

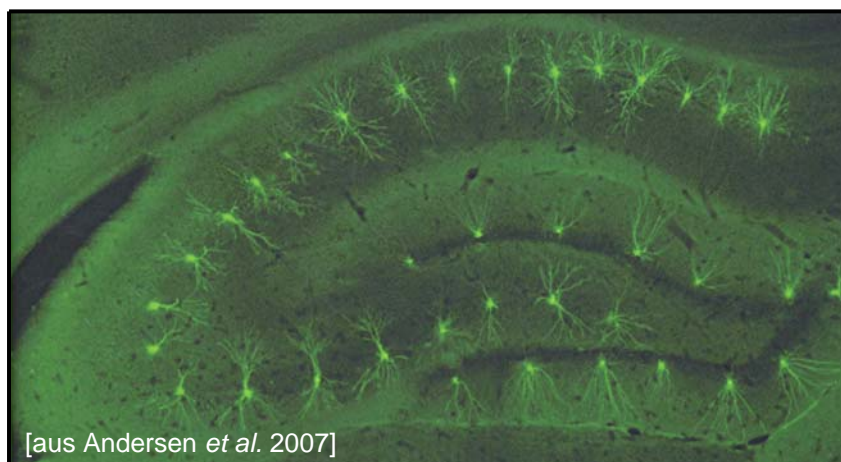


„Lernassozierte Genexpression im murinen Hippokampus“

Dissertation zur Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

von
Sammy Haege
geb. am 15.05.1972 in Ludwigshafen/Rhein

Mainz, den 08.12.2008



[aus Andersen *et al.* 2007]

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungen	IX
Zusammenfassung	1
<i>Abstract</i>	2
1. Einleitung	3
1.1 Der Hippokampus bei Lern- und Gedächtnisprozessen	3
1.2 Das räumliche Lernen in der <i>Morris Water Maze</i>	5
1.3 Langzeitpotenzierung und <i>MWM</i> -Lernen	6
1.4 Genexpression und <i>MWM</i> -Lernen	7
1.5 Molekulare Mechanismen im hippokampalen Neuron	8
1.6 Der Zwei Farben- <i>Microarray</i>	12
1.7 Beschreibung der für die <i>Real-Time PCR</i> -Studie ausgewählten Kandidatengene	15
1.7.1 Lernassoziierte Gene	16
1.7.2 Mit der Alzheimer Demenz assoziierte Gene	22
1.8 Gene der mitochondrialen Atmungskette	27
1.9 Ziel der Arbeit	30
2. Material und Methoden	32
2.1 Mäuse	32
2.2 <i>Morris Water Maze</i>	33
2.3 Versuchsdesign	35
2.4 Gehirnpräparation	36

2.5	Gewebeaufreinigung	38
2.5.1	Trizol-Extraktion von <i>RNA</i>	38
2.5.2	Extraktion von <i>RNA/DNA/Protein</i>	38
2.5.3	<i>DNase</i> -Verdau	38
2.5.4	Qualitätskontrolle der <i>RNA</i>	39
2.6	<i>cDNA-Microarray</i>	39
2.6.1	Herstellung des <i>cDNA</i> -Genchips	40
2.6.1.1	Synthese der <i>PCR</i> -Produkte	42
2.6.1.2	Sequenzierung der <i>PCR</i> -Produkte	43
2.6.1.3	Spotten der <i>PCR</i> -Produkte	43
2.6.2	<i>cDNA</i> -Synthese und -markierung	44
2.6.3	Durchführung der <i>Microarray</i> -Experimente	45
2.6.4	Auswertung der <i>Microarray</i> -Experimente	46
2.6.4.1	Vergleich der Farbstoffvarianten <i>Cy3/Cy5</i> , <i>AA-Cy3/Cy5</i> und <i>Alexa555/647</i>	47
2.6.4.2	Auswertung des <i>Alexa-Microarray</i> mit einem Farbkode	48
2.6.4.3	Statistische Analyse des <i>Alexa-Microarray</i> am IMBEI	51
2.7	quantitative <i>Real-Time PCR</i>	52
2.7.1	<i>cDNA</i> -Synthese	52
2.7.2	Durchführung der <i>qPCR</i> -Experimente	52
2.7.3	Auswertung der <i>qPCR</i> -Experimente	54
2.8	<i>Western Blot</i>	54
2.9	Statistik	56
3.	Ergebnisse	58
3.1	Analyse des Lernverhaltens	58
3.1.1	Lernverhalten von wildtypischen FVB/NxC57Bl/6-Mäusen	58
3.1.2	Lernverhalten von guten und schlechten Lernern	61
3.2	Ein methodischer Vergleich: Die Farbstoffe <i>Cy3/Cy5</i> , <i>AA-Cy3/Cy5</i> und <i>Alexa555/647</i>	64
3.3	Detektion lernrelevanter Gene im <i>Alexa-Microarray</i>	69

3.4	Detektion <i>MWM</i> -relevanter Gene mit der <i>Real-Time PCR</i>	76
3.4.1	Evaluation der stabilsten endogenen Kontrolle	77
3.4.2	Mit <i>MWM</i> -Erfahrung assoziierte Genregulation in Hippokampus	78
3.4.3	Mit <i>MWM</i> -Erfahrung assoziierte Genexpression im Cerebellum	83
3.4.4	<i>mRNA</i> -Synthese in Hippokampus und Cerebellum	83
3.4.5	Lernassoziierte Genexpression im Hippokampus	85
3.4.6	Lernassoziierte Genexpression im Cerebellum	86
3.4.7	Unterschiede in der lernassoziierten Genexpression zwischen guten und schlechten Lernern	87
3.5	Lernassoziierte Proteinexpression in guten und schlechten Lernern	89
4.	Diskussion	91
4.1	Methodendiskussion	92
4.1.1	Vergleich der <i>Alexa</i> - und <i>Cy</i> -Farbstoffe im <i>Microarray</i>	92
4.1.2	Auswertung der <i>Microarray</i> -Daten	93
4.1.3	Evaluation der stabilsten endogenen Kontrolle für die <i>Real-Time PCR</i> -Analyse	95
4.2	Lernleistungsabhängige Klassifikation der FVB/N \times C57Bl/6-Mäuse	96
4.3	Regulation von Genen bei <i>MWM</i> -Erfahrung	99
4.4	Regulation von Genen bei effizientem <i>MWM</i> -Lernen	102
4.4.1	Detektion Mitochondrium-assoziiierter Gene im <i>Microarray</i>	102
4.4.2	Detektion lernassoziiierter Gene in der <i>Real-Time PCR</i>	104
4.5	Expression von Genen und Protein bei verschlechtertem <i>MWM</i> -Lernen	110
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick	114

5.	Anhang: <i>Microarray</i>-Ergebnisse	116
6.	Literaturverzeichnis	135
7.	Nachwort und Dank	168
8.	Eidesstattliche Erklärung	169
9.	Lebenslauf	170
10.	Veröffentlichungen	172

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 1.1:	Die Hippokampusformation im Nagetier-Gehirn.	4
Abb. 1.2:	Das hippokampale Neuron bei der Gedächtnisbildung.	12
Abb. 1.3:	Absorptions- und Fluoreszenzspektra der Farbstoffe <i>Cy3/Cy5</i> und <i>Alexa555/647</i> .	14
Abb. 1.4:	Mögliche Rolle der <i>DNA</i> -Methylierung bei der lernbedingten Regulation von Genen.	17
Abb. 1.5:	Rolle von PP1 bei der Gedächtnisbildung.	20
Abb. 1.6:	<i>Kibra</i> -Expression im humanen Gehirn.	22
Abb. 1.7:	Schema eines präsynaptischen Terminals.	24
Abb. 1.8:	Modell für die Rolle von <i>Sorl1</i> bei der APP-Prozessierung.	25
Abb. 1.9:	Das Mitochondriumgenom.	28
Abb. 1.10:	Die mitochondriale Atmungskette.	30
Abb. 2.1:	Einteilung der <i>MWM</i> in Zonen und Versuchsschema zur Durchführung der <i>MWM</i> -Versuche.	34
Abb. 2.2:	Schema der Gehirnpräparation.	37
Abb. 2.3:	Qualitätskontrolle der <i>RNA</i> .	40
Abb. 2.4:	Zwei Farben- <i>cDNA-Microarray</i> .	41
Abb. 2.5:	Quantifizierung der <i>Microarray</i> -Signalwerte.	46
Abb. 2.6:	<i>MA-Plots</i> .	47
Abb. 2.7:	Farbcode 1.	49-50
Abb. 2.8:	Farbcode 2.	50
Abb. 2.9:	<i>Ct</i> -Werte und Amplifikationskurven.	55
Abb. 3.1.1:	Geschwindigkeit der FVB/NxC57Bl/6-Mäuse.	59
Abb. 3.1.2:	Lernkurve der FVB/NxC57Bl/6-Mäuse.	60
Abb. 3.1.3:	Gedächtnistest bei FVB/NxC57Bl/6-Mäuse.	61

Abb. 3.1.4:	Lernkurve der guten und schlechten Lerner.	62
Abb. 3.1.5:	Geschwindigkeit der guten und schlechten Lerner.	63
Abb. 3.1.6:	Gedächtnistest bei guten und schlechten Lernern.	64
Abb. 3.2.1:	Auswertbare Signale.	65
Abb. 3.2.2:	Signalintensität der <i>Microarray</i> -Rohdaten.	66
Abb. 3.2.3:	Signalstärke in verschiedenen Signalintensitätsfenstern.	67
Abb. 3.2.4:	Variation der <i>Microarray</i> -Rohdaten.	68
Abb. 3.2.5:	Variation der der <i>Microarray</i> -Rohdaten von <i>Bdnf</i> und <i>mt-Cytb</i> .	68
Abb. 3.3.1:	Farbkode zu den mitochondrialen Genen der Atmungskette.	70
Abb. 3.3.2:	Clusteranalyse für die Tage 1-4.	71
Abb. 3.3.3:	Clusteranalyse für die Tage 1-5.	73
Abb. 3.4.1:	<i>PCR</i> -Produkte zu den in der <i>qPCR</i> verwendeten <i>Primern</i> .	76
Abb. 3.4.2:	Schmelzkurvenanalyse.	77
Abb. 3.4.3:	Mit <i>MWM</i> -Erfahrung assoziierte Genexpression im Hippokampus.	81-82
Abb. 3.4.4:	Mit <i>MWM</i> -Erfahrung assoziierte Genexpression im Cerebellum.	84
Abb. 3.4.5:	<i>Ct</i> -Werte in Hippokampus und Cerebellum.	85
Abb. 3.4.6:	Lernassoziierte Genexpression im Hippokampus.	86
Abb. 3.4.7:	Unterschiedliche lernassoziierte Genexpression im Hippokampus von guten und schlechten Lernern.	88
Abb. 3.5:	Lernassoziierte Proteinexpression im Hippokampus von guten und schlechten Lernern.	90
Abb. 4.1:	Genregulation während des vierstufigen <i>MWM</i> -Lernprozesses.	104
Abb. 4.2:	Modell für die Beteiligung von Genüberexpression bei kognitiven Defiziten.	112
Abb. 5:	Mit dem Farbkode beurteilte Genregulationen im <i>Alexa-Microarray</i> .	116-124

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
Tab. 1:	<i>MIAME</i> -Kriterien.	15
Tab. 2.1:	Untersuchte Zeitpunkte in der <i>Water Maze</i> .	35
Tab. 2.2:	Qualitätskriterien.	51
Tab. 3.1:	Anzahl der in der MWM getesteten Lernmäuse	58
Tab. 3.2:	Gene der Clusteranalyse in Abbildung 3.3.2.	72
Tab. 3.3:	Gene der Clusteranalyse in Abbildung 3.3.3.	74
Tab. 3.4:	p-Werte zur lernassoziierten Regulation Mitochondrium-assoziiierter Gene.	75
Tab. 3.5:	Anzahl der für die qPCR-Studie verwendeten Mäuse.	76
Tab. 3.6:	Stabilität der Referenzgene <i>Actb</i> , <i>Rn18s</i> und <i>Gapdh</i> .	79
Tab. 4:	p-Werte im <i>Alexa-Microarray</i> .	125- 133
Tab. 5:	Gennamen der mit der Clusteranalyse identifizierten Gene.	133- 134

Abkürzungen

5-AZA	5-Aza-2'-Deoxyzytidin
AA	Aminoallyl-Esterbindung
AMPA	ionotroper Glutamat(α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure)-Rezeptor
APP	<i>Amyloid Beta (A4) Precursor Protein</i>
Apoer2	Apolipoprotein E-Rezeptor 2
bp	Basenpaare
Bdnf	<i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i>
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-Kinase II
Cat.No.	Katalognummer
CO	Cytochrom C-Oxidase
Cox8a	nuklerär kodierte Untereinheit 8a der Cytochrome C-Oxidase
CREB	cAMP-abhängiges Element(CRE)-Bindeprotein

DEPC	Diethylpyrocarbonat (RNase-Inhibitor)
DNMT	DNA-Methyltransferasen
Dnmt1	DNA(Cytosin-5)-Methyltransferase 1
Dnmt3a	DNA(Cytosin-5)-Methyltransferase 3a
Dnmt3b	DNA(Cytosin-5)-Methyltransferase 3b
FBZ	Fenbendazol
fMRI	funktionelle Magnetresonanztomografie
Gap43	<i>Growth-associated Protein 43</i> (Neuromodulin)
gL	gute Lerner
IEG	<i>Immediate Early Gene</i>
IMBEI	Institut für medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik
KK	Käfigkontrollen
L	Lernmäuse (=gL+sL)
LB	<i>lysogeny broth</i> (Bakterien-Nährmedium)
LTD	<i>Long-Term Depression</i> (Langzeitdepression)
LTP	<i>Long-Term Potentiation</i> (Langzeitpotenzierung)
Mapk	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mapt	Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau
MRT	Magnetresonanztomographie
mt-CO1	mitochondrial kodierte katalytische Untereinheit 1 der Cytochrome C-Oxidase
mt-Cytb	mitochondriale kodierte Cytochrom B
mtDNA	mitochondriale DNA
mt-mRNA	mitochondriale <i>mRNA</i>
mt-Nd1	mitochondrial kodierte katalytische NADH-Dehydrogenase 1
mt-Nd6	mitochondrial kodierte katalytische NADH-Dehydrogenase 6
MWM	<i>Morris Water Maze</i>
NMDA	ionotroper Glutamat(N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor
NS	<i>Novelty</i> +Stress
n.u.	nicht untersuchter Zeitpunkt
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PP1	Proteinphosphatase 1
Pt	<i>Probe Trial</i> (Gedächtnistest)
qPCR	quantitative <i>Real-Time PCR</i>
RT	Raumtemperatur
SK	Schwimmkontrollen
sL	schlechte Lerner
Sorl1	<i>Sortilin-related Receptor, LDLR class A repeats-containing</i>
SSC	<i>Standard Saline Citrate</i>
STP	<i>Short-Term Potentiation</i> (Kurzzeitpotenzierung)
Timm8a	Translokase 8a der inneren Mitochondrienmembran
Timm8b	Translokase 8b der inneren Mitochondrienmembran
Timm13	Translokase 13 der inneren Mitochondrienmembran
tr1-16	<i>MWM-Durchläufe 1-16</i> (tr = <i>trial</i>)

Zusammenfassung

Die bei Lern- und Gedächtnisvorgängen ablaufenden neurobiologischen Prozesse sind in ihrer Funktion bis heute nur unzureichend verstanden, wobei besonders die Rolle der lernabhängigen Genexpression unklar ist. Wiederholungen im Lernprozess fördern die Bildung von stabilen Gedächtnisinhalten. Die Lerneffektivität kann hierbei durch lernfreie Zeitintervalle, insbesondere durch eingeschobene Schalfperioden, zusätzlich gesteigert werden. Entsprechend kann man den mehrtägigen *Morris Water Maze (MWM)*-Test mit einer verborgenen Plattform als einen mehrstufigen räumlichen Lernprozess bezeichnen. Dieser Test ist Hippokampus-abhängig und produziert Langzeitgedächtnisspuren in Nagern. Für diese Studie wurden FVB/NxC57Bl/6-Mäuse der F1-Generation über vier Tage in der MWM trainiert, das Erlernte in einem *Probe Trial* an Tag 5 überprüft und die Tiere gemäß ihrer Lernleistung in die beiden Gruppen „gute“ und „schlechte Lerner“ eingeteilt. Eine Analyse der hippokampalen Expression von Kandidatengenen per *Microarray* und *Real-Time PCR* erfolgte eine, sechs beziehungsweise 24 Stunden nach dem jeweils letzten Trainingslauf eines Tages. Durch den Vergleich von Schwimmkontrollen mit Test-naiven Mäusen wurde eine gleichgeschaltete, mit dem impliziten Lernen der *MWM*-Erfahrung der Tiere assoziierte unspezifische Genexpression festgestellt. Beim Vergleich der Schwimmkontrollen (ohne Plattform) mit den trainierten Tieren (verborgene Plattform mit konstanter Lokalisation) wurde in guten Lernern zu bestimmten Zeitpunkten eine Hochregulation von Genen, die mit Lernen und Gedächtnis (*PP1, Kibra*), neuronaler Aktivität (*mt-CO1*), Epigenetik (*Dnmt3a, Dnmt3b*) und neurodegenerativen Erkrankungen (*Mapt, Sorl1*) assoziiert sind, gefunden. Im Hippokampus der schlechten Lerner wurde eine im Vergleich zu den guten Lernern gesteigerte Synthese der *mRNA* von Genen festgestellt, die mit Lernen und Gedächtnis (*Reelin, PP1, Kibra*), Epigenetik (*Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b*) und neurodegenerativen Erkrankungen (*Mapt, Sorl1, APP*) in Zusammenhang stehen. Diese Studie liefert somit den bisher ersten Hinweis, dass während eines mehrtägigen *MWM*-Lernprozesses eine abnormal erhöhte *de novo-mRNA*-Synthese mit verminderter Lernleistung in Zusammenhang steht.

Abstract

The role of gene expression during learning- and memory-related processes is poorly understood. Formation of long-term memory is a multi-level process that is most efficiently primed by multiple training sessions separated by appropriately timed intervals. Hereby, sleep intervals additionally enhance learning efficiency. The Morris water maze (MWM) hidden platform task is a hippocampus-dependent learning task and related memories are stable for several months. In the present study, mice were trained in the MWM and classified into two performance-dependent groups, good and poor learners. During the task-dependent four-day spatial training period followed by a probe trial at day five, expression of candidate genes in the hippocampus of FVB/NxC57Bl/6 hybrid mice was analysed. After the last of four training trials each day as well as after the probe trial, respective gene expression was measured at one, six and twenty-four hours by using microarray and quantitative real-time PCR. By comparing swim control and test-naïve mice, a similar MWM experience-dependent expression pattern was found for all genes tested. Comparing swim controls (no platform) with learning mice (hidden platform in constant location), in good learners, genes associated with learning and memory (*PP1*, *Kibra*), neuronal activity (*mt-CO1*), epigenetics (*Dnmt3a*, *Dnmt3b*) and neurodegenerative disorders (*Mapt*, *Sorl1*) were found to be up-regulated at distinct time points after MWM learning. In the hippocampus of poor learners, additional up-regulation was observed for genes related to learning and memory (*Reelin*, *PP1*, *Kibra*), epigenetics (*Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*) and neurodegenerative disorders (*Mapt*, *Sorl1*, *APP*). This study provides first evidence that abnormal elevated levels of mRNA while MWM learning correlates with impaired learning behaviour.

1 Einleitung

Bei Lern- und Gedächtnisprozessen werden die über die Sinnesorgane aufgenommenen Informationen aus der Umwelt verarbeitet, gefiltert und gespeichert. Dies ermöglicht es einem Organismus, flexibel auf Umweltreize und -veränderungen reagieren zu können. Man unterscheidet hierbei die unbewusste Verarbeitung der Sinneseindrücke (implizites Lernen) von der bewussten Lernform (explizites Lernen). Solche Informationen können kurzfristig gespeichert werden, bis die Erinnerung wieder erlischt, aber auch lebenslang im Neokortex abgelegt werden. Das so genannte Kurzzeitgedächtnis entsteht schnell und dauert Minuten bis Stunden, während das Langzeitgedächtnis Stunden bis Jahre anhält und die *de novo*-Synthese von *mRNA* und Proteinen benötigt (Cavallaro et al. 2002). Der Hippokampus besitzt bei der Kurz- und Langzeitspeicherung solcher Informationen eine zentrale Rolle.

