2: 1. AV vs. Gruppe 2:1. AV'		0,8084
1. AQ/ 1. LTR	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	$F_{(1, 33)}$ -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	0,093	0,7623
	„Phasen“	69,625	<0,0001
	„Gruppe x Phase“	0,039	0,8455
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1: 1. AQ vs. Gruppe 1: 1. LTR		0,0032
	Gruppe 1: 1. AQ vs. Gruppe 2: 1. AQ		0,9995
	Gruppe 1: 1. LTR vs. Gruppe 2: 1. LTR		>0,9999
	Gruppe 2: 1. AQ vs. Gruppe 2: 1. LTR		0,0542

Tabelle A.13 – ANOVAs zwischen Hit- bzw. False-Alarms-Raten-Plateaus, sowie deren 1. Versuchssitzungen, der initialen und LTR-Phasen, nicht initial lernender 0,9% Kochsalz- (n=8) und HYase-injizierter (n=10) Tiere (Posthoc-Analyse: Šídáks Multipler Vergleichstest; signifikante Werte kursiv und fett gedruckt; vgl. Abb. B.1)

Hit: Plateaus	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	$F_{(1, 104)}$ -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	0,764	0,3840
	„Phasen“	0,366	0,5463
	„Gruppe x Phase“	7,602	0,0069
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 1: LTR		0,1472
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 2: RT		0,0679
	Gruppe 1: LTR vs. Gruppe 2: LTR		0,709
	Gruppe 2: RT vs. Gruppe 2: LTR		0,5016
Hit: 1. Versuchstag	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	$F_{(1, 32)}$ -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	0,008	0,9296
	„Phasen“	59,027	<0,0001
	„Gruppe x Phase“	2,177	0,1498
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 1: LTR		<0,0001
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 2: RT		0,8570
	Gruppe 1: LTR vs. Gruppe 2: LTR		0,9129
	Gruppe 2: RT vs. Gruppe 2: LTR		0,0003
FA: Plateaus	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	$F_{(1, 104)}$ -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	19,211	<0,0001
	„Phasen“	8,406	0,0046
	„Gruppe x Phase“	0,192	0,6626
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 1: LTR		0,4745
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 2: RT		0,0371
	Gruppe 1: LTR vs. Gruppe 2: LTR		0,0056
	Gruppe 2: RT vs. Gruppe 2: LTR		0,0805
FA: 1. Versuchstag	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	$F_{(1, 32)}$ -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	0,142	0,7091
	„Phasen“	36,066	<0,0001
	„Gruppe x Phase“	2,143	0,1529
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 1: LTR		0,0001
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 2: RT		0,7426
	Gruppe 1: LTR vs. Gruppe 2: LTR		0,9716
	Gruppe 2: RT vs. Gruppe 2: LTR		0,0107

Tabelle A.14 – ANOVAs zwischen d' -Werten der Plateaus und der 1. Versuchssitzungen, sowie zwischen den Lernphasenwechseln der initialen und LTR-Phasen, nicht initial lernender 0,9 % Kochsalz- ($n = 8$) und HYase-injizierter ($n = 10$) Tiere (Posthoc-Analyse: Šídáks Multipler Vergleichstest; signifikante Werte kursiv und fett gedruckt; vgl. Abb. 3.9))

d': Plateaus	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	$F_{(1, 104)}$ -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	25,212	<0,0001
	„Phasen“	17,535	<0,0001
	„Gruppe x Phase“	16,447	<0,0001
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 1: LTR		>0,9999
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 2: RT		0,9837
	Gruppe 1: LTR vs. Gruppe 2: LTR		<0,0001
	Gruppe 2: RT vs. Gruppe 2: LTR		<0,0001
d': 1. Versuchstag	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	$F_{(1, 32)}$ -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	0,501	0,4842
	„Phasen“	5,539	0,0249
	„Gruppe x Phase“	0,383	0,5402
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 1: LTR		0,8266
	Gruppe 1: RT vs. Gruppe 2: RT		0,9280
	Gruppe 1: LTR vs. Gruppe 2: LTR		>0,9999
	Gruppe 2: RT vs. Gruppe 2: LTR		0,1819
1. Session AV	Haupteffekte durch 2x2 ANOVA	$F_{(1, 32)}$ -Werte	P-Werte
	„Gruppe“	0,236	0,6303
	„Phasen“	19,126	0,0001
	„Gruppe x Phase“	0,236	0,6303
	Šídáks Multipler Vergleichstest		Adjustierte P-Werte
	Gruppe 1: 1. AV vs. Gruppe 1: 1. AV'		0,0158
	Gruppe 1: 1. AV vs. Gruppe 2: 1. AV		0,9838
	Gruppe 1: 1. AV' vs. Gruppe 2: 1. AV'		>0,9999
	Gruppe 2: 1. AV vs. Gruppe 2: 1. AV'		0,0380

Tabelle A.15 – One-Way-ANOVA der Transition zur Diskrimination HYase- ($n = 7$) und 0,9 % Kochsalz- ($n = 13$) injizierter, initial lernender und HYase-injizierter initial nicht lernender ($n = 10$) Mäuse (Posthoc-Analyse: Šídáks Multipler Vergleichstest; signifikante Werte kursiv und fett gedruckt; vgl. Abb. 3.9)).