1.1 Der Hippokampus bei Lern- und Gedächtnisprozessen

Für die Bildung langfristiger Gedächtnisinhalte im Neokortex sowie für die Reaktivierung neuronaler Netze (Erinnern) ist die Struktur des Hippokampus von essentieller Bedeutung. Erste bedeutende Erkenntnisse zur Funktion des Hippokampus lieferte der Fall des Epilepsie-Patienten H.M., der nach beidseitiger Entfernung des Hippokampus an anterograder Amnesie litt (Milner 1985). Die gestörte Konsolidierung der Kurzzeit- in Langzeitinhalte bei solchen Amnesie-Patienten betrifft jedoch nur bewusst erlernte Information (explizites Gedächtnis), während das Erlernen und Abrufen von motorischen Fertigkeiten (implizites Gedächtnis) völlig intakt bleibt. Der Patient H.M. zeigte außerdem starke Defizite in der räumlichen Orientierung (Kupfermann und Kandel 1995). Der Hippokampus ist eine entwicklungs geschichtlich alte Gehirnstruktur des so genannten Paläokortex und stellt den eingerollten Bereich der medialen Großhirnhemisphäre dar (Abbildung 1.1). Dementsprechend ist der Hippokampus

das älteste Assoziationsgebiet des Großhirns. Dieses Hirnareal ist wie der mediale temporale Lappen des Neokortex essentiell für deklaratives, explizites Lernen, also für Fakten und Ereignisse. Barco und Mitarbeiter (2006) beschreiben, dass der Hippokampus auch in implizite Lern- und Gedächtnisprozesse involviert ist.

Eine gängige Hypothese besagt, dass beispielsweise optische sensorische Signale vom visuellen Kortex in den Hippokampus gelangen, wo sie möglicherweise über einen Zeitraum von einigen Wochen mit anderen sensorischen Informationen verarbeitet werden. Werden diese Signale ausreichend potenziert, so gelangen sie zur Langzeitspeicherung in den Neokortex (Wang *et al.* 2006). Eine solche Langzeitpotenzierung (*LTP*), die an drei synaptischen Schaltstellen in *Gyrus dentatus*, der *CA3*- und der *CA1*-Region erzeugt werden kann (Abbildung 1.1), verändert langfristig die Antwort eines Neurons auf künftigen synaptischen Input (synaptische Plastizität).

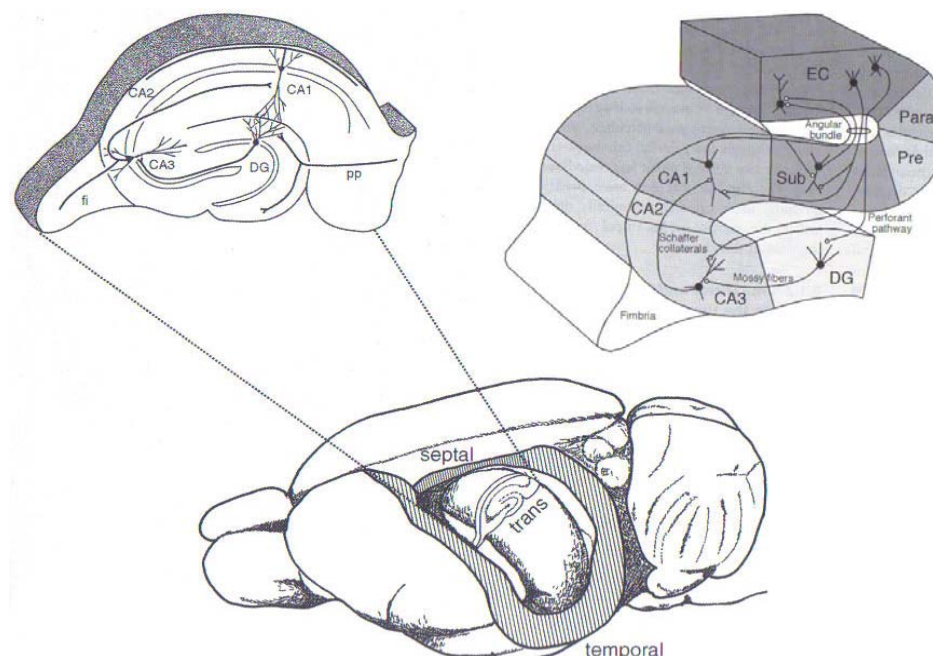


Abbildung 1.1: Die Hippokampusformation im Nagetier-Gehirn.

Dargestellt ist die Lokalisation des Hippokampus im Nagetiergehirn sowie dessen septotemporale (unten) und transverse Achse (oben). Oben links ist ein Schema der Hippokampusregionen und -hauptpfade dargestellt. *DG*, *Gyrus dentatus*; *EC*, *entorhinaler Kortex*; *fi*, *Fimbria*; *Para/Pre*, *Para-/Präsubikulum*; *pp*, *Perforant-Pfad*; *Sub*, *Subikulum* (aus Andersen *et al.* 2007).

1.2 Das räumliche Lernen in der *Morris Water Maze*

Eine Form des expliziten Lernens ist das räumliche Lernen, bei dem Informationen über die räumliche Anordnung von Objekten verarbeitet und gespeichert werden. Das räumliche Lernen kann als Modell genereller Lernvorgänge beim Menschen dienen (D´Hooge und De Deyn 2001) und im Tierversuch nachvollzogen werden. Die 1982 von Morris *et al.* entwickelte *Morris Water Maze* (*MWM*) stellt ein solches Modell für Nager dar. Beim *Water Maze*-Test mit der verborgenen Plattform erlernen Ratte oder Maus mit zunehmender Versuchsdauer die Lokalisation dieser für sie nicht sichtbaren Plattform, um der aversiven Situation zu entkommen.

Bei diesem räumlichen Lernen konstruiert das Gehirn eine Art Landkarte von seiner Umgebung, die entsteht, wenn während der Fortbewegung (zum Beispiel einer Maus in der *Water Maze*) fortlaufend Sinnesreize verarbeitet und die aufgenommene Information integriert wird. Das Tier kann dann die Position von Objekten sowie den eigenen Standort relativ zu diesem geistigen Raster bestimmen (Laroche 2002).

Man kann *MWM*-Lernversuche mit sichtbarer (nicht-assoziatives, nicht-räumliches Lernen) und versteckter Plattform (assoziatives, räumliches Lernen) durchführen (Block 1999). Hierbei zeigten Hippokampus-läsionierte Ratten ausschließlich bei der räumlichen Lernversion schlechtere Lernleistungen als die Kontrolltiere (D´Hooge und De Deyn 2001). Moser *et al.* (1993) fanden, dass der dorsale Bereich des Hippokampus bei Nagern (entspricht dem posterioren bei Primaten) beim räumlichen Lernen eine bedeutendere Rolle spielt als der ventrale Bereich.

Dem Hippokampus werden bei der Lösung des *MWM*-Tests zwei Rollen zugeschrieben: Erstens die Lokalisation des Tieres während eines *MWM*-Durchlaufs und zweitens die mentale Repräsentation der geschwommenen Strecke beziehungsweise der Lokalisation der Plattform (Redish und Touretzky 1998). Diese werden mit dem visuellen Input (räumliche Landmarken) integriert, so dass man hier von assoziativem Lernen spricht. Diese Integration findet durch hippokampale Ortsneurone (*Place Cells*) statt (Poucet *et al.* 2000), die dy-

namisch auf genau definierte Orte im Raum reagieren. Das durch das ortsspezifische Feuern erzeugte rezeptive Feld dieser Pyramidenzellen verschärft sich mit jedem Trainingslauf in der *MWM*. Auf diese Weise kann die erstellte Mnemo-Karte von der Umgebung durch individuelle Erfahrung moduliert werden (Brun *et al.* 2002).

Das Einbringen der Tiere in das Wasser zu Beginn der Durchläufe führt vor allem in den ersten Trainingsläufen zu stressbedingten Reaktionen und folgenden endokrinologischen Veränderungen, was die Lernleistungen in den ersten Durchläufen negativ beeinflusst (Hölscher 1999).

Für die Bewältigung der *MWM*-Aufgabe benötigen Nagetiere mehrere Durchläufe, wobei sich größere Zeitintervalle und hierbei insbesondere Schlafperioden zwischen den Durchläufen positiv auf den Lernerfolg der Mäuse auswirken (Genoux *et al.* 2002). Daher kann man einen mehrtägigen *MWM*-Test als mehrstufigen Lernprozess betrachten. Da der Schlaf für eine Verbesserung der *MWM*-Lernleistungen von enormer Bedeutung ist (Wilson und McNaughton 1994, Smith und Rose 1997), sind in dem hier verwendeten *MWM*-Design erst mit dem zweiten Lerntag signifikante Lernverbesserungen zu erwarten.

Neben dem Hippokampus sind auch Thalamus, Amygdala, Cerebellum, basales Vorderhirn, Striatum und mehrere neokortikale Regionen in das *MWM*-Lernen involviert und bilden dabei untereinander verschiedene funktionale neuronale Netzwerke (D'Hooge und De Deyn 2001). Petrosini und Mitarbeiter (1996) behaupten, dass das Cerebellum hierbei für die prozeduralen Aspekte des *MWM*-Tests von Bedeutung ist.

1.3 Langzeitpotenzierung und *MWM*-Lernen

An der Meeresschnecke *Aplysia* hat der Nobelpreisträger Eric Kandel Verminderungen sowie Verstärkungen der synaptischen Signalübertragung beobachtet und hierbei jeweils zwischen Kurzzeit- und Langzeitspeicherung unterschieden (Castellucci *et al.* 1978, Überblick in Kandel 2001). Analog zu den

Habituations- und Sensitivierungsprozessen bei einfachen Lernformen unterscheidet man bei komplexeren Lernformen zwischen Langzeitdepression (*LTD*) und Langzeitpotenzierung (*LTP*). Die *LTP* wird überwiegend an erregenden glutamatergen Synapsen beobachtet und man nimmt an, dass im Hippokampus Langzeitpotenzierung (*LTP*) stattfindet (Kandel 1995, Redish und Touretzky 1998), wobei dies bisher nur an Hirnschnitten gezeigt werden konnte. Es gibt zahlreiche Publikationen wie zum Beispiel die Arbeit von Wilson und Tonegawa (1997), die nahe legen, dass hippokampale *LTP* die neuronale Basis für das räumliche Lernen bildet (Silva *et al.* 1992), wobei hier endgültige Beweise noch ausstehen. So ist beispielsweise das *MWM*-Lernen in *LTP*-blockierten Tieren möglich (Cain 1997). Moser und Mitarbeiter (1998) konnten hingegen zeigen, dass die durch hochfrequente Stimulation erzeugte Sättigung von *LTP* im *Gyrus dentatus* vor dem assoziativen *MWM*-Training zu einer Verschlechterung der Lernleistungen führt.

1.4 Genexpression und *MWM*-Lernen

Veränderungen in der Antwortstärke eines Neurons durch *LTP* beziehungsweise *LTD* bezeichnet man als synaptische Plastizität, die durch Veränderungen auf molekularer Ebene gekennzeichnet ist. Während die Kurzzeitspeicherung die posttranslationale Modifikation von bereits existierenden Molekülen bedingt, erfordert die Bildung von Langzeitgedächtnisinhalten die *de novo*-Synthese *mRNA* und Proteinen (D'Agata und Cavallaro 2002). Diese wird unter anderem durch den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP-responsive Element Binding Protein*) vermittelt (Yin *et al.* 1994, Abbildung 1.2). Hierbei haben mehrere Autoren mittels *Microarray*-Analyse die *de novo*-Genexpression beim räumlichen Lernen in der *Water Maze* untersucht (Cavallaro *et al.* 2002, Leil *et al.* 2002 und 2003). Erstmals detektierten Cavallaro und Mitarbeiter (2002) eine mit dem *MWM*-Lernen assoziierte Regulation des Gens *FGF-18* (*Fibroblast Growth Factor 18*) im Hippokampus von Ratten. Die Forscher konnten zudem zeigen, dass die einmalige

ge Gabe von FGF-18 das *MWM*-Lernen der Nager signifikant verbessert. Auch zeigen verschiedene *Knockout*-Mäuse, die fehlerhafte Proteine zu Bdnf (*Brain-derived Neurotrophic Factor*) (Gorski *et al.* 2003), die NMDA(N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor $\epsilon 1$ -Untereinheit (Sakimura *et al.* 1995), die α -Calcium-Calmodulin-Kinase II (Bourtchuladze *et al.* 1994) sowie den CREB-Transkriptionsfaktor (Yin *et al.* 1994) synthetisieren, jeweils ähnliche Verschlechterungen ihrer assoziativen *MWM*-Lernleistungen im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrolltieren. Die intraventrikuläre Injektion des Proteinsynthese-Inhibitors Anisomycin führt zu einer dosisabhängigen Verschlechterung der *MWM*-Lernleistungen, ohne bereits bestehende Gedächtnisinhalte sowie das Kurzzeitgedächtnis negativ zu beeinflussen (Meiri und Rosenblum 1998). Wittstock und Menzel 1994 nennen jedoch auch Fälle, bei denen die Inhibition der Proteinsynthese die Konsolidierung von Gedächtnisinhalten nicht beeinflusst. Den so genannten unmittelbaren frühen Genen (*IEG* = *Immediate Early Genes*) wird eine Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen zugeschrieben (Dragunow 1996), wobei Wisden und Mitarbeiter (1990) keine Veränderungen in der *de novo*-*IEG*-Expression bei *MWM*-trainierten Ratten beobachten konnten und demnach keine einfache Beziehung zwischen *LTP*, räumlichem Lernen und *IEG* sehen.

1.5 Molekulare Mechanismen im hippokampalen Neuron

Das biologische Korrelat von Lern- und Gedächtnisprozessen ist die neuronale Plastizität des Gehirns. Als neuronale Plastizität bezeichnet man unter anderem die Veränderbarkeit der Effektivität von Synapsen, weshalb man hierbei auch von synaptischer Plastizität spricht. Auch spielt die Neogenese im Hippokampus beim Lernen eine wichtige Rolle (Schmidt-Hieber *et al.* 2004). Man unterscheidet funktionelle und strukturelle Plastizität, wobei die beiden Plastizitätsformen nicht grundsätzlich voneinander zu trennen sind. Die strukturelle Plastizität kann die molekulare Ausstattung von Prä- und Postsynapse, die Veränderung der Struktur

dendritischer Dornen, die Kappung bestehender sowie die Bildung neuer Synapsen und Axone betreffen. Die funktionelle Plastizität verändert die Effizienz der synaptischen Übertragung ohne anatomische Veränderungen (Hanser 2001). Ebenso wie bei den strukturellen Veränderungen von Synapsen wird hierfür *de novo-mRNA*-Synthese benötigt.

In einem Übersichtsartikel von Barco und Mitarbeitern (2006) werden die molekularen Mechanismen im postsynaptischen Neuron beim Lern- und Gedächtnisprozess beschrieben (Abbildung 1.2):

Ein an der Präsynapse ankommendes Signal führt zur Beendigung der spannungsabhängigen Mg^{2+} -Blockade des NMDA-Rezeptors (1 in Abbildung 1.2). Der resultierende Ca^{2+} -Anstieg im dendritischen Dorn aktiviert verschiedene Kinasen wie die CaMKII (Ca²⁺/Calmodulin-abhängige-Kinase II), die Proteinkinase A oder die Proteinkinase C (2 in Abbildung 1.2). Diese sekundären Boten vermitteln eine transiente Verstärkung der Synapse durch kovalente Modifikation von Kanalproteinen an der Postsynapse sowie über den retrograden Botenstoff NO eine erhöhte Ausschüttung von Neurotransmittern an der Präsynapse (Martin *et al.* 2000, Kandel 2001). Eine frühe *LTP*, die etwa eine bis drei Stunden andauert (Nguyen *et al.* 1994), erhöht die Anzahl der AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure)-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran sowie die Phosphorylierung spezifischer AMPA- und NMDA-Rezeptor-Untereinheiten, wodurch die biophysikalischen Eigenschaften der Plasmamembran geändert werden (Malenka und Bear 2004). Durch die Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels werden verschiedene Signalkaskaden aktiviert, die ein Gleichgewicht an Kinase- und Phosphataseaktivität erfordern (Abel *et al.* 1998). Solche Signalpfade münden unter anderem im Zellkern (3 in Abbildung 1.2), wo eine Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und damit *de novo*-Genexpression stattfindet (Bacskai *et al.* 1992, Martin *et al.* 1997a, Purcell *et al.* 2003). Solche spezifische Genexpressionsmuster werden benötigt, um Funktion und Struktur von Synapsen langfristig zu verändern. Ein wichtiger Transkriptionsfaktor hierbei ist CREB und die CREB-abhängige Genexpression ist essentiell für explizites und implizites Lernen (Barco *et al.* 2006). In einer ersten Welle (4 in Abbildung 1.2) werden weitere Transkriptionsfaktoren wie Srf (*Serum*

Response Factor), *c-fos* (ein schnell aktiviertes *IEG*), *Egr-1* (*Early Growth Response Gene 1*), *NF-κb* (*Nuclear Factor Kb*), *TNF* (*Tumor Nekrosis Factor*) oder das *C/EBP* (*CCAAT/Enhancer Binding Protein*) synthetisiert (Tischmeyer und Grimm 1999, Albensi und Mattson 2000, Ramanan *et al.* 2005). Diese leiten eine zweite Genexpressionswelle ein (5 in Abbildung 1.2). Auf diese Weise werden mehr als 100 Gene durch CREB reguliert (Barco *et al.* 2005), wobei nicht bekannt ist, wie viele dieser Gene lernabhängig transkribiert werden (Mayr und Montminy 2001, Lonze und Ginty 2002). Die Liste dieser Gene ist heterogen und beinhaltet Gene mit diversen Funktionen wie die Regulation von Metabolismus, Signaltransduktion, Zellstruktur, Zelladhäsion, Zellproliferation oder weiterer Transkriptionsfaktoren. In jüngst publizierten Arbeiten konnte auch die Bedeutung der epigenetischen Markierung (6 in Abbildung 1.2) und damit die mögliche längerfristige Änderung der Genexpression für die Aufrechterhaltung von Gedächtnisinhalten gezeigt werden (Alarcon *et al.* 2004, Korzus *et al.* 2004, Levenson *et al.* 2004, Levenson und Sweatt 2005). In der Hypothese des *Synaptic Tagging* beschreiben Frey und Morris (1997), dass neu syntetisierte *mRNA* nur dort transkribiert wird, wo unmittelbar zuvor synaptische Aktivität herrschte (7 in Abbildung 1.2). Das präsynaptisch freigesetzte *Bdnf* spielt hierbei eine wichtige Rolle (Barco *et al.* 2005). Für den Transport dieser *mRNA*'s zu den Dendriten sind RNA-bindende Proteine zuständig (Steward und Schuman 2001, 2003), die neben ihrer Bindung an Motorproteine auch an *cis*-Elemente im untranslatierten 3'-Bereich der *mRNA*'s binden (8 in Abbildung 1.2). Die *mRNA*'s werden dann translatiert, wenn sie an bestimmte synaptische Schaltstellen in der *Synaptic Density Zone* andocken (9 in Abbildung 1.2). Im adulten Hippokampus spielen strukturelle Änderungen wie die Bildung neuer dendritischer Dornen (*Dendritic Spines*) eine untergeordnete Rolle (Lang *et al.* 2004, Zuo *et al.* 2005), so dass beim Lernprozess wahrscheinlich die funktionelle Plastizität dominiert (Barco *et al.* 2005). Eine große Bedeutung hierbei haben beispielsweise der Transport von Molekülen (Bloodgood und Sabatini 2005), Polysomen (Osthoff *et al.* 2002) sowie von Neurotransmitter-Rezeptoren (Malinow und Malenka 2002). Auf diese Weise können so genannte stille Synapsen innerhalb von drei bis sechs Stunden wieder aktiviert werden (10 in

Abbildung 1.2). Dieser Prozess, bei dem unter anderem leere Vesikel aufgefüllt werden, benötigt nicht notwendigerweise *de novo*-Transkription, da vorrätige *mRNA*'s translatiert werden können. Auf postsynaptischer Seite können beispielsweise stille Synapsen durch die Insertion neuer AMPA-Rezeptoren in die Zellmembran aktiviert werden. Die Bildung neuer synaptischer Vesikel erfolgt langsamer nach etwa 18 bis 24 Stunden und benötigt *de novo*-Genexpression (Martin *et al.* 1997b, Casadio *et al.* 1999). Eine wichtige Frage beschäftigt sich mit der Aufrechterhaltung der durch Lernen induzierten molekularen Veränderungen an der Synapse (11 in Abbildung 1.2), zumal die Halbwertszeit von Proteinen (Stunden) der Langzeitspeicherung von Lerninformationen (bis Jahre) entgegensteht. Eine mögliche Lösung dieses Problems beruht auf dem Befund, dass neuronales CPEB (*Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein*) die Translation vorrätiger *mRNA*'s wie die von CaMKII (Burgin *et al.* 1990, Ouyang *et al.* 1999, Huang *et al.* 2002, Si *et al.* 2003) aktivieren kann. Mit anderen Worten, die *mRNA*-Vorratsspeicher, die immer wieder aufgefüllt werden müssen, spielen in Bezug auf den molekularen Austausch (*Protein Turnover*) an der Synapse eine wichtige Rolle.