1. LTR	Haupteffekte durch One-Way-ANOVA	P-Wert
	$F_{(2,22)} = 1,184$	0,1866
	Šídáks multipler Vergleichstest	Adjustierte P-Werte
	HYase nicht init. diskriminierend vs. HYase init. diskriminierend	0,3078
	HYase nicht init. diskriminierend vs. NaCl init. diskriminierend	0,2932
	HYase init. diskriminierend vs. NaCl init. diskriminierend	0,9993

Histologische Quantifizierung injizierter Mäuse mittels WFA-Färbung

Tabelle A.16 – One-Way-ANOVA der Quantifizierung des Zeitverlaufes (Posthoc-Analyse: Šídáks multipler Vergleichstest) und der Ortsspezifität der ECM-Degradation im ACx, unilateral mit HYase und NaCl injizierter Tiere (zweiseitiger ungepaarter t-Test, Signifikanzniveau $P < 0,05$; signifikante Werte kursiv und fett gedruckt; vgl. Abb. 3.10)

Zeitverlauf	Haupteffekte durch One-Way-ANOVA	P-Wert
	$F_{(4,32)} = 47,270$	<0,0001
	Šídáks multipler Vergleichstest	Adjustierte P-Werte
	Tag 3 vs. Tag 6	0,0028
	Tag 3 vs. Tag 7	0,9996
	Tag 3 vs. Tag 9	0,0057
	Tag 3 vs. Tag 12	<0,0001
	Tag 6 vs. Tag 7	0,0252
	Tag 6 vs. Tag 9	<0,0001
	Tag 6 vs. Tag 12	<0,0001
	Tag 7 vs. Tag 9	0,0021
	Tag 7 vs. Tag 12	<0,0001
	Tag 9 vs. Tag 12	<0,0001
Vergleich TCx zw. Hemisphären	ungepaarter t-Test (NaCl vs. HYase)	P-Werte
	Tag 3	0,0004
	Tag 6	<0,0001
	Tag 7	0,0029
	Tag 9	0,3238
	Tag 12	0,0108
Vergleich zw. Hemisphären an Tag 7	ungepaarter t-Test (NaCl vs. HYase)	P-Werte
	CC	0,2392
	CA	0,5556