Die Kenntnis der in die Langzeitgedächtnisbildung und -konsolidierung involvierten Gene ist noch sehr lückenhaft. Aus den oben beschriebenen Theorien zu den molekularen Prozessen bei der Gedächtnisbildung ist zu entnehmen, dass im Hippokampus nach wenigen Minuten eine erste Welle von CREB-abhängiger Genexpression zur Synthese verschiedener Transkriptionsfaktoren führt, die in einer zweiten Welle bestimmte, für die synaptische Plastizität notwendige Gene aktivieren. Diese zweite, nach einigen Stunden eintretende Transkriptionswelle dient unter anderem der Auffüllung der *mRNA*-Speicher an der Synapse. Welche *mRNA*'s zu welcher Zeit und in welcher Menge synthetisiert werden, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch weitestgehend unklar. Als gesichert gilt, dass relativ früh Regulatoren wie Transkriptionsfaktoren und relativ spät Effektoren wie tPA (*Tissue Plasminogen Activator*) oder Bdnf, aber auch *mRNA*'s für den synaptischen Vorratsspeicher produziert werden. Um die bei den verschiedenen Transkriptionswellen synthetisierten *mRNA*'s zu detektieren, wird unter anderem die *Microarray*-Technologie angewandt.

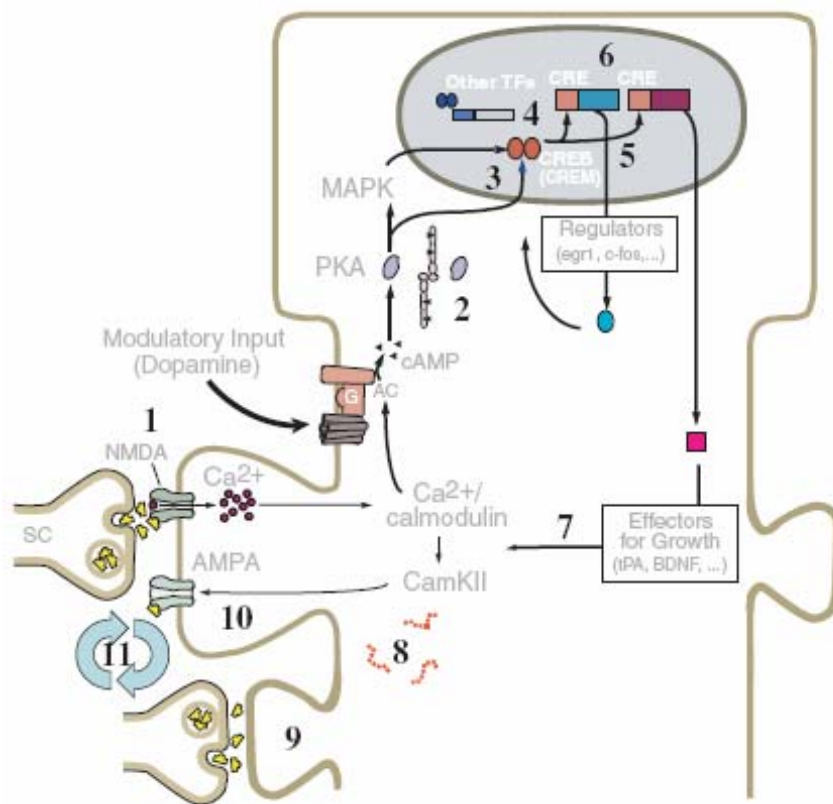


Abbildung 1.2: Das hippocampale Neuron bei der Gedächtnisbildung.

Es sind die für die Gedächtnisbildung kritischen Stellen (1-11) einer murinen CA1-Pyramidenzelle dargestellt (Erklärung siehe Text). Diese molekularen Mechanismen bewegen sich von der Synapse (1-2) zum Nukleus (3-6) und wieder zurück zur Synapse (7-11) (aus Barco *et al.* 2006).

1.6 Der Zwei Farben-Microarray

Mit dieser Hochdurchsatzmethode kann differentielle Genexpression untersucht werden. Somit bietet sich dieses Verfahren an, die Genexpression zu verschiedenen Lernzeitpunkten zu analysieren, um Gene zu identifizieren, die am Lern- und Gedächtnisprozess beteiligt sind (D'Agata und Cavallaro 2002).

Die Genchip-Technologie basiert auf der Hybridisierung von Ziel-DNA-Sequenzen mit aus dem Probenmaterial hergestellten cDNA-Sequenzen (Proben-DNA). Der DNA-Microarray ist eine Hochdurchsatz-Technologie, die auf dem Southern Blot

basiert und erstmals von Kulesh und Mitarbeitern (1987) beschrieben wurde. Während bei diesen frühen Genarrays die relativ wenigen *cDNA*'s noch auf Filterpapier gespottet wurden (*Macroarray*), verwendeten Schena und Kollegen (1995) erstmals Glasträger (*Slides*) und erhöhten dadurch die Zahl der gespotteten *cDNA*'s (*Microarray*). Die Ziel-*cDNA* bindet hierbei kovalent an eine chemische Matrix, mit der der *Slide* beschichtet ist (*cDNA*-Genchip, *Affymetrix*-Genchip).

Beim dreidimensionalen *Illumina*-Genchip ist die Ziel-*DNA* an so genannte *Beads* gekoppelt. Beim *Microarray* werden kurze Oligo-*DNA*-Abschnitte oder längere, bis zu 1000 bp große *DNA*-Moleküle als Ziel-*DNA* verwendet.

Beim käuflichen Genchip der Firma *Affymetrix* – hier sind pro Gen mehrere verschiedene Oligo-*DNA*-Sequenzen gespottet – werden die zu untersuchenden Proben auf verschiedenen Genchips untersucht, das heißt jeweils mit dem gleichen Farbstoff markiert. Der Vorteil bei dieser Methode ist, dass man mehrere Proben miteinander vergleichen kann und kein Farbstoff-*Bias* die Ergebnisse beeinflusst. Allerdings kann hierbei aufgrund des direkten Vergleichs verschiedener Hybridisierungen und *Slides* ein anderer technischer *Bias* (systematischen Fehler zwischen den hybridisierten *Slides*) die Ergebnisse verfälschen.

Beim *cDNA-Microarray* – bei dem größere Ziel-*DNA*-Sequenzen gespottet sind – werden auf einem Genchip zwei Proben direkt miteinander verglichen. Bei diesem Zwei-Farben-*Microarray* wird der *Dye-Swap*-Ansatz (Abbildung 2.4) gewählt, um den *Bias* zwischen den beiden Farbstoffen auszugleichen (Shalon *et al.* 1996). Die heute gängigen Farbstoffkombinationen sind *Cy3/Cy5* und *Alexa555/647*, wobei der *Alexa*-Farbstoff die jüngste Entwicklung darstellt. Die *Alexa*-Variante zeigt sowohl bezüglich der Absorption als auch der Fluoreszenz stärkere Signale (Abbildung 1.3).

Die mit *Illumina*-, *Affymetrix*- oder *cDNA-Microarray* erzielten Ergebnisse können nur bedingt miteinander verglichen werden, da hier unterschiedliche Techniken (Plattformen) verwendet werden. Die *MIAME*-Kriterien (*Minimal Information about a Microarray Experiment*) (Brazma *et al.* 2001) (Tabelle 1) stellen eine Richtlinie für die Entwicklung von Datenbanken aus verschiedenen *Microarray*-

Plattformen dar. Sie geben die Menge an notwendigen Informationen an, um Ergebnisse einschätzen sowie die *Microarray*-Daten verschiedener Experimente miteinander vergleichen zu können.

Der Hintergrundsignal-Korrektur und der Normalisierung der *Microarray*-Signale kommt eine Schlüsselposition bei der Auswertung von *Microarray*-Experimenten zu. Derzeit werden zur Analyse der *Microarray*-Ergebnisse mehrere Normalisierungsmethoden – wie zum Beispiel die in dieser Arbeit verwendete *LOWESS*-Methode, die Quantil-Normalisierung oder die Median-Normalisierung – verwendet (Rao *et al.* 2008).

In der in dieser Dissertation präsentierten Genexpressionsstudie wurde als Screening-System der *cDNA-Microarray* gewählt, um aus 617 ausgesuchten Kandidatengen jene Gene zu identifizieren, die beim räumlichen *MWM*-Lernen reguliert sind. Hierbei wurden die lernrelevanten Gene unter anderem mittels einer Clusteranalyse über alle 12 beziehungsweise 15 untersuchten Zeitpunkte (*Heat Map* in den Abbildungen 3.3.2 und 3.3.3) identifiziert.

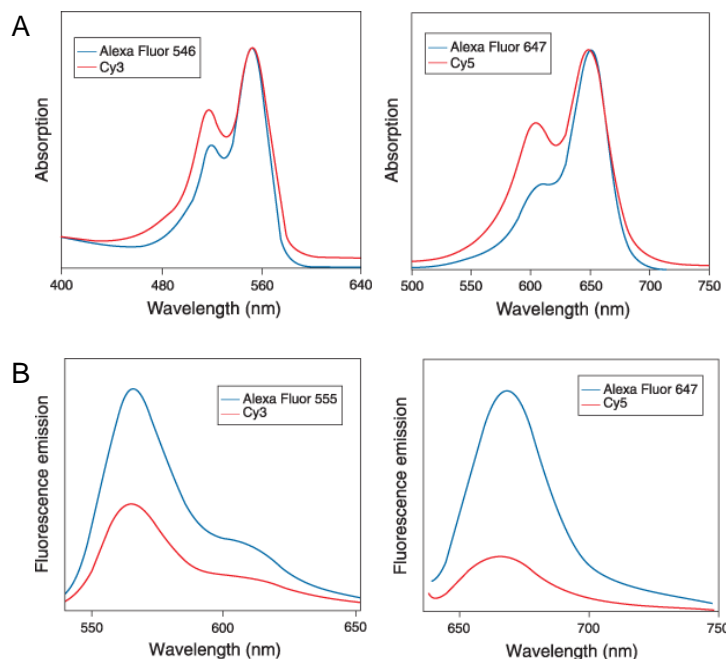


Abbildung 1.3: Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Farbstoffe Cy3/Cy5 und Alexa 555/647.

In (A) sind die Absorptionskurven, in (B) die Emissionskurven der beiden Farbstoffe dargestellt (aus <http://probes.invitrogen.com/handbook/boxes/1747.html>).

Tabelle 1: *MIAME*-Kriterien.

Die sechs *MIAME*-Kriterien geben eine grobe Richtlinie vor, um die Vergleichbarkeit von Daten verschiedener *Microarray*-Experimente zu beurteilen (nach Brazma *et al.* 2001).

1. <i>Experimental Design</i>	Ziel, Methode, Auswahl der Proben, Anzahl der biologischen sowie technischen Replikate, etc.
2. <i>Array Design</i>	<i>Microarray</i> -Plattform, Layout des Genchips, Anzahl <i>Spots</i> /Gen, verwendete Farbstoffe, etc.
3. Probenmaterial	Tierstamm, applizierte Dosen, etc.
4. Hybridisierung	Lösung, Reagenzien, Waschverfahren, etc.
5. Messung der Signale	Scannen der Genchips und Messung der Signalstärken (Rohdaten), Qualitätskontrolle
6. Normalisierung	Methode

1.7 Beschreibung der für die *Real-Time PCR*-Studie ausgewählten Kandidatengene

Neben den *Microarray*-Experiment detektierten Genen wurden aus der Literatur Kandidatengene für die Studie in der *Real-Time PCR* ausgewählt, um die lernassoziierte *mRNA*-Synthese dieser Gene an Einzeltieren zu untersuchen. So sind die Gene *Dnmt1/3a/3b*, *Bdnf*, *Reelin*, *PP1* und *Kibra* in publizierten Arbeiten als lernrelevant beschrieben und eine Regulation dieser Gene beim *MWM*-Lernen wird vermutet. Zudem wurden einige mit der Alzheimer Demenz assoziierten Gene (*Mapt*, *Gap43*, *APP* und *Sorl1*) untersucht, um deren *de novo*-Expression mit der Lernleistung der Individuen zu korrelieren. Zudem bieten die Ergebnisse zur lernassoziierten *mRNA*-Synthese die Möglichkeit, diese mit transgenen „Alzheimer“-Mäusen (siehe Postina *et al.* 2004) in zukünftigen Studien zu vergleichen, um auf dieser Ebene Hinweise zur Alzheimer-Pathologie zu erhalten.

1.7.1 Lernassoziierte Gene

DNA-Methyltransferasen

Zahlreiche jüngere Studien beschreiben eine Rolle epigenetischer Vorgänge bei neuronaler Plastizität (Guan *et al.* 2002, Levenson *et al.* 2006), bei der Verarbeitung von emotionalen Stimuli (Weaver *et al.* 2004, 2005, 2006, Renthal *et al.* 2007), bei kognitiven Störungen (Petrij *et al.* 1995, Alarcon *et al.* 2004, Veldic *et al.* 2004, Tsankova *et al.* 2006) sowie bei Lern- und Gedächtnisprozessen (Korzus *et al.* 2004, Levenson *et al.* 2004, 2005, Wood *et al.* 2005, Chwang *et al.* 2006, Miller und Sweatt 2007) (Abbildung 1.4). Die Methylierung von CpG-Dinukleotiden im Promotorbereich (CpG-Inseln) wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMT's) katalysiert. Man unterscheidet *de novo*-Methyltransferasen (Dnmt3a, Dnmt3b) sowie DNMT's, die für die Aufrechterhaltung der Methylierung zuständig sind (Dnmt1). Bis heute ist noch nicht eindeutig geklärt, ob die Dnmt1 neben ihrer Funktion bei der Zellreifung auch andere Aufgaben im adulten Nervensystem übernimmt (Goto *et al.* 1994, Brooks *et al.* 1996). So wird beispielsweise vermutet, dass die Dnmt1 für die Aufrechterhaltung der Methylierung beim „Methylierungs-Turnover“ benötigt wird (Feng *et al.* 2007). Rampon und Mitarbeiter (2000) fanden eine Hochregulation der *Dnmt1-mRNA* im Gehirn von Mäusen, die in ein *Enriched Environment* gesetzt wurden und nehmen daher an, dass die Dnmt1 in Lern- und Gedächtnisprozesse involviert ist. Levenson und Kollegen (2006) konnten zeigen, dass der PKC-Signalpfad die Expression von *Dnmt3a*, nicht jedoch von *Dnmt1* und *Dnmt3b*, induziert. Eine Hochregulation von *Dnmt3a* und *Dnmt3b* im Hippokampus beschreiben Miller und Sweatt (2007) nach *Contextual Fear Conditioning*. Da die Autoren in diesem Experiment keine Stresskontrolle verwendeten, bleibt unklar, ob diese *de novo-mRNA*-Synthese durch Lernen oder durch Stress verursacht wird.

Es sei hierbei erwähnt, dass eine Unterscheidung der Aktivität der einzelnen DNMT's schwierig ist, da die heute verwendeten DNMT-Inhibitoren (Zebularin, 5-AZA) unspezifisch die Methylierung der DNA blockieren. Die Untersuchung der

mit dem *MWM*-Lernprozess assoziierten Transkription der Gene *Dnmt1*, *Dnmt3a* und *Dnmt3b* erlaubt indes die Unterscheidung der Genexpression dieser drei Isoformen.

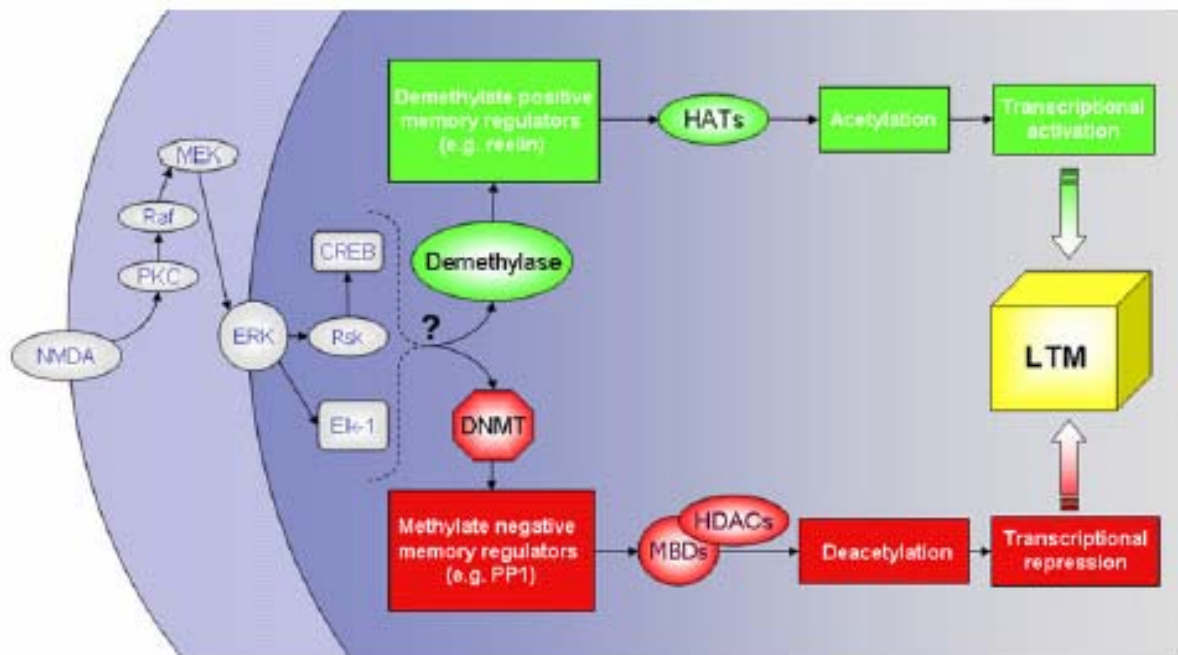


Abbildung 1.4: Mögliche Rolle der DNA-Methylierung bei der lernbedingten Regulation von Genen.

Diese Skizze von Miller und Sweatt (2007) zeigt die mögliche Rolle der DNA-Methyltransferasen (DNMT's) bei der Repression von Genen. Die Autoren nehmen an, dass Transkriptionsfaktoren wie CREB nicht direkt auf die Genexpression einwirken. Hierbei vermuten sie als zusätzliches regulatorisches Element zwischengeschaltete DNMT's beziehungsweise bis heute nicht eindeutig identifizierte Demethylasen. HAT, Histon-Acetyl-Transferase; MBD, Methyl-CpG-Bindeprotein; HDAC, Histon-Deacetylase; LTM, Langzeitgedächtnis.

Bdnf (*Brain-derived Neurotrophic Factor*)

Das Gen *Bdnf* kodiert für einen neuronspezifischen Wachstumsfaktor. Es besteht die Hypothese, dass Bdnf für die strukturellen Elemente der Synaptogenese benötigt wird (Thoenen 1995, Berninger und Poo 1996, Bonhoeffer 1996, Katz und Shatz 1996, Lu und Figurov 1997, Lu 2003). Hierzu ist beschrieben, dass

Bdnf die axonale und dendritische Verzweigung beziehungsweise dessen Neustrukturierung (Shimada *et al.* 1998, Lom und Cohen-Cory 1999, McAllister *et al.* 1999, Yacoubian und Lo 2000), die Synaptogenese von auswachsenden Axonterminalien (Alsina *et al.* 2001), die Effizienz der synaptischen Transmission (Lohof *et al.* 1993, Kang und Schuman 1995, Boulanger und Poo 1999, Kafitz *et al.* 1999) sowie die funktionelle Reifung von exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen (Rutherford *et al.* 1998, Vicario-Abejon *et al.* 1998, Seil und Drake-Baumann 2000) reguliert.

Bdnf wird lern- und CREB-abhängig im Hippokampus exprimiert (Abbildungen 1.2 und 1.5) (Kandel 2001, Vaynman *et al.* 2004, Barco *et al.* 2005, Pollak *et al.* 2005, Guzman-Marin *et al.* 2006, Datta *et al.* 2008), im endoplasmatischen Retikulum in proBdnf translatiert und anschließend in Vesikeln verpackt zu den Dendriten transportiert (Mowla *et al.* 1999). Hier wird das Vorläuferprotein in den Extrazellularraum sezerniert und dort durch Proteasen in das reife matBdnf konvertiert (Teng *et al.* 2005). Pang und Mitarbeiter (2004) konnten zeigen, dass die tPA/Plasmin-vermittelte Umwandlung von proBdnf in matBdnf für die Bildung von *LTP* essentiell ist, während proBdnf die Ausbildung von *LTD* erleichtert (Woo *et al.* 2005).

Das *Bdnf*-Gen besitzt mindestens vier Promotoren (Metsis *et al.* 1993, Timmusk *et al.* 1993, Liu *et al.* 2006), wobei die ExonI-, II- und III-enthaltenden Transkripte im Gehirn je nach Stimulus räumlich und zeitlich differenziert exprimiert werden (Falkenberg *et al.* 1993, Metsis *et al.* 1993, Timmusk *et al.* 1993, 1994, Kokaia *et al.* 1994). Die am intensivsten untersuchte Spleißvariante ist das ExonIII-Transkript, das effizient nach hippokampaler Aktivität gebildet wird (Metsis *et al.* 1993, Lauterborn *et al.* 2000) und bei struktureller Plastizität sowie bei Lern- und Gedächtnisprozessen eine wichtige Rolle spielt (West *et al.* 2001).

In dieser Studie wurde die Synthese der ExonI und II-Transkripte untersucht, um deren Rolle beim *MWM*-Lern- und Habituationsprozess zu überprüfen.

Reelin

Das *Reelin*-Gen kodiert für ein Zelladhäsionsprotein, das für die akkurate Differenzierung und Migration von Neuronen essentiell ist. So konnten Del Rio und Mitarbeiter (1997) zeigen, dass Reelin die Auszweigung von hippokampalen Projektionen fördert. Entsprechend beschreiben Niu *et al.* (2004) die positive Wirkung von Reelin auf die Entwicklung von dendritischen Dornen im Hippokampus. Chen und Kollegen (2005) behaupten, dass der Reelin-Signalweg die synaptische Plastizität im adulten Hippokampus moduliert, indem er über die NMDA-Rezeptor-Aktivierung das neuritische Auswachsen sowie die Synaptogenese reguliert. Die Aktivierung des NMDA-Rezeptors führt zu einer Phosphorylierung von CREB und damit zu einer CREB-medierten Genexpression. Reelin vermittelt sein Signal über die beiden Rezeptoren Vldlr (*Very Low Density Lipoprotein Receptor*) und Apoer2 (Apolipoprotein E-Rezeptor 2). *Knockout*-Mäuse zu diesen beiden Reelin-Rezeptoren zeigen Defizite beim Lernen sowie in der Bildung von *LTP* (Weeber *et al.* 2002). Beffert und Mitarbeiter (2005) fanden heraus, dass für die korrekte Funktion des Apoer2-Rezeptors das Exon19 von besonderer Bedeutung ist.

Da von Miller und Sweatt (2007) jedoch eine mit Stress assoziierte Hochregulation beim *Fear Conditioning*-Lernen beschreiben, wurde die *MWM*-assoziierte Transkription von *Reelin* im *qPCR*-Experiment untersucht.

PP1 (Protein-Phosphatase 1)

Man nimmt an, dass Lern- und Gedächtnisprozesse ein fein abgestimmtes System aus Phosphorylierung und Dephosphorylierung benötigen. Hierbei besitzt die Phosphatase PP1 eine wichtige bimodulatorische Funktion an glutamatergen Synapsen, indem es das postsynaptische Potential in Richtung *LTD* verschiebt (Munton *et al.* 2004). So konnten mehrere Autoren zeigen, dass die Erzeugung von NMDA-Rezeptor-abhängiger *LTD* im Hippokampus die Aktivität von PP1 benötigt (Mulkey *et al.* 1994, Thiels *et al.* 1998, Morishita *et al.* 2001). Außerdem wirkt die Phosphatase beispielsweise der Aktivität von PKA (Proteinkinase A) oder Mapk (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) entgegen (Abbildung 1.5) und wird daher als physiologisch bedeutsamer *Learning Constraint*

(Genoux *et al.* 2002) beziehungsweise als *Memory Supressor* (Abel *et al.* 1998, Miller und Sweatt 2007) bezeichnet. Die Aktivität von PP1 kann über den Inhibitor I-1, Calcineurin sowie über den NMDA-Rezeptor-vermittelten Kalziumeinstrom moduliert werden. Über Rückkopplungsmechanismen kann PP1 den NMDA-Rezeptor (Westphal *et al.* 1999), die GluR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors (Yan *et al.* 1999, Genoux *et al.* 2002) sowie die CaMKII (Allen *et al.* 1997, Genoux *et al.* 2002) hemmen. Über die Dephosphorylierung von CREB (Hagiwara *et al.* 1992, Genoux *et al.* 2002) fungiert PP1 als wichtiger Regulator der CREB-abhängigen Genexpression bei Lern- und Gedächtnisprozessen im Hippokampus (Abbildung 1.5).

Um die Frage zu klären, ob PP1 beim *MWM*-Lernen auf der transkriptionellen Ebene reguliert wird, wurde dieses Gen für die Genexpressionsstudie ausgewählt.

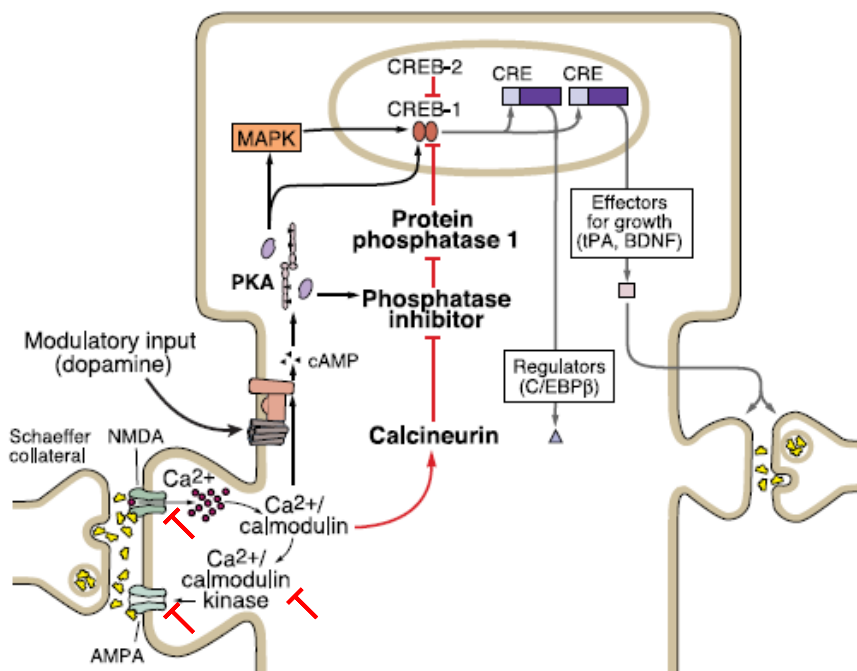


Abbildung 1.5: Rolle von PP1 bei der Gedächtnisbildung.

Der inhibierende Signalweg (rot) greift modulierend in die lernbedingte Genexpression im Hippokampus ein. Die Protein-Phosphatase 1 (PP1) kann durch einen Phosphatase-Inhibitor (I-1) und dieser wiederum durch Calcineurin gehemmt werden. PP1 kann neben CREB auch den NMDA- und den AMPA-Rezeptor sowie die CaMKII dephosphorylieren (rote T-Symbole). Auf diese Weise kann PP1 den Schwellenwert für die Erzeugung des späten *LTP* erhöhen und damit verstärkt *LTD* herbeiführen (aus Kandel 2001).

Kibra (*Kidney and Brain expressed Protein*)

Der Name Kibra wurde in Kremerskothen *et al.* (2003) wegen seines Vorkommens in Niere und Gehirn erstmals erwähnt. Papassotiropoulos und Kollegen (2006) konnten zeigen, dass *Kibra* insbesondere in den lernassoziierten Gehirnstrukturen Hippokampus und Temporallappen von Mensch und Maus exprimiert wird (Abbildung 1.6). Des Weiteren konnten sie zeigen, dass die Träger eines bestimmten *Kibra*-Allels bei einem Wort-Test sowohl unmittelbar (Lernen) als auch 24 Stunden (Gedächtnis) nach Präsentation der Wörter signifikant bessere Ergebnisse lieferten. In einer jüngst veröffentlichten Studie von Need *et al.* (2008) konnte dieser Befund jedoch nicht bestätigt werden. Büther und Kollegen (2004) beschreiben eine von der Proteinkinase C-zeta (PKC ζ) abhängige Phosphorylierung von Kibra, während Hilton und Mitarbeiter (2008) demonstrieren, dass die Überexpression von Kibra den Mapk-Signalweg positiv beeinflusst. Hierbei sei erwähnt, dass die Prominenz der PKC (Überblick in Sossin 2007) und Mapk (Überblick in Miyamoto 2006) bei der Bildung von Lern- und Gedächtnisinhalten seit längerem bekannt ist. Das Vorhandensein einer so genannten C2-Domäne im Kibra-Protein – die eine große Ähnlichkeit mit der von Synaptotagmin besitzt (Kremerskothen *et al.* 2003) – lässt vermuten, dass Kibra Ca²⁺-abhängig reguliert wird und/oder eine zelluläre Antwort auf veränderte Kalziumspiegel vermittelt (Rizo und Südhof 1998, Ubach *et al.* 1998).

Ob die Expression von *Kibra* auch *in vivo* in Assoziation mit Lernen reguliert wird, ist bisher nicht untersucht worden. Daher soll in dieser Studie die *de novo*-Expression dieses Gens untersucht werden.

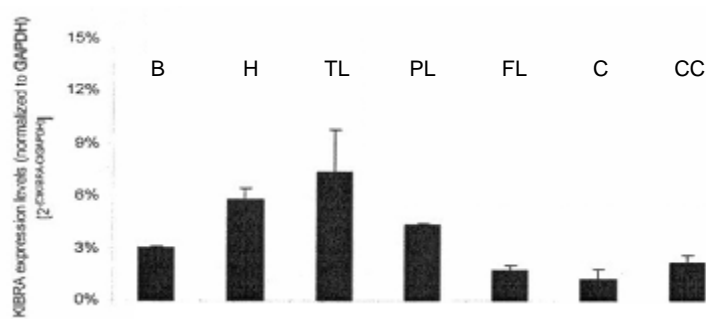


Abbildung 1.6: Kibra-Expression im humanen Gehirn.

Es sind die mit *Gapdh*-normalisierten Expressionslevel (Δ Ct-Werte) von geschnittener *Kibra*-mRNA dargestellt; die Volllängenform des Gens konnte mit der *qPCR* nicht detektiert werden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung zwischen vierzehn untersuchten Individuen. B, gesamtes Gehirn; H, Hippokampus; TL, Temporallappen, PL, Parietallappen, FL, Frontallappen; C, Cerebellum, CC, *Corpus Callosum* (aus Papassotiropoulos *et al.* 2006).

1.7.2 Mit der Alzheimer Demenz assoziierte Gene

Mapt (*Microtubule-associated Protein Tau*)

Das Tau-Protein bindet nach Phosphorylierung mit hoher Affinität an Mikrotubuli. Dadurch wird sowohl die Stabilität des Zytoskelett-Gerüsts erhöht als auch dessen Assemblierung beispielsweise beim Auswachsen von Axonen reguliert (Drubin und Kirschner 1986). Eine abnorme Hyperphosphorylierung stört die Interaktion des Tau-Proteins mit den Mikrotubuli, so dass es spontan zu pathologischen Filamenten aggregiert (Ledesma *et al.* 1994).

Das *Mapt*-Gen besteht aus 11 Exons (Andreadis *et al.* 1992) und kann im Gehirn durch alternatives Spleißen sechs verschiedene Isoformen synthetisieren (Goedert *et al.* 1989). Mit den in dieser Studie verwendeten *Primern* wurde die aus den Exons 3, 4 und 5 bestehende Isoform detektiert.

Das Tau-Protein ist im Liquor von Alzheimer-Patienten hochreguliert und somit ein anerkannter Biomarker für diese Demenz-Erkrankung. Da es zudem beim axonalen Transport von Proteinen eine wichtige Rolle spielt (Dixit et al. 2008), soll das *Mapt*-Gen im Hippokampus von FVB/NxC57Bl/6-Mäusen – auch mit Blick auf geplante Genexpressionsstudien an „Alzheimer-Mäusen“ mit gleichem genetischen Hintergrund – untersucht werden.

Gap43 (*Growth-associated Protein 43*, Neuromodulin)

Die Phosphorylierung von Gap43 durch die PKC konnten Akers und Routtenberg (1985) mit erhöhter synaptischer Plastizität korrelieren. Aigner und Mitarbeiter (1995) zeigen, dass die Überexpression von Gap43 zu einem verstärkten Auswachsen von Neuriten führt. Die hierfür nötige Stabilisierung der Aktin-Filamente erfolgt über die Gap43-Phosphorylierung (He et al. 1997). Routtenberg und Kollegen (2000) entdeckten an Gap43-*Knockin*-Mäusen, dass eine *Gap43*-Überexpression zu verstärktem *LTP* im *Gyrus dentatus* sowie zu verbesserten Lernergebnissen in der *Radial Arm Maze* führt. Entsprechend zeigten heterozygote *Gap43-Knockdown*-Mäuse schlechtere Lernleistungen als ihre Wildtyp-Kontrollen (Rekart et al. 2005). Eine direkte Interaktion von Gap43 mit den präsynaptischen Komponenten der Transmitterfreisetzung (Abbildung 1.7) beschreiben Haruta und Mitarbeiter (1997) sowie Heemskerk et al. (1990), bei der die Phosphorylierung von Gap43 zu einer erhöhten Freisetzung von Noradrenalin im Hippokampus von Ratten führt.

Aufgrund der beschriebenen Rolle von Gap43, das auch als Alzheimer-Biomarker diskutiert wird (Blennow 2004), in präsynaptischen Terminalien und synaptischer Plastizität wurde das *Gap43*-Gen für die *qPCR*-Studie ausgewählt.

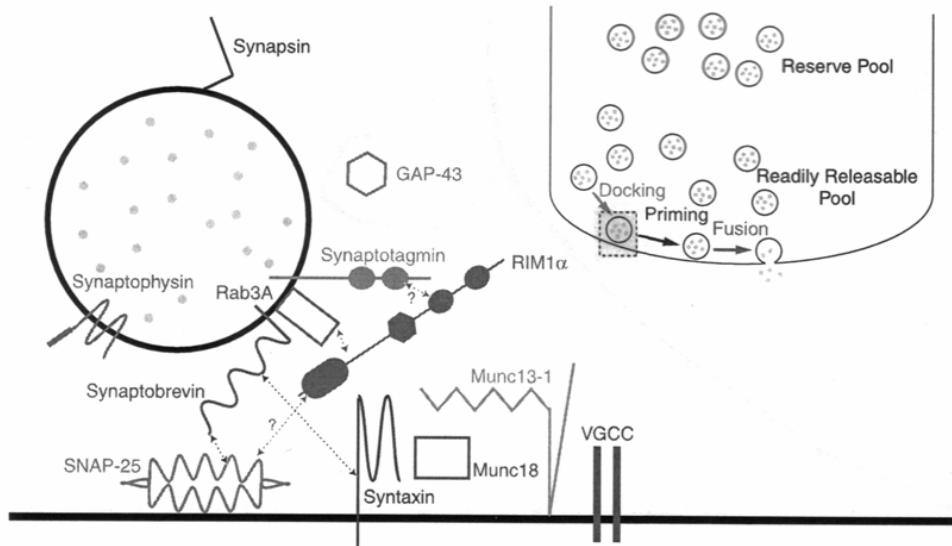


Abbildung 1.7: Schema eines präsynaptischen Terminals.

Rechts ist eine Präsynapse mit den finalen Stufen der Neurotransmitter-Ausschüttung dargestellt. Der eingerahmte andockende Vesikel ist links vergrößert mit den für die Vesikelfusion wichtigen Vesikel-assoziierten Proteinen angedeutet. Bekannte Interaktionen sind mit Doppelpfeilen, nicht eindeutig gesicherte Befunde mit einem Fragezeichen markiert. Die exakte Rolle des Gap43-Proteins bei der Tranmitterfreisetzung ist noch unklar (aus Powell 2006).

Sor11 (*Sortilin-related Receptor*)

Im *Microarray*-Experiment von Scherzer und Mitarbeitern (2004) wurde eine Herunterregulation von *Sor11* in Lymphoblasten sowie im frontalen Kortex von Alzheimer-Patienten detektiert. Die Studie von Andersen und Kollegen (2005) an Zellkulturen, *Knockout*-Mäusen und Alzheimer-Patienten unterstützt diesen Befund in der Art, dass eine Reduktion von *Sor11* die APP-Prozessierung sowie die A β -Produktion und damit die Möglichkeit verstärkter A β -Plaques-Bildung steigert. Analog dazu schlagen Rogaeva *et al.* (2007) ein Modell vor, das besagt, dass *Sor11* für das Recycling von APP zuständig ist und dadurch die A β -Produktion verringert (Abbildung 1.8). Die Autoren postulieren, dass die reduzierte Synthese von *Sor11-mRNA* im Gehirn ein primäres Ereignis in der Pathologie der Alzheimer-Krankheit ist.

Die Auswahl des *Sorl1*-Gens für die vorliegende *qPCR*-Studie begründet sich darauf, dass dieses Gen im Alzheimer-Gehirn herunterreguliert wird und damit möglicherweise eine wichtige Funktion bei Lern- und Gedächtnisprozessen besitzt.

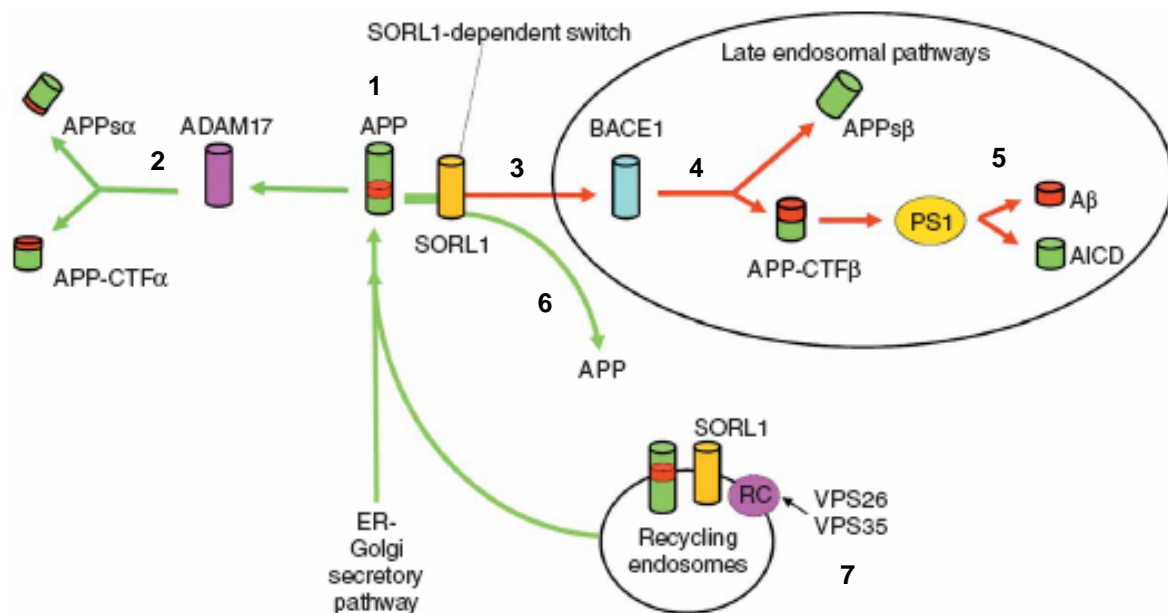


Abbildung 1.8: Modell für die Rolle von Sorl1 bei der APP-Prozessierung.

Das APP-Holoprotein wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat synthetisiert und in Vesikeln zur Plasmamembran transportiert und dort eingefügt (1). Durch die proteolytische Aktivität der α -Sekretase (ADAM17) wird das APP-Protein N-terminal in das lösliche APPs α sowie in das weiterhin Membran-gebundene APP-CTF α geschnitten (2). APP kann auch in den so genannten späten endosomalen Weg eingehen (3, rot). In diesen Endosomen kann die β -Sekretase (BACE1) das lösliche N-terminale APPs β sowie das Membran-gebundene APP-CTF β produzieren (4). Durch die Aktivität der γ -Sekretase (PS1) entsteht schließlich das amyloidogene A β -Fragment (5). Durch Bindung an das APP-Holoprotein kann Sorl1 durch Bildung eines Retromer-Komplexes (RC) das APP in den „sicheren“ Recycling-Weg dirigieren (6, grün). Ist die Sorl1-Synthese gestört, kann APP verstärkt in den späten Endosomen prozessiert sowie die A β -Produktion erhöht werden. Einen ähnlichen Effekt hat die Blockade des RC durch VPS26 beziehungsweise VPS35 (7) (aus Rogaeva *et al.* 2007).