Anhang B

Trainingsbilder

CR-Raten initial lernender und nicht lernender injizierter Tiere

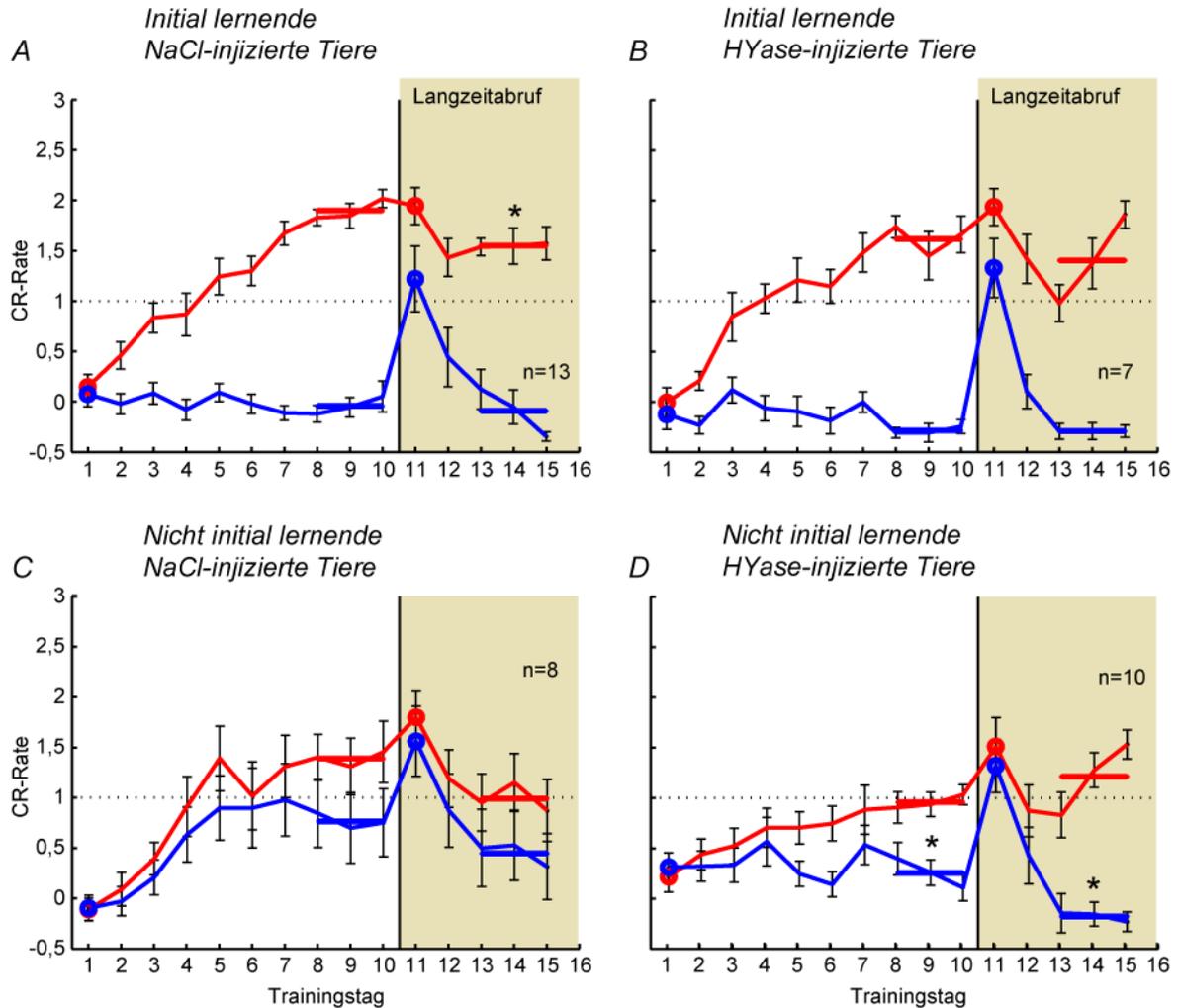


Abbildung B.1 – **CR-Raten initial lernender und nicht lernender injizierter Tiere.** Gezeigt sind in (A-C) die relative konditionierte Reaktion der Tiergruppen auf den Go-Stimulus (rot) und den NoGo-Stimulus (blau) über die Gesamtzeit des Trainings. Die senkrechte, schwarze, durchgezogene Linie indiziert jeweils die Trainingspause von ca. 4 Wochen vor dem Langzeitabruf (Ocker unterlegt) des Erlernten. Zur Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen den Tiergruppen wurden Two-Way-ANOVAS der CR-Werte herangezogen und jeweils die letzten drei Trainingssitzungen (waagerechte rote bzw. blaue Linien) anschließend auch posthoc mit Šidáks multiplem Vergleichstest untersucht (* markieren signifikante Haupteffekte). Initial lernende Tiere der Kontroll- und enzyminjizierten Gruppe (A, B) zeigten signifikante Effekte für die Hit-Plateaus in „Gruppe“ ($F_{(1,113)} = 5,891$, $P = 0,0168$) und „Phase“ ($F_{(1,113)} = 10,006$, $P = 0,0020$), sowie in der „Gruppe“ ($F_{(1,113)} = 8,908$, $P = 0,0035$) für die FA-Plateaus. Initial nicht lernende Tiere der Kontroll- und enzyminjizierten Gruppe (C, D) zeigten signifikante Interaktion für die Hit-Plateaus ($F_{(1,104)} = 7,602$, $P = 0,0069$) und signifikante Effekte für die FA-Plateaus in „Gruppe“ ($F_{(1,104)} = 19,211$, $P < 0,0001$) und „Phase“ ($F_{(1,104)} = 8,406$, $P = 0,0046$). Im Posthoc-Vergleich zeigte sich, dass nicht initial lernende Hyase injizierte Tiere sich signifikant unterschiedlich für das RT- und das LTR-Plateau im Vergleich zu den Kontrollgruppentieren verhielten. Initial lernende Tiere unterschieden sich posthoc nur im RT-Plateau der Kontrollgruppe. Statistische Werte zu allen Vergleichen sind in den Tabellen A.13, A.11 zu finden.

CR-Raten aller biochemisch analysierter Tiere

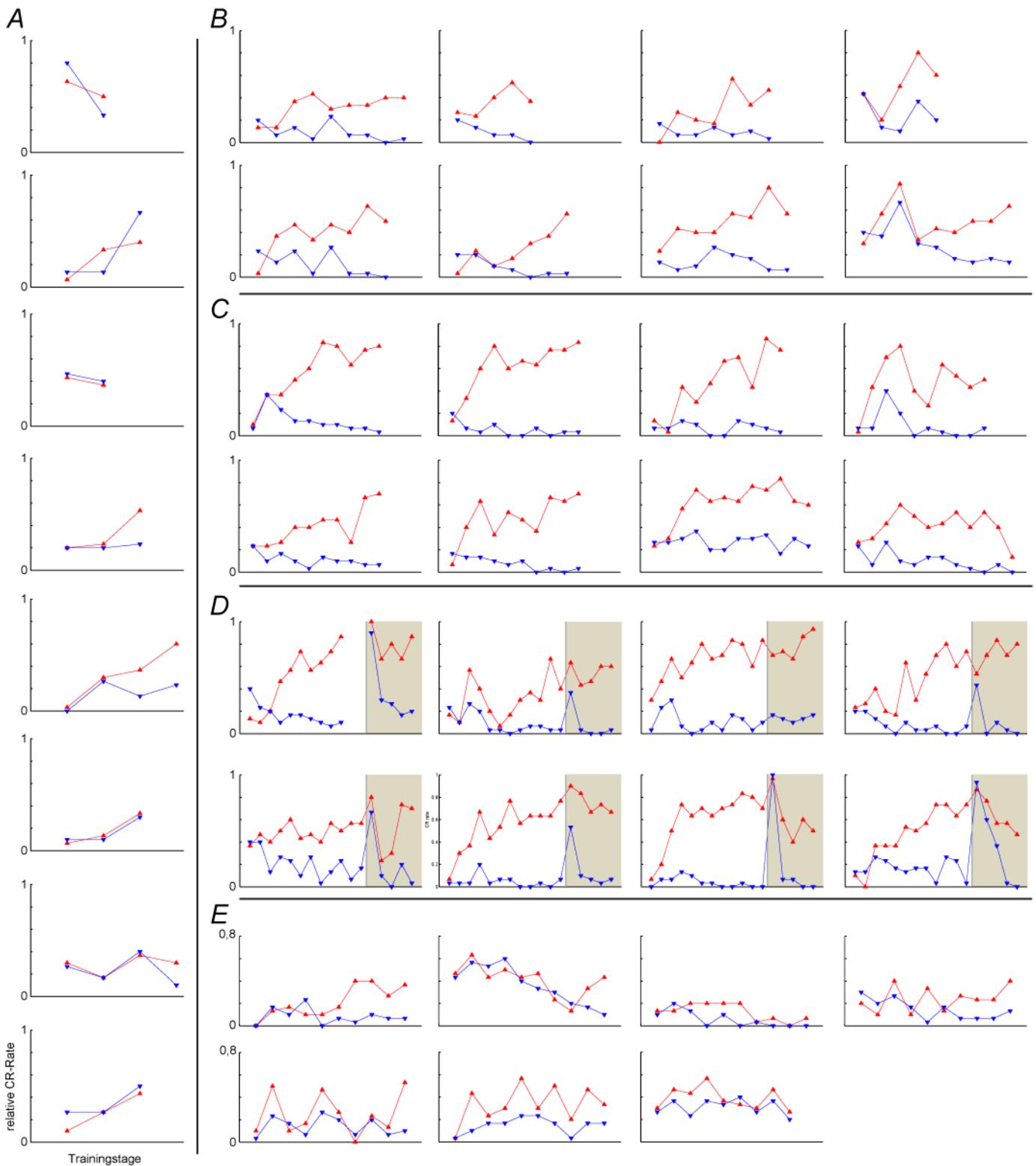


Abbildung B.2 – CR-Raten aller biochemisch analysierter Tiere Gezeigt sind die CR-Raten aller biochemisch analysierter Tiere nach Trainingsgruppen sortiert. In (A) ist die AV-Gruppe, in (B) die AQ-Gruppe, in (C) die RT-Gruppe, in (D) die LTR-Gruppe und in (E) die NL-Gruppe gezeigt. Die roten und blauen Dreiecke zeigen jeweils die CR-Raten an den jeweiligen Versuchstagen für Go- und NoGo-Reaktionen der Tiere. Die Achsenbeschriftung in A gilt für die gesamte Abbildung. Das zusammengefasste Gruppenverhalten ist jeweils in Abb. 3.4, die statistische Auswertung in Tab. A.2 gezeigt.