APP (Amyloid-Vorläuferprotein)

Neben dem vesikulären Transport (Schritt 1 in Abbildung 1.5.5) kann APP auch durch Bindung an Kinesin in Richtung Synapsen transportiert werden (Kamal et al. 2000). Dort wird dem Protein von Kamenetz und Mitarbeitern (2003) eine physiologische Rolle bei der glutamatergen Transmission zugeschrieben. Die Forscher fanden an Mäusen heraus, dass neuronale Aktivität die A β -Sekretion stimuliert sowie dass dieses Peptid über einen vermuteten Rückkopplungsmechanismus die exzitatorische synaptische Transmission vermindert. Entsprechend beschreiben Priller und Kollegen (2006) eine erhöhte exzitatorische Transmission an den Synapsen einer hippocampalen Kultur, die aus APP-knockout-Mäusen gewonnen wurde. Genauer gesagt detektierten die Autoren vergrößerte Amplituden von EPSP (exzitatorisches postsynaptisches Potential), eine erhöhte Frequenz an spontanen mEPSP (Miniaturpotential) sowie eine größere Zahl an präsynaptischen Vesikeln, wobei sie keine Änderungen in der Transmitterfreisetzung feststellen konnten. Ähnliche Ergebnisse lieferten die Experimente von Parent und Mitarbeitern (2005), bei denen eine erhöhte Frequenz an spontanen mEPSP sowie eine verstärkte Synapsenbildung bei kultivierten Neuronen aus Presenilin 1(PS1)-knockout-Mäusen gemessen wurde. Auch Young und Selkoe (2005) beschreiben ein verstärktes Auswachsen von Neuriten in einer aus APP-knockout-Mäusen erzeugten Neuronenkultur. Aufgrund all dieser in vitro-Studien behaupten Priller et al. (2006), dass A β -Monomere eine bedeutende physiologische Funktion bei der Modulierung von synaptischer Plastizität besitzen. Der Mechanismus, über den A β diese regulatorische Funktion ausübt, könnte auf der Beobachtung beruhen, dass nicht-aggregiertes, nicht-pathologisches A β die Funktion von Ca²⁺- und K⁺-Kanälen moduliert (Price et al. 1998, Ramsden et al. 2001, 2002).

Das 19 Exons umspannende *APP*-Gen kann durch alternatives Spleißen mehrere Isoformen bilden. Die *APP695*-mRNA ist die prädominante Form im Nervengewebe (Yoshikai et al. 1991) und wird mit den in dieser Studie verwendeten Primern – die eine 70bp-Sequenz der Exone 4 und 5 amplifizieren – detektiert.

1.8 Gene der mitochondrialen Atmungskette

Im geplanten *Microarray*-Experiment sind zusätzlich Gene der mitochondrialen Atmungskette sowie einige Translokasen der inneren Mitochondrienmembran zur Untersuchung auf ihre Beteiligung bei Lernvorgängen vorgesehen. Hierbei handelte es sich um Gene des mitochondrialen als auch des nukleären Genoms. Das Mitochondriengenom ist ein etwa 20 kb großes zirkuläres Molekül, das in einem Neuron mit mehreren Tausend Kopien vorhanden sein kann (Bogehagen und Clayton 1974). Während auf dem inneren *mtDNA*-Strang die *mRNA* des Polypeptids *mt-Nd6* kodiert ist, sind auf dem äußeren Strang die restlichen zwölf proteinkodierenden Gene zu finden (Abbildung 1.9). Diese polyzistronisch angeordneten Gene werden – unter der Kontrolle nukleärer Transkriptionsfaktoren – in eine gemeinsame Prä-*mRNA* transkribiert, die anschließend in die einzelnen *mRNA*'s prozessiert wird. Williams und Mitarbeiter (1998) konnten zeigen, dass die Gene *mt-Cytb* und *mt-CO1* sowie *mt-Nd6* nach hochfrequenter Stimulation im Hippokampus von Ratten in gleicher Weise hochreguliert werden. Ähnliches beschreiben Liang *et al.* (2006), die nach Depolarisation von primären neuronalen Zellen mit Kalziumchlorid eine gemeinsame Hochregulation aller mitochondrialen sowie nukleären Untereinheiten der Cytochrom C-Oxidase (CO) beobachteten. Auf dem inneren Strang der *mtDNA* werden unter anderem auch *RNA-Primer* kodiert (Abbildung 1.9) (Pham *et al.* 2006). Diese Arbeit beschreibt die enge Verflechtung zwischen mitochondrialer Transkription und Replikation. Entsprechend behaupten Hevner und Wong-Riley (1991), dass die Regulation der mitochondrialen Genexpression sowie der *mtDNA*-Kopienzahl die primären Mechanismen zur Regulation der CO-Aktivität in Neuronen sind.

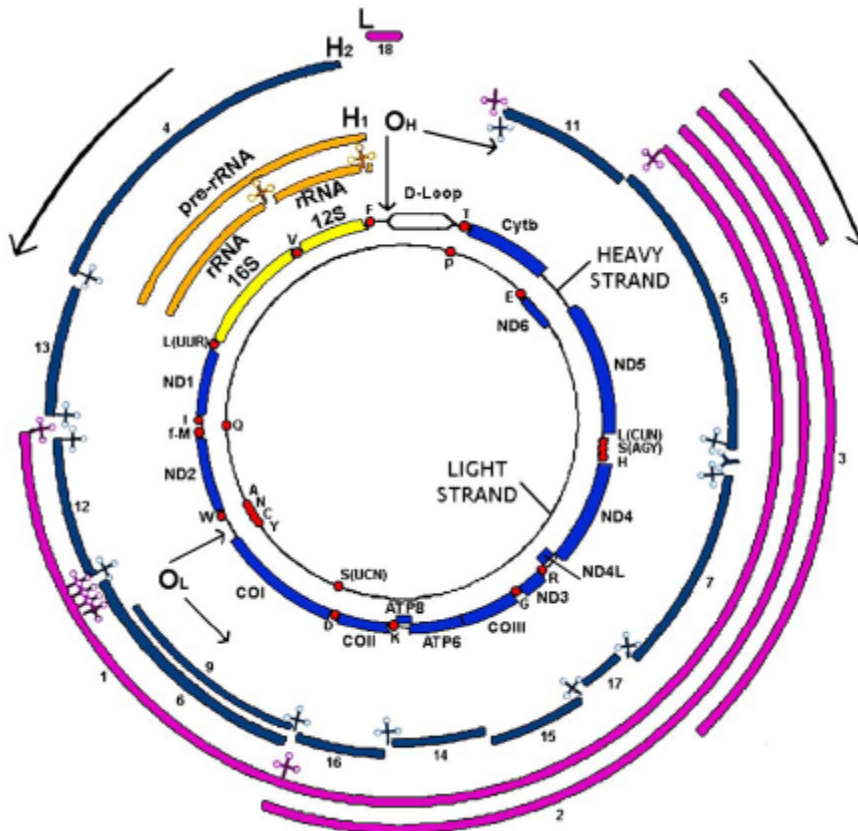


Abbildung 1.9: Das Mitochondriengenom.

Das Mitochondriengenom besteht aus einem inneren (L, *Light strand*) und einem äußeren Strang (H, *Heavy strand*). Während der innere *mtDNA*-Strang acht *tRNA*'s (rot), eine proteinkodierende *mRNA* (*mt-Nd6*, blau) sowie *RNA-Primer* (Transkript #18) kodiert, werden vom schweren Strang 14 *tRNA*'s, 12 *mRNA*'s und zwei *rRNA*'s (gelb) transkribiert. Vom inneren Strang werden je nach Bedarf vier verschiedene Prä-Transkripte (violett) synthetisiert, vom äußeren eine Prä-*rRNA* (orange) beziehungsweise ein großes Prä-Transkript, das in die einzelnen *tRNA*'s („Kreuze“) und *mRNA*'s (dunkelblau) zerschnitten wird. Der *D-Loop* ist ein dreistrangiges *DNA*-Fragment, in dem zahlreiche regulatorische Sequenzen enthalten sind. Mit L, H₁ und H₂ sind die Transkriptionsstartpunkte, mit O_L und O_H die Replikationsstartpunkte der beiden Stränge markiert (aus Montoya *et al.* 2006).

Etwa 90 % des ATP's im Gehirn werden durch die oxidative Phosphorylierung an der Atmungskette produziert (Gunter *et al.* 1994). So gilt die Aktivität der CO – dem terminalen Elektronenakzeptor (Abbildung 1.10) – als zuverlässiger Marker für die neuronale Aktivität (Hevner und Wong-Riley 1993). Williams *et al.* (1998) beschreiben, wie gesagt, dass mitochondriale Gene durch synaptische Aktivität hochreguliert werden. Mäuse, denen chronisch der CO-Inhibitor Natriumazid appliziert wurde, zeigten Defizite im räumlichen Lernen in der *MWM* (Bennett *et al.* 1996). Hierbei wurden keine Unterschiede in der Geschwindigkeit sowie im *MWM*-Test mit sichtbarer Plattform im Vergleich zu den Saline-Kontrollen gefunden. Conejo und Mitarbeiter (2007) fanden eine erhöhte CO-Aktivität im Hippokampus von Ratten, die den *MWM*-Test mit verborgener Plattform absolvierten.

Mitochondrien sind zudem ein wichtiger Regulator des Kalzium-Haushaltes in den Synapsen (Simpson 2000, Levy *et al.* 2003). Außerdem produzieren und exportieren sie Moleküle, die jene Signalwege beeinflussen, die an den Prozessen der synaptischen Plastizität beteiligt sind (Mattson 2007). So können reaktive Sauerstoffspezies Signalfunktionen übernehmen und somit die nukleäre Transkription beeinflussen sowie die Funktion von Membranproteinen verändern (Suzuki *et al.* 1997). Superoxid inaktiviert zum Beispiel als Folge eines Kalzium-Einstroms Phosphatasen mit der Folge einer erhöhten Aktivität der CaMKII (Hongpaisan *et al.* 2004). Das ebenfalls bei der oxidativen Phosphorylierung entstehende Hydrogen-Peroxid kann die Aktivität von Calcineurin (Proteinphosphatase 2B) hemmen (Kamsler und Segal 2003) und somit in die postsynaptische Signalkaskade (siehe Abbildung 1.2) modulierend eingreifen.

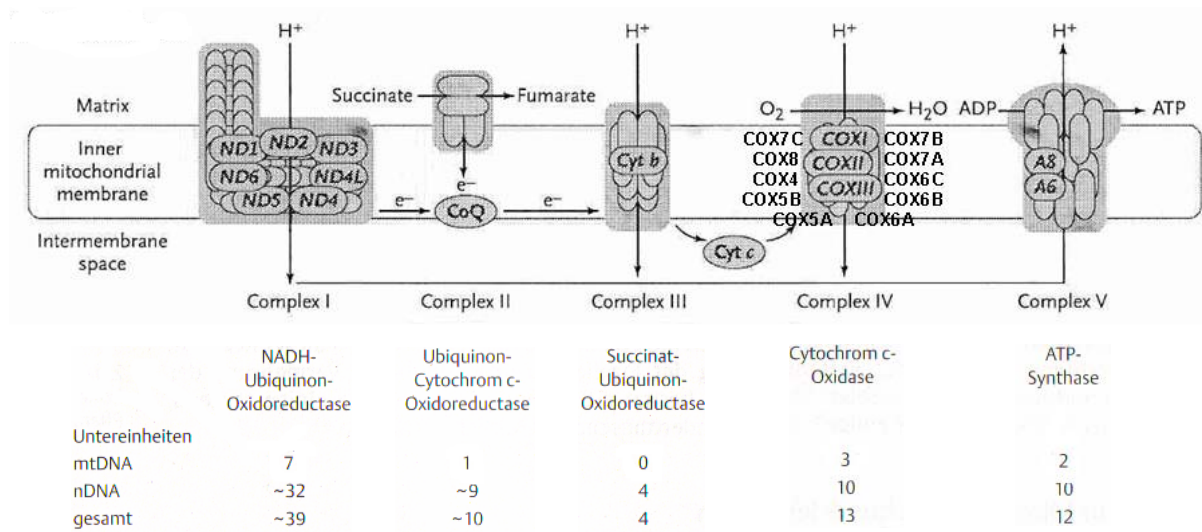


Abbildung 1.10: Die mitochondriale Atmungskette.

In der Skizze ist die Elektronentransportkette mit ihren fünf Enzymkomplexen dargestellt (aus Schägger 2001). Für die Proteinkomplexe sind die katalytischen Untereinheiten eingezeichnet, die bis auf die von Komplex III alle im Mitochondriengenom kodiert sind. Für Komplex IV sind zusätzlich die 10 nicht-katalytischen Untereinheiten mit ihren Genkürzeln dargestellt. Alle nicht-katalytischen Polypeptide in der Atmungskette werden im nukleären Genom kodiert. In der Tabelle unter der graphischen Darstellung ist die Anzahl der mitochondrial und nukleär kodierten Untereinheiten aufgelistet (aus Knippers 1997).

1.9 Ziel der Arbeit

Basierend auf der Hypothese, dass Lern- und Gedächtnisprozesse *de novo*-mRNA- und Proteinsynthese benötigen, wurde in dieser Studie die mit MWM-Lernen und -Erfahrung assoziierte Genexpression untersucht und mit publizierten Daten zur lernabhängigen Genregulation in Ratte (Cavallaro et al. 2002) und Maus (Leil et al. 2002, 2003) verglichen.

Das viertägige räumliche *MWM*-Lernen wird als ein vierstufiger Lernprozess charakterisiert, wobei postuliert wird, dass die Lernstufen aufeinander aufbauen. Diese Annahme basiert zum einen auf der Hypothese, dass während des Schlafes im Hippokampus Konsolidierungsprozesse ablaufen (Wilson und McNaughton 1994), so dass Nagetiere typischerweise signifikante Lernverbesserungen zwischen verschiedenen Trainingstagen zeigen (Schmitt et al. 2006). Zweitens beruht diese „Lernstufen-Hypothese“ auf der *Synaptic Reentry Reinforcement (SRR)*-Hypothese (Wittenberg et al. 2002), nach der wiederholte Reaktivierungen bestimmter molekularer Signalkaskaden – wie zum Beispiel die des NMDA-Rezeptor-abhängigen Signalweges – während eines komplexen Lern- und Gedächtnisprozesses stattfinden. Dies soll dazu dienen, dass einerseits die vorhandenen neuronalen Aktivitätsmuster gefestigt und andererseits neue Informationen in das bereits Erlernete „eingebaut“ werden können. Derzeit sind kaum Gene bekannt, die bei diesen Mechanismen im Sinne der Eingangshypothese reguliert werden. Mit der hier vorliegenden Genexpressionsstudie sollten nun die bei diesen „Lernschleifen“ aktivierten beziehungsweise reprimierten Gene identifiziert werden.

Mit Hilfe eines *Microarray*-Screenings können Gene identifiziert werden, die eine gleichgeschaltete Regulation während des mehrtägigen *Water Maze*-Lernprozesses aufzeigen. In einer anschließenden Analyse mit Hilfe der quantitativen *Real-Time PCR* soll die Quantität der *de novo*-Synthese der *mRNA* bestimmter Kandidatengene gemessen werden. Neben den im *Microarray*-Experiment detektierten Genen sollten Kandidatengene untersucht werden, von denen aufgrund der aktuellen Literaturlage eine lernassoziierte Regulation erwartet wurde, jedoch bisher noch nicht gezeigt werden konnte. Ein weiterer Teilaspekt sollte die mit der unterschiedlichen Lernleistung der Individuen assoziierte *mRNA*-Synthese untersuchen, um die Frage zu klären, ob kognitive Defizite möglicherweise auf eine abnorme *mRNA*-Synthese lernrelevanter Gene zurückzuführen sind.

2 Material und Methoden

2.1 Mäuse

Für die Versuche wurden wildtypische F₁-Hybride der Stämme C57Bl/6 und FVB/N verwendet, um die Ergebnisse dieser Doktorarbeit mit einer geplanten Studie an Alzheimer-Mäusen mit identischem genetischen Hintergrund (Postina *et al.* 2004) vergleichen zu können. Diese entstammten der Tierhaltung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Das Alter der präparierten Mäuse betrug 7 bis 10 Wochen. Aufgrund natürlich auftretender Hormonschwankungen im weiblichen Zyklus wurden für diese Studien ausschließlich männliche Tiere verwertet. Entsprechend zeigen männliche Mäuse bessere Leistungen im *MWM*-Test mit der verborgenen Plattform als weibliche Tiere (D'Hooge und De Deyn 2001). Die Mäuse wurden bei circa 22°C bei einem 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus aufgezogen.

Es wurden Mäuse aus zwei verschiedenen Tierställen der Johannes Gutenberg-Universität Mainz für die Verhaltens- und Genexpressionsstudien verwendet; aus der Tierhaltung am Duesbergweg sowie der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) am Augustaplatz. Die Tiere aus der Tierhaltung am Duesbergweg wurden zur Bekämpfung von Endoparasiten (*Oxyuren*) mit Fenbendazol (FBZ, auch Panacur)-behandeltem Futter (Altromin, Lage/Lippe, Deutschland) ernährt und während der Diplomarbeit 2004 von Sammy Haege (Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) trainiert. Die aus dem ZVTE stammenden Tiere wurden im Tierstall der Psychiatrie weiter gezüchtet und zwischen 2005 und 2007 trainiert sowie präpariert.

2.2 *Morris Water Maze*

Der *Morris Water Maze*-Test (*MWM*) mit der verborgenen Plattform dient der Analyse von räumlichem Lernen und Gedächtnis (D'Hooge und De Deyn 2001) und stellt einen Hippokampus-abhängigen assoziativen Test dar. Während die Trainingstage 1 bis 4 verschiedene Lernniveaus repräsentieren, dient der 5. Tag der Überprüfung der Gedächtnisleistung. Die Mäuse schwammen in etwa 20°C warmem Wasser je nach Dauer bis zum Erreichen der 0,5 – 1 cm unter der Wasseroberfläche befindlichen Plattform maximal 120 Sekunden in der *MWM* ($\varnothing = 2,0$ m) und verblieben anschließend für 30 Sekunden auf der Plattform ($\varnothing = 26$ cm). Dabei absolvierte jede Maus bei einem circa 20 Sekunden-Intervall (*ITI* = *Inter Trial Interval*) täglich 4 Durchläufe mit jeweils unterschiedlichen Startpunkten (Abbildung 2.1). Am 5. Tag fand nur ein Durchlauf mit einer Dauer von 90 Sekunden ohne Plattform (*Probe Trial*) statt.

Die von den Mäusen geschwommene Strecke wurde per Videokamera aufgenommen und mit der *EthoVision*-Software (Version 2.3.19, Noldus Information Technology, Wageningen, Niederlande) analysiert.

Hierbei wurde zunächst die Geschwindigkeit der Mäuse im ersten *MWM*-Durchlauf an *MWM*-Tag 1 analysiert. Dieser Parameter misst die motorische Aktivität und wird daher als Maß für die Motivation der Tiere angesehen, sich in der *MWM* fortzubewegen und der ungewohnten, aversiven *MWM*-Situation zu entkommen. Um das Lernen von zwei oder mehreren Gruppen in der *Water Maze* vergleichen zu können, sollten diese keine Unterschiede bezüglich dieses Parameters aufzeigen.

Um den Lernerfolg der Mäuse zu überprüfen, wurde der Parameter „Latenz“ analysiert. Dieser gibt die Dauer an (in sek), die das Tier benötigt, um die verborgene Plattform zu finden. Weitere Parameter zur Überprüfung der Lernleistung waren die „geschwommene Distanz“ (in cm), die die Maus in der *MWM* schwimmt, bis sie die Plattform erreicht, sowie der während des *MWM*-Durchlaufs errechnete „durchschnittliche Abstand zur Plattform“ (in cm).

Beim Gedächtnistest (*Probe Trial*) an *MWM*-Tag 5 wurde ebenfalls der Parameter „Latenz“ analysiert. Da hierbei ein zufälliges Überqueren der Plattformzone – beim *Probe Trial* wird die Plattform entfernt – das Ergebnis verfälschen kann, wurden zusätzlich die „Zahl der Überquerungen der Plattformzone“ sowie der „Aufenthalt im Zielquadrant“, in dem sich die Plattformzone befand, ausgewertet.

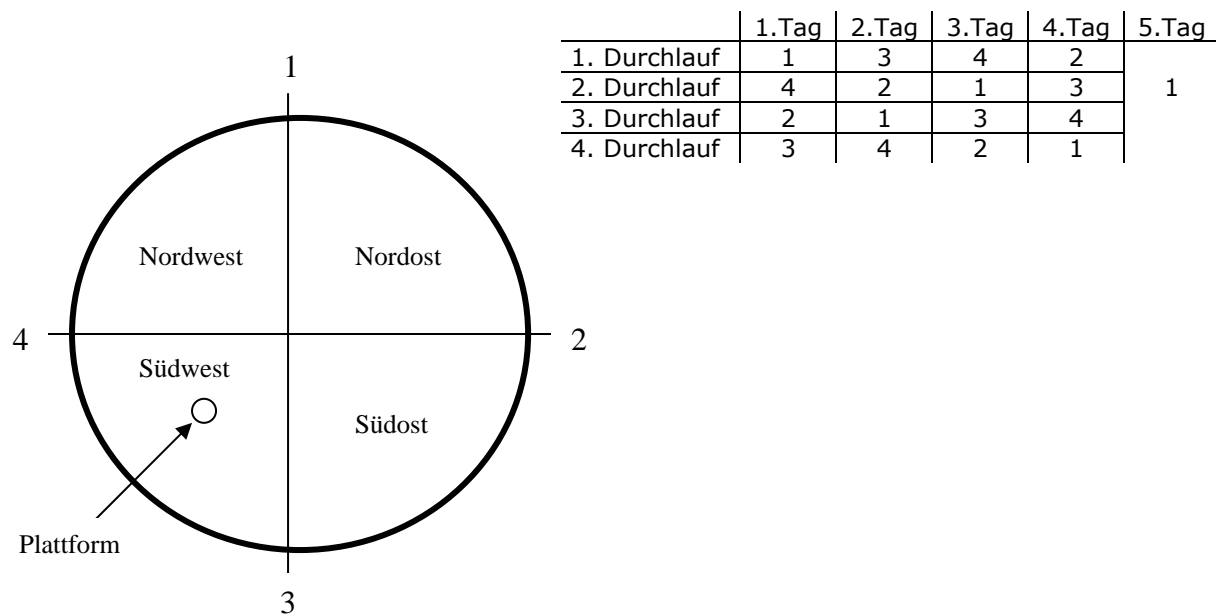


Abbildung 2.1: Einteilung der *MWM* in Zonen und Versuchsschema zur Durchführung des *MWM*-Versuche.

Die *MWM* wurde zur Verhaltensanalyse in vier Quadranten aufgeteilt, wobei im Zielquadrant (Südwest) die Plattform/Plattformzone lokalisiert war. Mit 1, 2, 3 und 4 sind die Einsatzpunkte beziehungsweise die Startpunkte des Maudurchlaufs angezeigt.

2.3 Versuchsdesign

Für die Analyse der mit *MWM*-Lernen und *MWM*-Erfahrung assoziierten Genexpression wurden die drei Versuchsgruppen Test-naive Mäuse (KK, Käfigkontrollen), trainierte Mäuse (L, Schwimmlerner; Tabelle 2.1) und motorisch und emotional gleich belastete Mäuse (SK, Schwimmkontrollen) eingerichtet. Lernmäuse der Trainingstage 2 bis 5 (L) wurden mit Hilfe einer Clusterzentren-Analyse in die beiden Gruppen gute Lerner (gL) und schlechte Lerner (sL) aufgeteilt. Während die KK-Mäuse direkt ihren Käfigen entnommen wurden, verbrachten jeweils eine L- und eine SK-Maus die gleiche Zeit in der *Water Maze* und bildeten somit ein direkt miteinander vergleichbares Paar. Die SK-Mäuse schwammen hierbei ohne, die Lernmäuse mit Plattform. Verschiedene Lern- und Schwimmkontroll-Gruppen wurden nach Trainingsdauer (1, 2, 3, 4 und 5 Tage) sowie nach Zeitpunkt der Hippkampusentnahme (1, 6 und 24 Stunden nach letztem Durchlauf; analog zu Cavallaro *et al.* 2002) gebildet (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Untersuchte Zeitpunkte in der *Water Maze*.

Die Gehirngewebe wurden jeweils eine, sechs oder 24 Stunden nach dem letzten Durchlauf eines Trainingstages (tr4, tr8, tr12, tr16, *Probe Trial*) eingefroren. Mit fetter Schrift hervorgehoben sind die in dieser Doktorarbeit angegebenen Kürzel für die jeweiligen Zeitpunkte.

	Tag 1 tr1 - tr4	Tag 2 tr5 - tr8	Tag 3 tr9 - tr12	Tag 4 tr13 - tr16	Tag 5 <i>Probe Trial</i>
1 Stunde	1-1	2-1	3-1	4-1	5-1
6 Stunden	1-6	2-6	3-6	4-6	5-6
24 Stunden	1-24	2-24	3-24	4-24	5-24

2.4 Gehirnpräparation

Zur Hippokampus-Entnahme wurden alle Mäuse vor der Dekapitation mit Isofluran anästhetisiert. Die Präparation der mit 0,9%iger NaCl-Lösung beträufelten Gehirne erfolgte auf NaCl-befeuchtetem Filterpapier auf einer eisgekühlten Glasplatte.

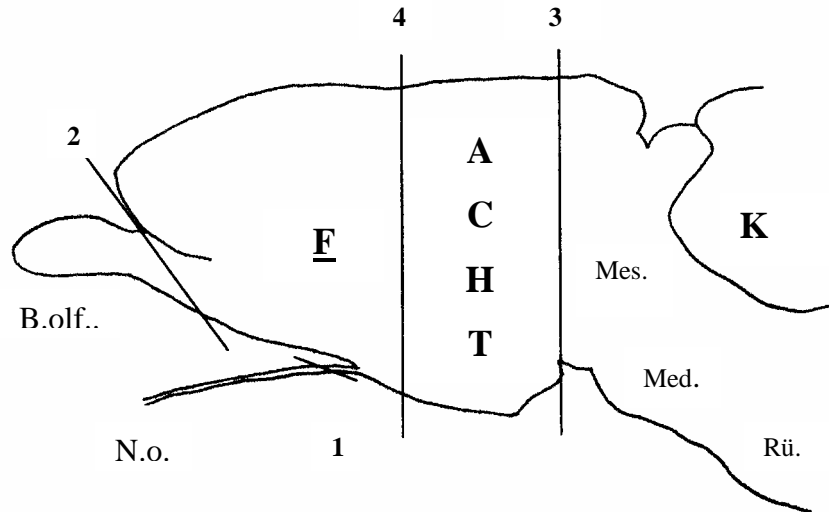
Aus dem Mäusegehirn wurden sechs Gehirnbereiche herauspräpariert (McEwen und Pfaff 1970), wobei der *Bulbus olfactorius*, *Medulla oblongata* sowie anschließende Rückenmarksbereiche verworfen wurden. Die Gehirngewebe wurden unmittelbar nach der Präparation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt, so dass die Gewebe zwischen 4 und 12 Minuten nach der Dekapitation eingefroren wurden. Es wurden neben dem Hippokampus (H) auch ein frontaler Bereich des Telenzephalons (F, frontaler Kortex + basale Hirnkerne), das Cerebellum (K) sowie als *Amygdala* (A), temporaler Kortex (C) und Dienzephalon (T, Thalamus + Hypothalamus) definierte Gehirnareale präpariert und tiefgefroren (Abbildung 2.2).

Zur Präparation der einzelnen Gehirnregionen wurde das Gehirn zunächst aus der Kalotte herauspräpariert. Anschließend wurde der *Nervus opticus* (N.o., Schnitt 1 in Abbildung 2.2A) sowie der *Bulbus olfactorius* (B.olf., Schnitt 2) abgetrennt. Die Schnitte 3 und 4 trennen die Gehirnregionen *Amygdala* (A), temporaler Kortex (C), Hippokampus (H) und Dienzephalon (T) ab. Schnitt 4 wurde unmittelbar caudal des dreieckigen *Chiasma opticums* (Ch.o., Abbildung 2.2B) durchgeführt, Schnitt 3 unmittelbar caudal des Zusammentritts der beiden Kortexhemisphären (Dorsalsicht) beziehungsweise unmittelbar caudal des Hypothalamus (Hyp.; Ventralsicht in Abbildung 2.2B). Aus dem Gewebe caudal von Schnitt 3 wurden Mesenzephalon (Mes.), Pons und Medulla (Med.) sowie Rückenmark (Rü.) vom Cerebellum (K) abpräpariert. Die Entfernung der *Amygdala* (A) aus der medialen Hirnregion (Schnitte 5a und 5b in Abbildung 2.2C) erfolgte wie die Schnitte 2 bis 4 mit einem scharfen Skalpell. Anschließend wurden die beiden medialen Kortexhemisphären (C) sowie die beiden Hippokampi (H) abpräpariert. Das übrig gebliebene innere Hirngewebe wurde als Dienzephalon (T) definiert.

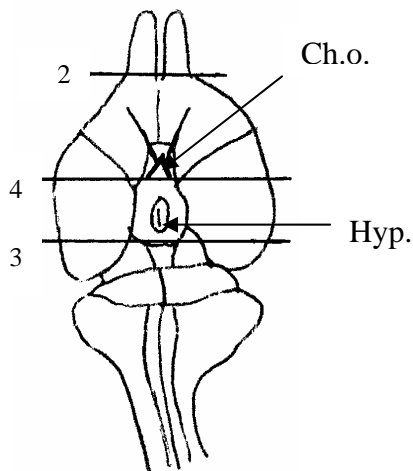
A)

- A Mandelkern (*Amygdala*)
- C temporaler Kortex
- F frontaler Hirnbereich
- H Hippokampus
- K Cerebellum
- T Diencephalon (Thalamus + Hypothalamus)

- B.olf. *Bulbus olfactorius*
- Ch.o. *Chiasma opticum*
- Hyp. Hypothalamus
- Med. *Medulla oblongata*
- Mes. Mesenzephalon
- N.o. *Nervus opticus*
- Rü. Rückenmark



B)



C)

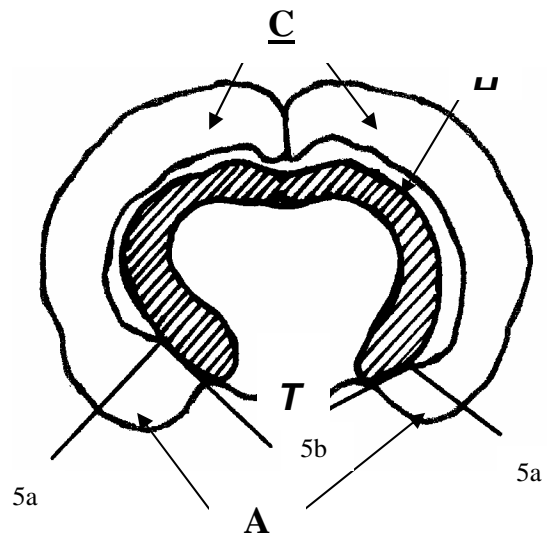


Abbildung 2.2: Schema der Gehirnpräparation.

Die Zeichnung (A) wurde nach McEwen und Pfaff (1970), die Zeichnungen (B) und (C) nach Luine *et al.* (1974) verändert. Dargestellt sind die getätigten Hirnschnitte (1-5), das verworfene Gehirngewebe sowie die herauspräparierten Gehirnregionen (Großbuchstaben). (A) Lateralansicht. (B) Ventralansicht. (C) Querschnitt (Bereich zwischen Schnitt 3 und 4).

2.5 Gewebeaufreinigung

2.5.1 Trizol-Extraktion von *RNA*

Die Zerkleinerung des tiefgefrorenen Hippokampus- und Cerebellumgewebes erfolgte mit Mikromörsern unter Zugabe von 1 ml TRIzol[®] Reagent. Nach gründlichem *vortexen* und 5-minütiger Inkubation bei RT wurden 200 µl Chloroform (ohne Isoamylalkohol) zugegeben und kräftig geschüttelt, bis sich die Probe rosa färbt. Nach 2-minütiger Inkubation bei RT wurde 15 min bei 12000g zentrifugiert (4°C) und anschließend die *RNA*-haltige wässrige Phase abgezogen und in 500 µl Iso-propanol gegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT und 10-minütiger Zentrifugation (12000g; 4°C) wurde der Überstand verworfen. Der folgende Waschschrift mit 1000 µl EtOH und 5-minütiger Zentrifugation (12000g; 4°C) wurde zweimal durchgeführt. Das getrocknete Pellet wurde in 30 µl DEPC-H₂O gelöst und bei -80°C aufbewahrt.

2.5.2 Extraktion von *RNA/DNA/Protein*

Der *Nucleospin*[®] *RNA/Protein*-Extraktionskit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) kann bei Wunsch mit dem *Nucleospin*[®] *RNA/DNA Buffer Set* (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) kombiniert werden. Die Extraktion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.5.3 *DNase*-Verdau

Zur Beseitigung genomischer Verunreinigungen wurde bei den Trizol-extrahierten *RNA*-Proben ein *DNase*-Verdau durchgeführt. Dieser wurde mit dem *RNeasy*[®] *Micro-Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Bei den mit dem *Macherey-Nagel-Kit* extrahierten *RNA*-Proben ist ein *DNase*-Verdau auf der Säule im Extraktionsprotokoll enthalten.

2.5.4 Qualitätskontrolle der *RNA*

Die photometrische Bestimmung der *RNA*-Konzentration sowie die Bestimmung der Reinheit der *RNA*-Proben ($OD_{280/260}$ - und $OD_{260/230}$ -Werte) erfolgte mit dem *NanoDrop ND-100* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware USA) (siehe Beispiel in Abbildung 2.3A).

Die Elektrophorese bei 80 Volt in einem 1%igen Agarose-Gel (*RNA*-Agarose) lieferte einen wichtigen Hinweis auf die *RNA*-Qualität in der Probenlösung (siehe Beispiel in Abb. 2.2B). Hierzu wurde die *RNA* vor der Beladung des Gels (1 μ l der *RNA*-Probe + 2 μ l DEPC- H_2O + 3 μ l *FDE Loading Dye*) für 5 min bei 95 °C denaturiert (siehe Beispiel in Abbildung 2.3B).

2.6 *cDNA-Microarray*

Die *Microarray*-Experimente wurden zu den in Tabelle 3.1 aufgelisteten Mäusen (ohne FBZ) durchgeführt, wobei hierbei ein Vergleich zwischen den Hippokampi von guten Lernern (gL) mit Schwimmkontrollen stattfand. Hierbei wurden zu jedem der insgesamt 15 Zeitpunkte jeweils *Pools* aus vier Mäusen verwendet. Jedes *Microarray*-Experiment wurde bezüglich der beiden verwendeten *Alexa555/647*-Farbstoffe zusätzlich in einem reversen Ansatz (*Dye-Swap*, Abbildung 2.4) durchgeführt.

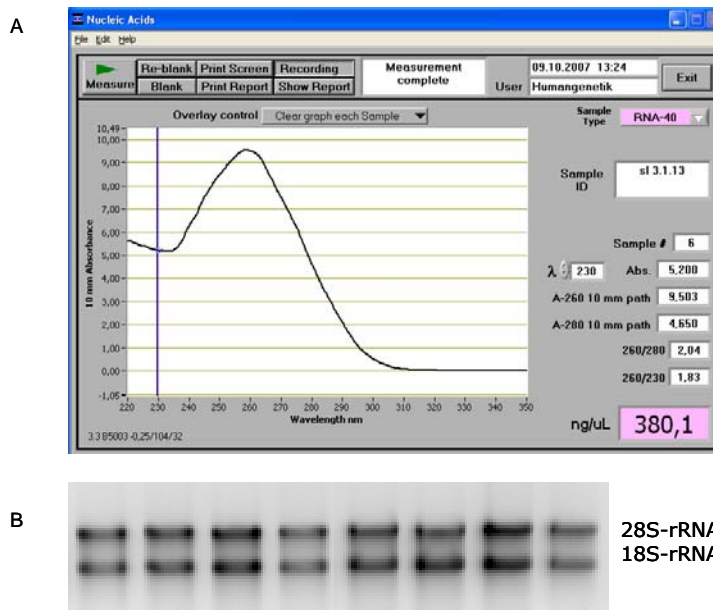


Abbildung 2.3: Qualitätskontrolle der RNA.

(A) Dargestellt ist die Absorptionskurve der RNA-Probe der Lernmaus 3.1.13. Während Nukleinsäuren bei 260 nm absorbieren, absorbieren Peptidbindungen bei 230 nm und aromatische Aminosäuren bei 280 nm. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen $OD_{260/280}$ -Wert von 1,8, eine reine RNA-Lösung von 2,0. Ist die Nukleinsäurelösung mit Proteinen (oder Phenol) kontaminiert, so ist der $OD_{260/280}$ -Wert signifikant kleiner (Lottspeich und Zorbas 1998).

(B) Dargestellt ist ein RNA-Gel von 8 RNA-Proben. Bei einer guten RNA-Präparation sind die 28S-*rRNA*- und 18S-*rRNA*-Bande der eukaryotischen ribosomalen RNA deutlich zu erkennen und dürften kaum degradiert sein. Für die menschliche *rRNA* wurde für die 28S-*rRNA* eine Größe von 5,1 kb und für die 18S-*rRNA* 1,9 kb ermittelt ((Lottspeich und Zorbas 1998).

2.6.1 Herstellung des *cDNA*-Genchips

Um lernrelevante Gene detektieren zu können, wurde ein *cDNA*-Genchip hergestellt (gemäß Eisen und Brown 1999, Hedge *et al.* 2000), der *cDNA*-Klone von 617 ausgewählten Genen enthielt. Da einige Gene verschiedene Transkripte synthetisieren können, wurden von einigen Genen verschiedene Transkript-spezifische *EST*-Sequenzen (*EST* = *Expressed Sequence Tag*) aus der *UniGene*-Expressionsbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene) ausgesucht und beim Deut-

schen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD) in Berlin bestellt. Daher beinhaltet der Maus-Genchip insgesamt 776 verschiedene, 200 bis 1000 bp große *EST*-Sequenzen. Da von einigen *cDNA*-Klonen mehrere *PCR*-Produkte hergestellt und *gespottet* wurden, enthielt der Genchip insgesamt 896 verschiedene *PCR*-Produkte. Für den lernspezifischen Maus-Genchip wurden Gene ausgewählt, die mit synaptischer Funktion und Plastizität (wie zum Beispiel Gene von Wachstumsfaktoren, Vesikel-assoziierte Proteine, Proteine der extrazellulären Matrix, Neurotransmitter-Rezeptoren, Proteine der postsynaptischen Signalwege, Transkriptionsfaktoren) sowie mit der Alzheimer-Krankheit (unter anderem *APP*, *Mapt*) assoziiert sind.

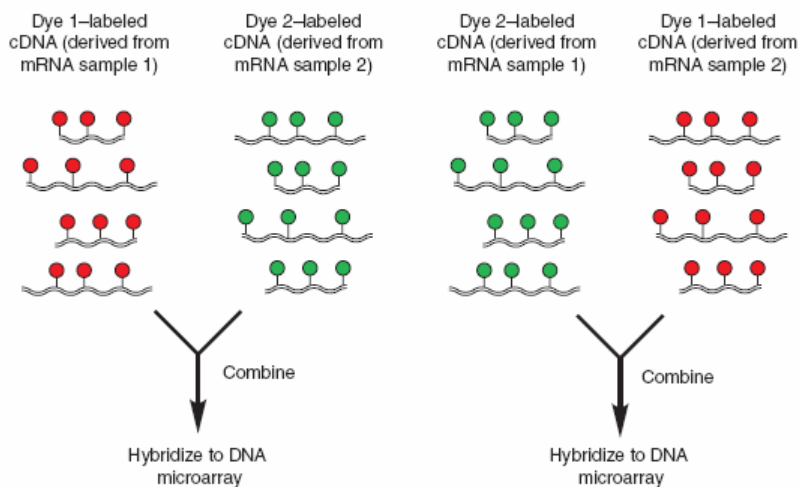


Abbildung 2.4: Zwei Farben-cDNA-Microarray.

Beim zwei Farben-cDNA-Microarray werden die beiden miteinander zu vergleichenden Proben jeweils mit einem rot und einem grün emittierenden Farbstoff markiert. Um den *Bias* zwischen den beiden Farbstoffen zu minimieren, wird zusätzlich ein reverses *Dye-swap*-Experiment durchgeführt.

(aus: probes.invitrogen.com/lit/bioprobes48/bp48_03.pdf)

2.6.1.1 Synthese der *PCR*-Produkte

Zur langfristigen Aufbewahrung der bestellten *cDNA*-Klone wurden diese in insgesamt zehn 96er-Platten in Glycerol bei -80°C tiefgefroren; die so genannte RZPD-Nummer (vergleiche Abbildung 5) gibt die Position des *cDNA*-Klons in den eingefrorenen 96er-Platten an.