CR-Raten aller einzelner injizierter Mäuse

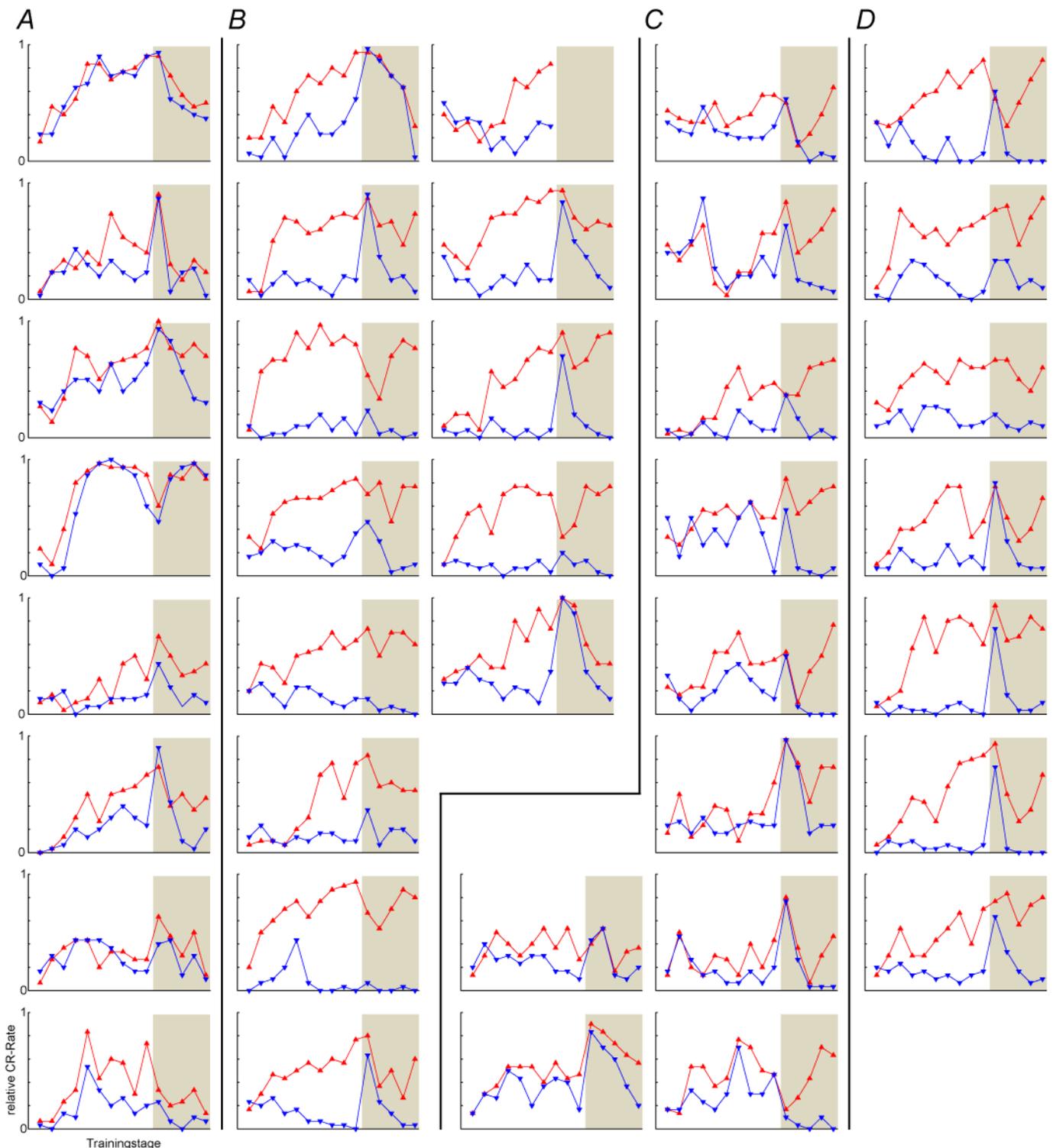


Abbildung B.3 – **CR-Raten aller einzelner injizierter Mäuse** Gezeigt sind die CR-Raten aller Einzeltiere der injizierten Trainingsgruppen sortiert nach Gruppenzugehörigkeit. In (A) sind die nicht initial diskriminierenden NaCl-injizierten Mäuse, in (B) die NaCl-injizierten initial diskriminierenden Tiere, in (C) die HYase injizierten nicht initial diskriminierenden Tiere und in (D) die HYase-injizierten initial diskriminierenden Tiere gezeigt. Die roten und blauen Dreiecke zeigen jeweils die CR-Raten an den jeweiligen Versuchstagen für Go- und NoGo-Reaktionen der Tiere. Die Achsenbeschriftung in A gilt für die gesamte Abbildung. In Ocker unterlegt ist jeweils die LTR-Training nach einer Pause von etwa 4 Wochen dargestellt. Das zusammengefasste Gruppenverhalten ist jeweils in Abb. 3.8, 3.9 und B.1, die statistische Auswertung aller Tiere in den Tabellen A.9, A.10, A.11, A.12, A.13 und A.14 gezeigt.

Anhang C

SDS-PAGE-Gelherstellung und verwendete Lösungen

TG-Gel-Herstellung

Tabelle C.1 – Substanzmengen zur Herstellung der 5 % - 20 % - Proteingradientengele (vgl. Abschnitt 2.3.2)

Substanz	Trenngel mit Gradient (pH 8,8)		Sammelgel (pH 6,8)
	Acrylamid T=20 %	Acrylamid T=5 %	Acrylamid T=5 %
Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl pH 8,8)	3,438 / 8,25 ml	3,438 / 8,25 ml	— / —
Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCl pH 6,8)	— / —	— / —	2,5 / 6 ml
ddH ₂ O	— / —	7,475 / 17,94 ml	3,27 / 7,84 ml
Glycerol 87 %	3,125 / 7,5 ml	0,788 / 1,89 ml	2,3 / 5,52 ml
Acrylamid T=40 %	6,875 / 16,5 ml	1,72 / 4,12 ml	— / —
Acrylamid T=30 %	— / —	— / —	1,65 / 3,9 ml
EDTA 0,2 mol/l	137,5 / 330 µl	137,5 / 330 µl	100 / 240 µl
SDS 10 %	137,5 / 330 µl	137,5 / 330 µl	100 / 240 µl
TEMED	9,17 / 22 µl	9,17 / 22 µl	7,2 / 17,2 µl
Bromphenolblau 0,5 %	50 / 120 µl	— / —	— / —
Phenolrot	— / —	— / —	58 / 140 µl
APS 10 %	35,4 / 85 µl	53,3 / 128 µl	57,1 / 137 µl
2,2,2-Trichlorethanol	200 / 400 µl	200 / 400 µl	— / —

Verwendete Lösungen

Tabelle C.2 – Zusammensetzungen der TG-Blotpuffer (vgl. Abschnitt 2.3.2)

10x Puffer (Vorratslösung)	Tris (250 mM) Glycin (1,92 M) SDS (0,2 %)
1x Puffer (Gebrauchslösung)	100 ml (10-fach Puffer) 200 ml Methanol 700 ml ddH ₂ O

Tabelle C.3 – Zusammensetzung der SDS-Puffer (vgl. Abschnitt 2.3.1)

1x SDS-Puffer	Tris (250 mM) pH 6,8 Glycerol 40 % (v/v) SDS 1 % (w/v) β -Mercaptoethanol Bromphenolblau 0,02 %
2x SDS-Puffer	1:2-Verdünnung aus 4x Puffer mit ddH ₂ O)
1x SDS-Puffer	1:4-Verdünnung aus 4x Puffer mit ddH ₂ O)

Tabelle C.4 – Zusammensetzungen der TBS-Puffer (vgl. Abschnitt 2.3.3)

10x TBS-Puffer (2l, Vorratslösung)	48,4 g Tris 160 g NaCl pH 7,6 (Einstellung mit konz. HCl) auffüllen auf 2l mit ddH ₂ O
1x TBS-Puffer (Gebrauchslösung)	1:10-Verdünnung aus 10-fach Puffer
1x TBS-T-Puffer (Gebrauchslösung)	99 ml (1x TBS-Puffer) + 1 ml TWEEN 20

Tabelle C.5 – Zusammensetzungen der PBS-Puffer (vgl. Abschnitt 2.4)

10x PBS-Puffer (2l, Vorratslösung)	160 g NaCl 4 g KCl 4,8 g KH ₂ PO ₄ 43,2 g Na ₂ HPO ₄ × 7 H ₂ O pH 7,4 einstellen auffüllen auf 2l mit ddH ₂ O
1x PBS-Puffer (Gebrauchslösung)	1:10-Verdünnung aus 10-fach Puffer

Tabelle C.6 – Zusammensetzungen der 4 % PFA-Lösung (vgl. Abschnitt 2.4)

4 % PFA-Lösung	40 g Paraformaldehyd in 800 ml ddH ₂ O lösen (2 h 50 °C) 100 ml 10x PBS pH 7,4 pH-Kontrolle (pH 7,4)
Aliquots (Gebrauchslösung)	12 ml in -20 °C

Anhang D

Eigene Publikation

Happel, M. F. K., Niekisch, H., Castiblanco Rivera, L. L., Ohl, F. W., Deliano, M., & Frischknecht, R. Enhanced cognitive flexibility in reversal learning induced by removal of the extracellular matrix in auditory cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Band 111(7): 2800–5, 2014b.

Literaturverzeichnis

- Ariga, T., Miyatake, T., & Yu, R. K. Role of proteoglycans and glycosaminoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and related disorders: Amyloidogenesis and therapeutic strategies-A review. *Journal of Neuroscience Research*, Band 88(11): 2303–2315, 2010.
- Bakin, J. S. & Weinberger, N. M. Classical conditioning induces CS-specific receptive field plasticity in the auditory cortex of the guinea pig. *Brain Research*, Band 536(1-2): 271–286, 1990.
- Balmer, T. S., Carels, V. M., Frisch, J. L., & Nick, T. A. Modulation of Perineuronal Nets and Parvalbumin with Developmental Song Learning. *Journal of Neuroscience*, Band 29(41): 12.878–12.885, 2009.
- Bao, S., Chan, V. T., & Merzenich, M. M. Cortical remodelling induced by activity of ventral tegmental dopamine neurons. *Nature*, Band 412(6842): 79–83, 2001.
- Blosa, M., Sonntag, M., Brückner, G., Jäger, C., Seeger, G., Matthews, R., Rübsamen, R., Arendt, T., & Morawski, M. Unique features of extracellular matrix in the mouse medial nucleus of trapezoid body – Implications for physiological functions. *Neuroscience*, Band 228: 215–234, 2013.
- Brösicke, N. & Faissner, A. Role of tenascins in the ECM of gliomas. *Cell Adhesion & Migration*, Band 9(1-2): 131–140, 2015.
- Brown, M. W., Wilson, F. A. W., & Riches, I. P. Neuronal evidence that inferomedial temporal cortex is more important than hippocampus in certain processes underlying recognition memory. *Brain Research*, Band 409: 158–162, 1987.
- Brückner, G., Bringmann, A., Härtig, W., Köppe, G., Delpéch, B., & Brauer, K. Acute and long-lasting changes in extracellular-matrix chondroitin-sulphate proteoglycans induced by injection of chondroitinase ABC in the adult rat brain. *Experimental Brain Research*, Band 121(3): 300–310, 1998.
- Budinger, E., Heil, P., & Scheich, H. Functional organization of auditory cortex in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). III. Anatomical subdivisions and corticocortical connections. *European Journal of Neuroscience*, Band 12(7): 2425–2451, 2000.
- Budinger, E. & Scheich, H. Anatomical connections suitable for the direct processing of neuronal information of different modalities via the rodent primary auditory cortex. *Hearing Research*, Band 258(1-2): 16–27, 2009.
- Bukalo, O., Schachner, M., & Dityatev, A. Modification of extracellular matrix by enzymatic removal of chondroitin sulfate and by lack of tenascin-R differentially affects several forms of synaptic plasticity in the hippocampus. *Neuroscience*, Band 104(2): 359–369, 2001.