Die Animpfung der Klone erfolgte in 96er-Platten in 200 μl LB-Medium plus Antibiotikum (über Nacht bei 37°C). Das nach Zentrifugation (5 min bei 3000g) erhaltene Bakterienpellet wurde in 100 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ (Braun, Melsungen, Deutschland) suspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte im Wasserbad (5 min bei 100°C). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min bei 3000g) wurde der Plasmid-haltige Überstand für die Amplifikation bei 4°C aufbewahrt.

Um eine ausreichende Menge des für das *Spotten* notwendigen *PCR*-Produkts zu erhalten, wurde die *cDNA* amplifiziert. Für die in 96er-Platten durchgeführte *PCR* (*Mastercycler gradient* von Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden 3 μl des aufbewahrten *DNA*-Präzipitats pro *PCR*-Ansatz eingesetzt.

Mit Hilfe eines 1%igen Agarose-Gels (Einsatz von 5 μl *PCR*-Produkt) wurden erfolgreiche Amplifikate (95 μl) identifiziert und bei -20°C für die weitere Verarbeitung aufbewahrt. Nicht erfolgreichen Amplifikate wurden verworfen.

Unter Zuhilfenahme der Gradienten-*PCR* (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde die *Annealing*-Temperatur der Schmelztemperatur (T_m) der *Primer* angepasst beziehungsweise bei nicht zufrieden stellendem *PCR*-Produkt variiert. Das *PCR*-Programm beinhaltete eine vorausgehende Aufheizung des Deckels auf 105°C , eine initiale Inkubation des 100 μl -*PCR*-Ansatzes für 8 min bei 95°C und 35 Zyklen á 1 min bei 94°C (Denaturierung), 35 Zyklen á 1 min bei variabler *Annealing*-Temperatur sowie 35 Zyklen á 1 min bei 72°C (Extension). Entsprechend der gelieferten Vektoren wurden die *Primerpaare* *RZPD_M13 for/RZPD_M13 rev*, *M13 rev (-29)/M13 uni (-21)*, *Sugano F1/Sugano R1*, *T7/sp6* und *T7/T3* verwendet.

2.6.1.2 Sequenzierung der *PCR*-Produkte

Die Sequenzierung der *cDNA*-Klone diente der Überprüfung der Sequenz der gelieferten *cDNA*-Klone und war für die Diskussion der differentiellen Genexpression unerlässlich.

Zur Aufreinigung in der *PCR*-Maschine wurde zunächst ein *Exo I-SAP*-Verdau aus 25 µl *PCR*-Produkt, 0,225 µl *Exo I*, 0,9 µl *SAP* und 4,875 µl H₂O_{dest} (Braun, Melsungen, Deutschland) angesetzt. Zum *Exo-SAP*-Verdau wurde das *PCR*-Produkt für 25 min bei 37°C und anschließend für 15 min bei 72°C inkubiert.

Für die Vorsequenzierung wurden von diesem Verdau 4 µl benötigt und die restliche Probe bei -20°C eingefroren. Der Ansatz für das Vorsequenzierprogramm (35 Zyklen á 20 sek bei 96°C, 20 sek bei 50°C, 4 min bei 60°C) bestand neben den 4 µl Verdau-Produkt aus 11,5 µl H₂O_{dest} (Braun, Melsungen, Deutschland), 4 µl *DTCS Quick Start Mix* (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) sowie einem der beiden oben genannten *Primer*.

Die anschließende *DNA*-Fällung erfolgte gemäß der Ethanol-Aufreinigung nach *Beckman Coulter*. Die Sequenzierung wurde mit Hilfe der Sequenziermaschine *CEQTM 8000 Genetic Analysis System* (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) durchgeführt.

Das *Blasten* der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit dem *Blast*programm von *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>).

2.6.1.3 Spotten der *PCR*-Produkte

Für das Fällen der 50 µl *PCR*-Produkt wurden zunächst 125 µl 96% EtOH sowie 5 µl 3M NaAc (pH 5,5) zugefügt und für mindestens 30 min bei -80°C tiefgefroren. Nach der 60minütigen Zentrifugation (3000 g; 4°C) wurde der Überstand abpipettiert, 50 µl 70 % EtOH zugegeben und bei Raumtemperatur für 15 min geschüttelt. Dem anschließenden Zentrifugationsschritt (30 min, 3000 g, 4°C) folgte das Abziehen des Ethanols. Das in der Vakuumpumpe getrocknete *DNA*-

let wurde in 11 μl *Spotting*-Puffer (3xSSC + 1,5M Betain) gelöst und resuspendiert. Zur Kontrolle der *DNA*-Fällung wurde 1 μl hiervon auf eine EtBr-Agarose-Platte pipettiert.

Die restlichen 10 μl wurden für das Genchip-*Spotting* verwendet, das per Auftrag am Institut für Molekulargenetik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz mit Hilfe des *Omnigrid* von *GeneMachines* (Geneworx AG, Oberhaching, Deutschland) vorgenommen wurde.

2.6.2 *cDNA*-Synthese und -markierung

Eine *Alexa555*- beziehungsweise *Alexa647*-markierte Probe bestand aus 5 μg *RNA* und wurde aus vier Mäusen zusammengestellt, so dass von jeder *RNA*-Probe 1,25 μg *RNA* pro Hybridisierung genommen wurden.

Ein solcher *RNA-Pool* wurde mit DEPC- H_2O auf 9,5 μl aufgefüllt und mit 2 μl 70mM *Random-Primer* sowie 4 μl 5xPuffer für reverse Transkriptase versetzt. Nach der Denaturierung (10min bei 70 °C) erfolgte eine 15minütige Inkubation bei RT. Für die Synthese der *cDNA* (2 h bei 37°C) wurde 2 μl 0,1M DTT, 0,5 μl HPRI, 2 μl 5mM dNTPs, 1 μl 1mM dTTP-*Alexa555* beziehungsweise -*Alexa647* sowie 1 μl reverse Transkriptase hinzupipettiert. Zum Abbau der noch vorhandenen *RNA* (20 min bei 37°C) wurden 1 μl *RNase H* zugegeben. Dieses Protokoll zur reversen Transkription der *RNA* wurde gemäß der Anleitung des *SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Carlsbad, USA) durchgeführt.

Nach Zugabe von 80 μl DEPC- H_2O erfolgte die Säulenaufreinigung nach dem *Nucleospin Extract*-Reinigungskit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Die so erhaltene 30 μl -Probe wurde bis zur Verwendung in den Hybridisierungs-Experimenten bei -20°C abgedunkelt aufbewahrt.

Je nach Verwendung des Farbstoffes wurden die markierten Nukleotide *Cy3*-/*Cy5*-dTTP (je 1 mM), 10xNukleotid-Mix für *Alexa555/647* beziehungsweise

25x Aminoallyl-dNTP-Mix für Cy3-/Cy5-AA (alle: Invitrogen, Carlsbad, USA) dem RT-PCR-Ansatz zugegeben. Bei der Variante der Aminoallyl-Markierung wurde die AA-dNTPs enthaltende cDNA mit Phosphat-Waschpuffer (84,25 Teile 95% EtOH, 15,25 Teile H₂O_{bidest}, 0,475 Teile 1M K₂HPO₄, 0,025 Teile 1M KH₂PO₄) und Phosphat-Elutionspuffer (99,6 Teile H₂O_{bidest}, 0,38 Teile 1M K₂HPO₄, 0,02 Teile 1M KH₂PO₄) aufgereinigt, mit 0,1 M pH 9 Natriumkarbonat-Puffer versetzt und die Cy3-/Cy5-Ester (2 Stunden bei Raumtemperatur) zugegeben.

2.6.3 Durchführung der *Microarray*-Experimente

Die *gespotteten Slides* wurden für die Hybridisierung aktiviert, indem sie nach Wasserdampfbehandlung für 45-60 Sekunden auf eine 80°C-Platte gelegt wurden. Nach zweifachem UV-Crosslink kamen die Genchips in 78 ml Methylpyrrolidon, 8,75 ml 0,2 M Na-Borat (pH 8) und 1,25 g Succinic-Anhydrid für 15 min auf den Schüttler (100 Mot). Dem fünfmaligen Waschen mit H₂O_{bidest} folgte das beidseitige Trocknen der *Slides* mit gereinigter Druckluft.

Pro Hybridisierung wurden von einer *Alexa555*- und einer *Alexa647*-markierten cDNA-Probe jeweils 10 µl zusammengeführt und mit 5 µl tRNA, 5 µl C₀t-DNA und 220 µl Hybridisierungspuffer versetzt, geschüttelt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Nach erneutem Schütteln (*vortexen*) wurden die Proben in die entsprechenden Kammern des *Lucidea SlidePro Hybridizers* (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) gelegt.

Bei längeren Leerlaufzeiten der Hybridisierungsmaschine wurde ein Essigsäure-Waschprogramm angewandt, jeweils gefolgt von einem Wasser-Waschprogramm. Letzteres Waschprogramm reinigte die Maschine auch zwischen den nacheinander durchgeführten Hybridisierungen.

Die hybridisierten Genchips wurden mit dem *Affymetrix Array Scanner 428TM* (Affymetrix, Santa Clara, USA) gescannt und die Intensität der *Spot*- und Hintergrundsignale mit Hilfe der *ImaGene-Software v4.2* (BioDiscovery, El

Segundo, USA) quantifiziert (Abbildung 2.5). Diese Signalwerte wurden für den Vergleich der verschiedenen Farbstoffkombinationen sowie für die Normalisierung verwendet.

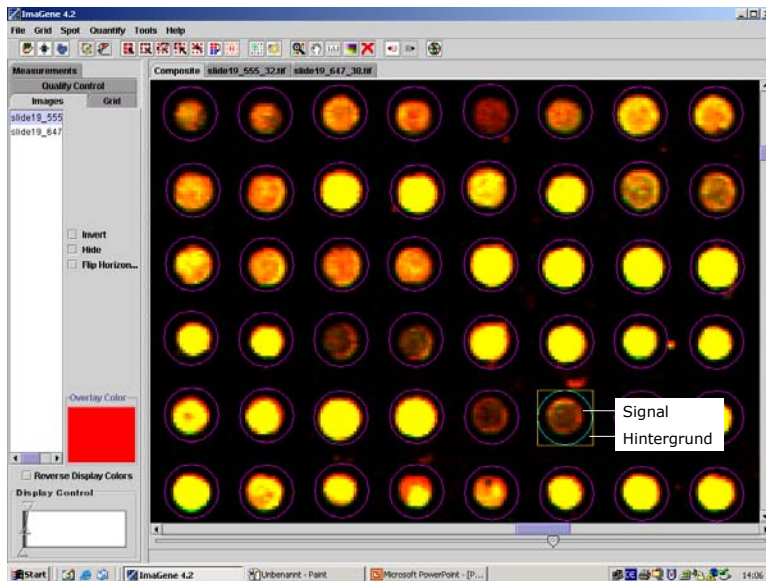


Abbildung 2.5: Quantifizierung der *Microarray*-Signalwerte.

Es ist der Ausschnitt eines Genchips sowie die mittels der *ImaGene-Software v4.2* (BioDiscovery, El Segundo, USA) ausgewählten Bereiche für das *Spot*- und das Hintergrundsignal dargestellt.

2.6.4 Auswertung der *Microarray*-Experimente

Die *Microarray*-Daten wurden einerseits mit Hilfe des Programms R (Download auf <http://www.r-project.org>, <http://www.bioconductor.org>, Dean and Raftery 2005) normalisiert und ausgewertet. Zur Validierung dieser *Microarray*-Auswertung wurden die Daten zusätzlich per Auftrag im IMBEI (Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik, Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) statistisch analysiert. In beiden Fällen wurden die Rohdaten mit der *LOWESS*-Methode (*Locally Weighted Scatterplot Smoothing*, Workman et al. 2002) normalisiert (Abbildung 2.6).

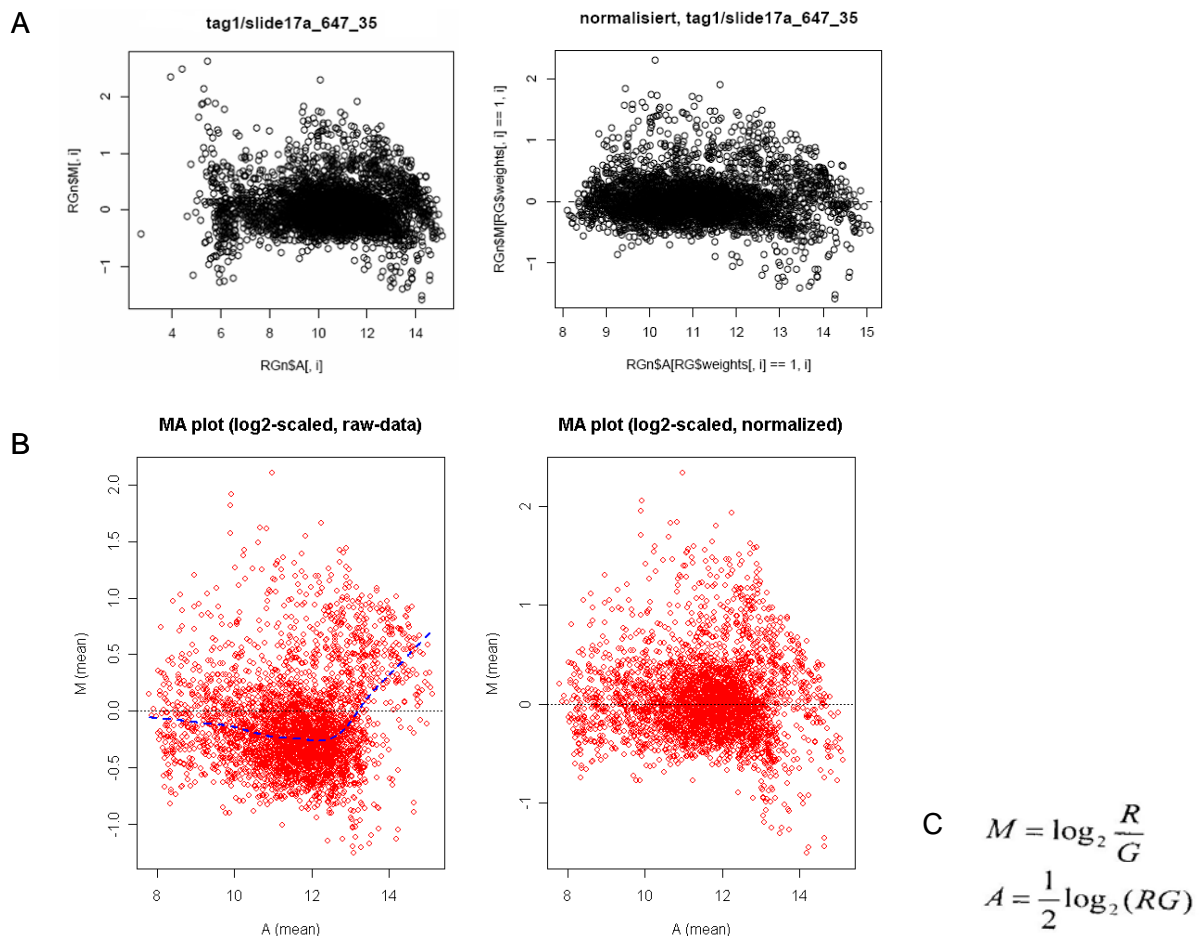


Abbildung 2.6: MA-Plots.

Es sind die *MA-Plots* des *Slides* 17a vor (links) und nach der *LOWESS*-Normalisierung (rechts) dargestellt. Die Schaubilder in (A) wurden bei der Normalisierung am IMBEI-Institut, die *MA-Plots* in (B) am Institut für Humangenetik erstellt. Die gestrichelte Linie in (B) zeigt die für die Normalisierung errechnete Basislinie an. Die Formeln zur Berechnung der *MA-Plots* sind in (C) dargestellt (R= Rot-Signal, G = Grün-Signal).

2.6.4.1 Vergleich der Farbstoffvarianten *Cy3/Cy5*, *AA-Cy3/Cy5* und *Alexa555/647*

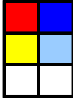
Da die in dieser Doktorarbeit verwendeten Farbstoffe aus vor allem stöchiometrischen Gründen unterschiedlich in die transkribierte *cDNA* eingebaut werden, wurden die verschiedenen Farbstoffvarianten bezüglich Qualität und Quantität der jeweils erzeugten Signalwerte miteinander verglichen. Die *Cy3/Cy5*-Farb-

stoffkombination wurde bei insgesamt 44 *Slides* (je 2880 *Spots* beziehungsweise Signalwerte) verwendet, der *Alexa555/647*-Farbstoff bei 72 *Slides* (je 3840 *Spots*) und die *AA-Cy3/Cy5-Variante* bei 2 *Slides* (je 6144 *Spots*). Während die beiden erstgenannten Farbstoffe enzymatisch während der reversen Transkription eingebaut werden, binden bei der dritten Variante die *Cy3*- und *Cy5*-Farbstoffe über Amminoallyl-Esterbindungen (AA) an die Nukleotide der transkribierten *cDNA*.

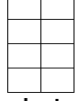
2.6.4.2 Auswertung des *Alexa-Microarray* mit einem Farbkode

Für die Auswertung der im *Alexa-Microarray* erzeugten Signale wurden alle *Spots* mit $\text{Signal} \leq 3 \cdot \text{Hintergrund}$ sowie alle $\text{Signal} < 500$ von Normalisierung und anschließender Analyse ausgeschlossen. Die verbleibenden Ratio-Werte wurden mit einem für diese Arbeit entwickeltes Auswertungssystem bearbeitet, die auf die Beurteilung möglicher Unterschiede zwischen dem Norm- (4 *Spots*) und dem *Revers-Slide* (4 *Spots*) besonderen Wert legt (Abbildung 2.7). Mittels der oben beschriebenen Qualitätskriterien wurden zu jedem Zeitpunkt 8 Ratio-Werte analysiert. Dabei wurden mit einem Farbkode nur jene Gene ausgewertet, die bei mindestens einem *Spot* einen Ratio-Wert (gL/SK) von $> 1,5$ (*Cut-Off*) aufzeigten. Anschließend wurden alle Ratio-Werte dieses Gens kategorisch ausgewertet, wobei für eine $> 1,5$ -fache Hochregulation die Farbe Rot, für eine $> 1,5$ -fache Herunterregulation (Ratio-Wert ist hierbei $< 1/1,5$, also $< 0,67$) die Farbe Blau, für eine tendenzielle Hochregulation (1,0- bis 1,5-fach) die Farbe Gelb sowie für eine tendenzielle Herunterregulation (0,8- bis 0,67-fach) die Farbe Hellblau verwendet wurde. Dem *Cut-Off* entgegengesetzte tendenzielle Regulationen wurden mit der Farbe Weiß versehen (Abbildung 2.7A). Ebenso wurden die gemäß den oben genannten Qualitätskriterien ausgeschlossene *Spots* (leer in Abbildung 2.7C) durch die Farbe Weiß repräsentiert. Beispiele für die Auswertung der einzelnen Ratio-Werte mittels des in Abbildung 2.7B dargestellten Farbkodes sind in Abbildung 2.7C angezeigt.