- Bukalo, O., Schachner, M., & Dityatev, A. Hippocampal Metaplasticity Induced by Deficiency in the Extracellular Matrix Glycoprotein Tenascin-R. *Journal of Neuroscience*, Band 27(22): 6019–6028, 2007.
- Carandini, M. & Churchland, A. K. Probing perceptual decisions in rodents. *Nature Neuroscience*, Band 16(7): 824–831, 2013.
- Carulli, D., Pizzorusso, T., Kwok, J. C. F., Putignano, E., Poli, A., Forostyak, S., Andrews, M. R., Deepa, S. S., Glant, T. T., & Fawcett, J. W. Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain*, Band 133(8): 2331–2347, 2010.
- de Vivo, L., Landi, S., Panniello, M., Baroncelli, L., Chierzi, S., Mariotti, L., Spolidoro, M., Pizzorusso, T., Maffei, L., & Ratto, G. Extracellular matrix inhibits structural and functional plasticity of dendritic spines in the adult visual cortex. *Nature Communications*, Band 4: 1484, 2013.
- Diekamp, B., Kalt, T., Ruhm, A., Koch, M., & Güntürkün, O. Impairment in a discrimination reversal task after D1 receptor blockade in the pigeon "prefrontal cortex". *Behavioral Neuroscience*, Band 114(6): 1145–1155, 2000.
- Dityatev, A., Schachner, M., & Sonderegger, P. The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis. *Nature Reviews Neuroscience*, Band 11(11): 735–746, 2010.
- Dudai, Y. The Restless Engram: Consolidations Never End. *Annual Review of Neuroscience*, Band 35(1): 227–247, 2012.
- Dudel, J., Menzel, R., & Schmidt, R. F., Herausgeber. *Neurowissenschaft. Springer-Lehrbuch*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2001.
- Dzyubenko, E., Gottschling, C., & Faissner, A. Neuron-Glia Interactions in Neural Plasticity: Contributions of Neural Extracellular Matrix and Perineuronal Nets. *Neural Plasticity*, Band 2016: 1–14, 2016.
- Freeman, J. H. & Steinmetz, A. B. Neural circuitry and plasticity mechanisms underlying delay eyeblink conditioning. *Learning & Memory*, Band 18(10): 666–677, 2011.
- Frischknecht, R., Fejtova, A., Viesti, M., Stephan, A., & Sonderegger, P. Activity-Induced Synaptic Capture and Exocytosis of the Neuronal Serine Protease Neurotrypsin. *Journal of Neuroscience*, Band 28(7): 1568–1579, 2008.
- Frischknecht, R. & Happel, M. F. K. Impact of the extracellular matrix on plasticity in juvenile and adult brains. *e-Neuroforum*, Band 7(1): 1–6, 2016.
- Frischknecht, R., Heine, M., Perrais, D., Seidenbecher, C. I., Choquet, D., & Gundelfinger, E. D. Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nature Neuroscience*, Band 12(7): 897–904, 2009.
- Frischknecht, R. & Seidenbecher, C. I. The crosstalk of hyaluronan-based extracellular matrix and synapses. *Neuron Glia Biology*, Band 4(03): 249, 2008.
- Frischknecht, R. & Seidenbecher, C. I. Brevican: A key proteoglycan in the perisynaptic extracellular matrix of the brain. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Band 44(7): 1051–1054, 2012.

- Gogolla, N., Caroni, P., Luthi, A., & Herry, C. Perineuronal Nets Protect Fear Memories from Erasure. *Science*, Band 325(5945): 1258–1261, 2009.
- Gonzalez-Lima, F. & Scheich, H. Functional activation in the auditory system of the rat produced by arousing reticular stimulation: a 2-deoxyglucose study. *Brain Research*, Band 299(2): 201–214, 1984.
- Gundelfinger, E. D., Frischknecht, R., Choquet, D., & Heine, M. Converting juvenile into adult plasticity: a role for the brain's extracellular matrix. *European Journal of Neuroscience*, Band 31(12): 2156–2165, 2010.
- Hamel, M. G., Ajmo, J. M., Leonardo, C. C., Zuo, F., Sandy, J. D., & Gottschall, P. E. Multimodal signaling by the ADAMTSs (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) promotes neurite extension. *Experimental Neurology*, Band 210(2): 428–440, 2008.
- Happel, M. F. & Frischknecht, R. Neuronal Plasticity in the Juvenile and Adult Brain Regulated by the Extracellular Matrix. In: *Composition and Function of the Extracellular Matrix in the Human Body*. InTech, 2016.
- Happel, M. F. K., Deliano, M., Handschuh, J., & Ohl, F. W. Dopamine-Modulated Recurrent Corticoefferent Feedback in Primary Sensory Cortex Promotes Detection of Behaviorally Relevant Stimuli. *Journal of Neuroscience*, Band 34(4): 1234–1247, 2014a.
- Happel, M. F. K., Niekisch, H., Castiblanco Rivera, L. L., Ohl, F. W., Deliano, M., & Frischknecht, R. Enhanced cognitive flexibility in reversal learning induced by removal of the extracellular matrix in auditory cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Band 111(7): 2800–2805, 2014b.
- Iwakura, Y., Nawa, H., Sora, I., & Chao, M. V. Dopamine D1 Receptor-induced Signaling through TrkB Receptors in Striatal Neurons. *Journal of Biological Chemistry*, Band 283(23): 15.799–15.806, 2008.
- Jakob, T. F., Döring, U., & Illing, R.-B. The pattern of Fos expression in the rat auditory brainstem changes with the temporal structure of binaural electrical intracochlear stimulation. *Experimental Neurology*, Band 266: 55–67, 2015.
- Kähne, T., Richter, S., Kolodziej, A., Smalla, K.-H., Pielot, R., Engler, A., Ohl, F. W., Dieterich, D. C., Seidenbecher, C., Tischmeyer, W., Naumann, M., & Gundelfinger, E. D. Proteome rearrangements after auditory learning: high-resolution profiling of synapse-enriched protein fractions from mouse brain. *Journal of Neurochemistry*, Band 138(1): 124–138, 2016.
- Karunakaran, S., Chowdhury, A., Donato, F., Quairiaux, C., Michel, C. M., & Caroni, P. PV plasticity sustained through D1/5 dopamine signaling required for long-term memory consolidation. *Nature Neuroscience*, Band 19(3): 454–464, 2016.
- Kim, S.-H., Turnbull, J., & Guimond, S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *Journal of Endocrinology*, Band 209(2): 139–151, 2011.
- Kraus, M. Memory Consolidation for the Discrimination of Frequency-Modulated Tones in Mongolian Gerbils Is Sensitive to Protein-Synthesis Inhibitors Applied to the Auditory Cortex. *Learning & Memory*, Band 9(5): 293–303, 2002.

- Krauss, P., Tziridis, K., Metzner, C., Schilling, A., Hoppe, U., & Schulze, H. Stochastic Resonance Controlled Upregulation of Internal Noise after Hearing Loss as a Putative Cause of Tinnitus-Related Neuronal Hyperactivity. *Frontiers in Neuroscience*, Band 10(DEC), 2016.
- Ladepêche, L., Dupuis, J. P., Bouchet, D., Doudnikoff, E., Yang, L., Campagne, Y., Bezaud, E., Hosy, E., & Groc, L. Single-molecule imaging of the functional crosstalk between surface NMDA and dopamine D1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Band 110(44): 18.005–18.010, 2013.
- Ladner, C. L., Yang, J., Turner, R. J., & Edwards, R. A. Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Analytical Biochemistry*, Band 326(1): 13–20, 2004.
- Lensjø, K. K., Lepperød, M. E., Dick, G., Hafting, T., & Fyhn, M. Removal of Perineuronal Nets Unlocks Juvenile Plasticity Through Network Mechanisms of Decreased Inhibition and Increased Gamma Activity. *The Journal of Neuroscience*, Band 37(5): 1269–1283, 2017.
- Leveugle, B. & Fillit, H. Proteoglycans and the acute-phase response in Alzheimer's disease brain. *Molecular Neurobiology*, Band 9(1-3): 25–32, 1994.
- Lison, H., Happel, M., Schneider, F., Baldauf, K., Kerbstat, S., Seelbinder, B., Schneeberg, J., Zappe, M., Goldschmidt, J., Budinger, E., Schröder, U., Ohl, F., Schilling, S., Demuth, H.-U., Scheich, H., Reymann, K., & Rönicke, R. Disrupted cross-laminar cortical processing in β amyloid pathology precedes cell death. *Neurobiology of Disease*, Band 63: 62–73, 2014.
- Luo, L. & Flanagan, J. G. Development of Continuous and Discrete Neural Maps. *Neuron*, Band 56(2): 284–300, 2007.
- Mao, Y., Zang, S., Zhang, J., & Sun, X. Early chronic blockade of NR2B subunits and transient activation of NMDA receptors modulate LTP in mouse auditory cortex. *Brain Research*, Band 1073-1074: 131–138, 2006.
- Matsumoto-Miyai, K., Sokolowska, E., Zurlinden, A., Gee, C. E., Lüscher, D., Hettwer, S., Wölfel, J., Ladner, A. P., Ster, J., Gerber, U., Rüllicke, T., Kunz, B., & Sonderegger, P. Coincident Pre- and Post-synaptic Activation Induces Dendritic Filopodia via Neurotrypsin-Dependent Agrin Cleavage. *Cell*, Band 136(6): 1161–1171, 2009.
- Miao, Q.-L., Ye, Q., & Zhang, X.-H. Perineuronal net, CSPG receptor and their regulation of neural plasticity. *Acta Physiologica Sinica*, Band 66(4): 387–97, 2014.
- Michaluk, P., Kolodziej, L., Mioduszevska, B., Wilczynski, G. M., Dzwonek, J., Jaworski, J., Gorecki, D. C., Ottersen, O. P., & Kaczmarek, L. beta-Dystroglycan as a Target for MMP-9, in Response to Enhanced Neuronal Activity. *Journal of Biological Chemistry*, Band 282(22): 16.036–16.041, 2007.
- Morawski, M., Brückner, G., Jäger, C., Seeger, G., Matthews, R. T., & Arendt, T. Involvement of perineuronal and perisynaptic extracellular matrix in Alzheimer's disease neuropathology. *Brain Pathology*, Band 22(4): 547–561, 2012.
- Nagai, T., Yamada, K., Yoshimura, M., Ishikawa, K., Miyamoto, Y., Hashimoto, K., Noda, Y., Nitta, A., & Nabeshima, T. From The Cover: The tissue plasminogen activator-plasmin system participates in the rewarding effect of morphine by regulating dopamine release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Band 101(10): 3650–3655, 2004.

- Nai, Q., Li, S., Wang, S.-H., Liu, J., Lee, F. J., Frankland, P. W., & Liu, F. Uncoupling the D1-N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptor Complex Promotes NMDA-Dependent Long-Term Potentiation and Working Memory. *Biological Psychiatry*, Band 67(3): 246–254, 2010.
- Ohl, F. W. & Scheich, H. Learning-induced plasticity in animal and human auditory cortex. *Current Opinion in Neurobiology*, Band 15(4): 470–477, 2005.
- Ohl, F. W., Scheich, H., & Freeman, W. J. Change in pattern of ongoing cortical activity with auditory category learning. *Nature*, Band 412(6848): 733–736, 2001.
- Ohl, F. W., Wetzel, W., Wagner, T., Rech, A., & Scheich, H. Bilateral ablation of auditory cortex in Mongolian gerbil affects discrimination of frequency modulated tones but not of pure tones. *Learning & Memory*, Band 6(4): 347–362, 1999.
- Paxinos, G. & Franklin, K. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 1997.
- Pizzorusso, T. Reactivation of Ocular Dominance Plasticity in the Adult Visual Cortex. *Science*, Band 298(5596): 1248–1251, 2002.
- Rauch, U. Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Band 61(16): 2031–45, 2004.
- Raybuck, J. D. & Lattal, K. M. Bridging the interval: Theory and neurobiology of trace conditioning. *Behavioural Processes*, Band 101: 103–111, 2014.
- Romberg, C., Yang, S., Melani, R., Andrews, M. R., Horner, A. E., Spillantini, M. G., Bussey, T. J., Fawcett, J. W., Pizzorusso, T., & Saksida, L. M. Depletion of Perineuronal Nets Enhances Recognition Memory and Long-Term Depression in the Perirhinal Cortex. *Journal of Neuroscience*, Band 33(16): 7057–7065, 2013.
- Scheich, H., Brechmann, A., Brosch, M., Budinger, E., & Ohl, F. W. The cognitive auditory cortex: Task-specificity of stimulus representations. *Hearing Research*, Band 229(1-2): 213–224, 2007.
- Schicknick, H., Schott, B. H., Budinger, E., Smalla, K.-H., Riedel, A., Seidenbecher, C. I., Scheich, H., Gundelfinger, E. D., & Tischmeyer, W. Dopaminergic Modulation of Auditory Cortex-Dependent Memory Consolidation through mTOR. *Cerebral Cortex*, Band 18(11): 2646–2658, 2008.
- Schreiner, C. E. & Winer, J. a. Auditory Cortex Mapmaking: Principles, Projections, and Plasticity. *Neuron*, Band 56(2): 356–365, 2007.
- Schultz, W. Neuronal Reward and Decision Signals: From Theories to Data. *Physiological Reviews*, Band 95(3): 853–951, 2015.
- Shimobayashi, M. & Hall, M. N. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Band 15(3): 155–162, 2014.
- Stark, H., Rothe, T., Wagner, T., & Scheich, H. Learning a new behavioral strategy in the shuttle-box increases prefrontal dopamine. *Neuroscience*, Band 126(1): 21–29, 2004.
- Stark, H. & Scheich, H. Dopaminergic and Serotonergic Neurotransmission Systems Are Differentially Involved in Auditory Cortex Learning: A Long-Term Microdialysis Study of Metabolites. *Journal of Neurochemistry*, Band 68(2): 691–697, 1997.

- Stiebler, I., Neulist, R., Fichtel, I., & Ehret, G. The auditory cortex of the house mouse: left-right differences, tonotopic organization and quantitative analysis of frequency representation. *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, Band 181(6): 559–571, 1997.
- Sun, X. Dopamine Receptor Stimulation Modulates AMPA Receptor Synaptic Insertion in Prefrontal Cortex Neurons. *Journal of Neuroscience*, Band 25(32): 7342–7351, 2005.
- Sutton, M. A., Schmidt, E. F., Choi, K.-H., Schad, C. A., Whisler, K., Simmons, D., Karanian, D. A., Monteggia, L. M., Neve, R. L., & Self, D. W. Extinction-induced upregulation in AMPA receptors reduces cocaine-seeking behaviour. *Nature*, Band 421(6918): 70–75, 2003.
- Valenzuela, J. C., Heise, C., Franken, G., Singh, J., Schweitzer, B., Seidenbecher, C. I., & Frischknecht, R. Hyaluronan-based extracellular matrix under conditions of homeostatic plasticity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Band 369(1654): 20130.606–20130.606, 2014.
- Végh, M. J., Heldring, C. M., Kamphuis, W., Hijazi, S., Timmerman, A. J., Li, K. W., van Nierop, P., Mansvelder, H. D., Hol, E. M., Smit, A. B., & van Kesteren, R. E. Reducing hippocampal extracellular matrix reverses early memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, Band 2(1): 76, 2014.
- Weinberger, N. M. Specific long-term memory traces in primary auditory cortex. *Nature Reviews Neuroscience*, Band 5(4): 279–290, 2004.
- Woodworth, A., Pesheva, P., Fiete, D., & Baenziger, J. U. Neuronal-specific Synthesis and Glycosylation of Tenascin-R. *Journal of Biological Chemistry*, Band 279(11): 10.413–10.421, 2004.
- Xue, Y.-X., Xue, L.-F., Liu, J.-F., He, J., Deng, J.-H., Sun, S.-C., Han, H.-B., Luo, Y.-X., Xu, L.-Z., Wu, P., & Lu, L. Depletion of Perineuronal Nets in the Amygdala to Enhance the Erasure of Drug Memories. *Journal of Neuroscience*, Band 34(19): 6647–6658, 2014.
- Yamaguchi, Y. Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Band 57(2): 276–289, 2000.