A

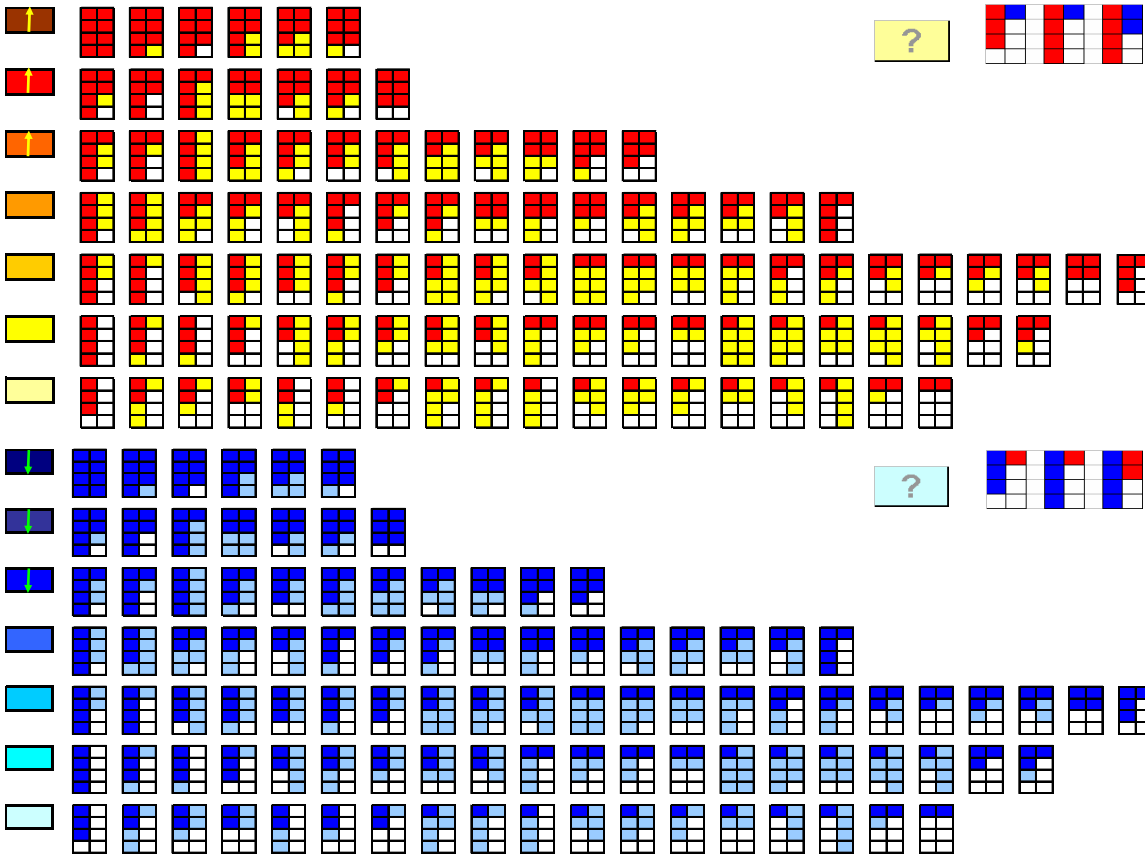


> 1,5-fache Regulation des Spots
 1,0 - 1,5-fache Regulation der selben Richtung
 1,0 - 1,5-fache Regulation der entgegengesetzten Richtung
 oder gemäß Qualitätskontrolle ausgeschlossener Spot



Norm-Slide ↙ ↘ Reverse-Slide

B



Legend for Gen A (red/yellow):

- ↑ (dark red)
- ↑ (orange)
- ↑ (yellow)
- ↑ (light yellow)

Legend for Gen B (blue/cyan):

- ↓ (dark blue)
- ↓ (medium blue)
- ↓ (light blue)
- ↓ (cyan)
- ↓ (light cyan)

Legend for Gen C (red/blue):

- ↑ (dark red)
- ↑ (red)
- ↑ (blue)
- ↑ (light blue)

C

Gen A:		Gen B:		Gen C:	
norm	revers	norm	revers	norm	revers
1,38	0,88	1,24	1,75	1,49	1,94
1,56	0,65	0,93	1,67	1,58	2,33
1,97	leer	1,31	1,25	1,58	2,15
1,63	leer	0,96	1,81	1,56	2,02

Farbkode: ? ↑

Abbildung 2.7: Farbkode 1.

(A) Es sind die vier Kategorien bezüglich der Regulation der *Spots* (links) sowie das Schema zur Darstellung von Norm- und Revers-*Slide* (rechts) in (B) dargestellt.
 (B) Die Regulationen der acht zu einer Gensequenz gehörigen *Spots* wurden in Abhängigkeit ihrer Verteilung auf Norm- und Revers-*Slide* in einen Farbkode 1 (jeweils links dargestellte Symbole/Farben) transferiert. Rote Farbtöne zeigen eine Hoch-, blaue Farbtöne eine Herunterregulation an. Fragezeichen repräsentieren eine unklare Bewertung der Regulation des Gens, weiß zeigt ein nichtreguliertes Gen an.
 (C) Es sind drei Beispiele zur Umwandlung der maximal 8 Ratio-Werte in den Farbkode 1 dargestellt.

Da zu jedem Zeitpunkt zwei technische Replikate erstellt wurden, wurden in einem zweiten Schritt die beiden ermittelten Farbkodes 1 in einen Farbkode 2 transferiert (Abbildung 2.8).

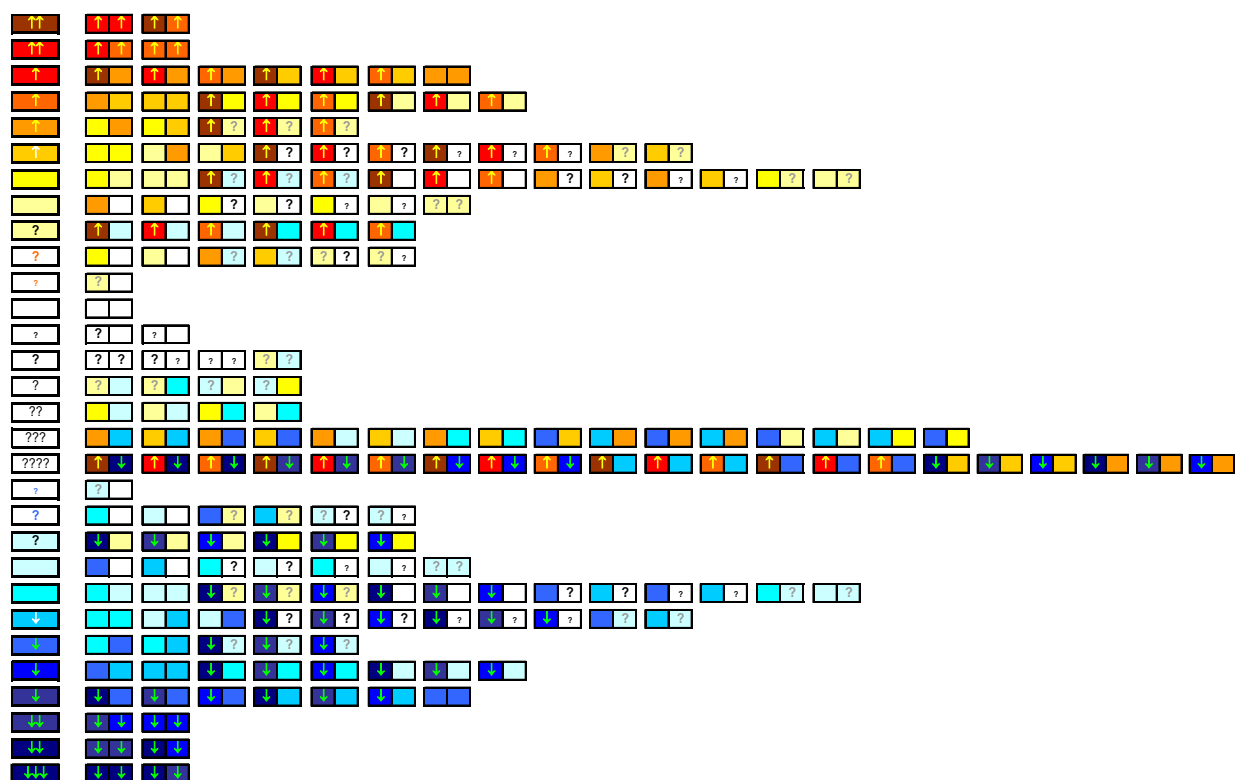


Abbildung 2.8: Farbkode 2.

Die mit dem Farbkode 1 ausgewerteten beiden technischen Replikate (Doppelsymbole rechts) wurden in einen Farbkode 2 (links dargestellte Symbole/Farben) transferiert. Rote Farbtöne zeigen eine Hoch-, blaue Farbtöne eine Herunterregulation an. Fragezeichen repräsentieren eine unklare Situation bezüglich der Regulation des Gens; diese sind in den Abbildungen 3.3.1 und 5 aufgrund übersichtlicheren Darstellung weggelassen. Weiß zeigt ein nichtreguliertes Gen an. Dieser Farbkode 2 stellt eine Beurteilung der Regulation eines Gens dar.

2.6.4.1 Statistische Analyse des Alexa-Microarray am IMBEI

Um die mit dem Farbsystem beurteilten Ratio-Werte statistisch zu analysieren, wurden die *Microarray*-Rohdaten per Auftrag an das IMBEI (Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik, Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) gegeben. Hierzu wurde in Zusammenarbeit mit dem IMBEI eine Liste an Qualitätskriterien (Tabelle 2.2) erstellt, um Genchips mit nicht ausreichender Qualität der Hybridisierung von der weiteren Analyse auszuschließen.

Tabelle 2.2: Qualitätskriterien.

Es wurden vier Qualitätskriterien zur Beurteilung der Qualität der Hybridisierung festgesetzt.

1. Folgende Kriterien müssen für einen *Spot* erfüllt sein, damit er in die Auswertung eingeht:
 - Signal > Hintergrund
 - Signal > 500
 - Hintergrund < 2000
2. Variationskoeffizient der Ratios aller *Spots* je Probe x_1, \dots, x_k berechnen (nach Hintergrundkorrektur):
$$C_v(x_1, \dots, x_k) = \sqrt{\text{Var}(x_1, \dots, x_k)} / \text{Mittelwert}(x_1, \dots, x_k)$$
Für $c_v > 0,18$ werden die betreffenden *Spots* aus der Analyse herausgenommen. Wenn also die verschiedenen *Spots* zu einer Probe unterschiedlich sind, sind die Messungen nicht vertrauenswürdig.
3. Um *Slides* mit „Flecken“ auszuschließen, soll für die *log*-Ratios folgendes gelten:
 - 95. Perzentil (Hintergrund) < Q3 (Hintergrund) + Interquartilsabstand (Hintergrund)
 - 5. Perzentil (Hintergrund) < Q1 (Hintergrund) - Interquartilsabstand (Hintergrund)
4. Ein Kerndichteschätzer (kernel='gaussian', adjust=1) der *log*-Ratios der Hintergrundintensitäten wird erstellt. Ist er zweigipflig, wird das *Slide* verworfen und das Experiment wiederholt.

Ein *Slide* mit weniger als 50% auswertbarer *Spots* gemäß dieser Qualitätskriterien wird verworfen.

2.7 quantitative *Real-Time PCR*

Während bei den *Microarray*-Studien jeweils *Pools* aus vier Mäusen verwendet wurden, wurden in der *qPCR*-Studie Einzelmäuse verwendet, um die individuellen Unterschiede statistisch auswerten zu können. Um Hinweise zu erhalten, ob die mit der *MWM*-Erfahrung (SK/KK) sowie dem räumlichen *MWM*-Lernen (gL/SK beziehungsweise sL/SK) assoziierte Genexpression spezifisch im Hippokampus stattfindet, wurde die *mRNA*-Synthese einiger Gene an *MWM*-Tag 4 auch im Cerebellum-Gewebe untersucht.

2.7.1 *cDNA*-Synthese

Die reverse Transkription erfolgte für 50 Minuten bei 50°C mit dem *SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Carlsbad, USA) gemäß dem Protokoll des Herstellers (siehe auch Protokoll in Kapitel 2.6.2 ohne Verwendung der Farbstoffe). Die erhaltene *cDNA* wurde mit DEPC-H₂O auf 25ng/7,5µl verdünnt.

2.7.2 Durchführung der *qPCR*-Experimente

Für die *qPCR*-Studie wurden die Gene *Rn18s*, *Gapdh* und *Actb* als endogene Kontrollen sowie *Bdnf*, *Reelin*, *PP1*, *Kibra*, *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Mapt*, *Gap43*, *Sorl1*, *APP*, *Crh* und *mt-CO1* untersucht. Die *Primer* für *mt-CO1* wurden mit der *Primer Express[®] software v2.0* (Applied Biosystems, Foster City, USA) generiert (*mt-Co1_for*: ACCGGAATTGTTTTATCCA ACTCA, *mt-Co1_rev*: GCAAACACTGCTCCCAT TGAT, T_m=60°C, Amplikonlänge 104 bp). Für die Amplifikation der nukleären Gene wurden die etablierten *Primer Mm_Rn18s_2_SG QuantiTect Primer Assay (X00686*, Amplikonlänge 149 bp, *Cat.*

No. QT01036875), *Mm_Gapd_2_SG QuantiTect Primer Assay* (NM_001001303, 100 bp, QT00309099), *Mm_Actb_1_SG QuantiTect Primer Assay* (NM_007393, 149 bp, QT00095242), *Mm_Bdnf_1_SG QuantiTect Primer Assay* (NM_007540, 92 bp, QT00097118), *Mm_Reln_1_SG QuantiTect Primer Assay* (NM_011261, 79 bp, QT00093569), *Mm_Ppp1cc_1_SG QuantiTect Primer Assay* (NM_013636, 61 bp, QT00165137), *Mm_Wwc1_2_SG QuantiTect Primer Assay* (NM_170779, 77 bp, QT01169105), *Mm_Dnmt1_1_SG QuantiTect Primer Assay* (NM_010066, 118 bp, QT00157990), *Mm_Dnmt3a_1_SG QuantiTect Primer Assay* (NM_007872, NM_153743, 111 bp, QT00106519), *Mm_Dnmt3b_1_SG QuantiTect Primer Assay* (NM_001003960, NM_001003961, 118 bp, QT00124264), *Mm_Mapt_va.1_SG QuantiTect Primer Assay* (NM_001038609, 113 bp, QT01166417), *Mm_Gap43_1_SG QuantiTect Primer Assay* (NM_008083, 150 bp, QT00101955), *Mm_Sorl1_1_SG QuantiTect Primer Assay* (NM_011436, 116 bp, QT01046444), *Mm_App_1_SG QuantiTect Primer Assay* (NM_007471, 70 bp, QT00165060) und *Mm_Crh_1_SG QuantiTect Primer Assay* (NM_205769, 153 bp, QT00103677) verwendet (Qiagen, Hilden, Germany).

Die Amplifikation der *cDNA* erfolgte mit dem *SYBR Green*-System im *ABI Prism 7500* (Applied Biosystems, Foster City, USA) gemäß den Anleitungen des Herstellers. Hierbei wurden pro 25µl Reaktionsvolumen 25ng *cDNA*, 12,5µl *QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix*[®] und 5µl *5xQuantiTect PrimerAssay* (Qiagen, Hilden, Germany) verwendet. Das *QuantiFast*-Protokoll beinhaltete eine initiale Aktivierung der *Hot Star Taq* (5 min, 95°C) sowie 40 Zyklen mit je einem Denaturierungsschritt (10 sec, 95°C) und einem kombinierten *Annealing/Extension*-Schritt (30 sec, 60°C), bei dem die Fluoreszenzdaten generiert wurden. Die *PCR*-Produkte wurden mittels eines 2%igen Agarosegels untersucht (Abbildung 3.4.1). Die Spezifität der Amplifikate wurde mit dem Standardprogramm von *ABI Prism 7500* zur Schmelzkurvenanalyse überprüft (Abbildung 3.4.2).

2.7.3 Auswertung der *qPCR*-Experimente

Die Auswertung der *Ct*-Werte (Abbildung 2.9) erfolgte in Triplikaten mit der *7500 Fast System SDS Software* (Applied Biosystems, Foster City, USA). Die Festsetzung des Schwellenwertes (*Threshold*) zur Ermittlung der *Ct*-Werte (*Ct* = *Cycle Threshold*) erfolgte automatisch. Ausschließlich Triplikate mit einem Standardfehler $\leq 0,200$ wurden für die Auswertung mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet. Hierbei wurden zunächst die *Actb*-normalisierten ΔC_t -Werte der einzelnen SK-Mäuse (bei SK/KK) beziehungsweise der L-Tiere (gL/SK, sL/SK) mit dem Mittelwert der verschiedenen Kalibratormäuse (KK bei SK/KK sowie SK bei gL/SK, sL/SK) verrechnet. Die so berechneten Ratio-Werte ($\Delta\Delta C_t$ -Werte) wurden für die Darstellung in den Diagrammen in Prozentwerte umgewandelt.

2.8 *Western Blot*

Die aus dem Hippokampus-Gewebe isolierten Proteine (siehe Kapitel 2.5.2) wurden im Rahmen einer Kooperation am Institut für Pathobiochemie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz im *Western Blot* gemäß den Beschreibungen in Gamerding *et al.* (2006) durchgeführt.

Hierbei wurden 15 μg Total-Protein für die *SDS-PAGE* eingesetzt und anschließend auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Die Inkubation der Membranen mit primären Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C in Phosphat-Puffer mit 0,05% (*v/v*) *Tween20* (Roth, Karlsruhe, Deutschland). Danach erfolgte eine 1,5-stündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper der Meerrettich-Peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, PA, USA). Die Detektion der Signale erfolgte mit der *Super Signal Enhanced Chemiluminescence Procedure* (Pierce, Rockford, IL, USA) und dem Fuji LAS-3000 Chemilumineszenzer (Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland). Für diese Studie wurden folgende Antikörper verwendet: polyklonaler Tau-5-Antikörper (1:1000; Invitrogen BioSource™, Carlsbad, USA), Serine/Threonine Protein Phosphatase 1

γ 1-Antikörper (P7609, 1:1000; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), polyklonaler BDNF-Antikörper (N-20, 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA), polyklonaler CREB NT-Antikörper (06-863, 1:500; Upstate Biotechnology, Hamburg, Deutschland), polyklonaler phospho(Ser133)-CREB-Antikörper (06-519, 1:500; Upstate Biotechnology, Hamburg, Deutschland) und polyklonaler Aktin-Antikörper (A5060, 1:1000; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland).

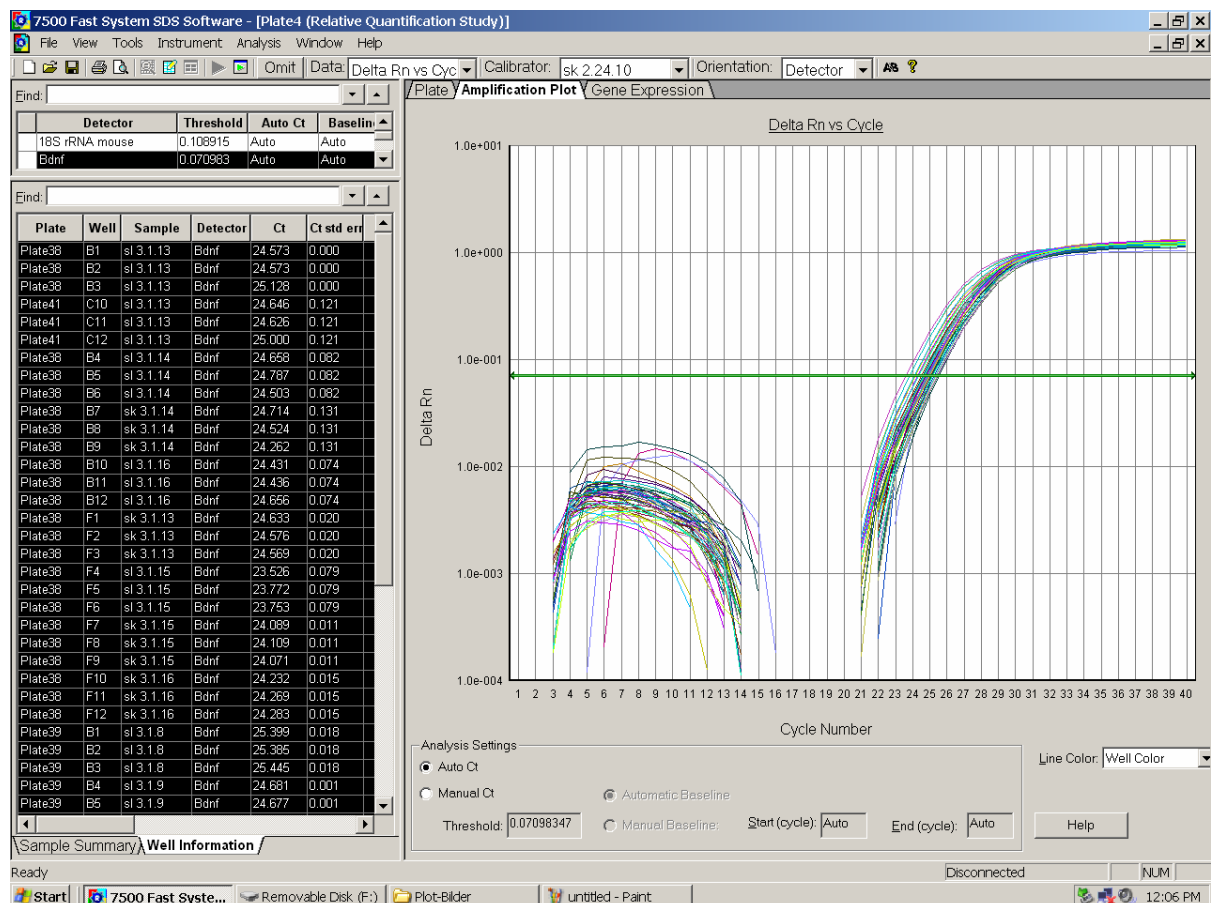


Abbildung 2.9: Ct-Werte und Amplifikationskurven.

Dargestellt sind die qPCR-Amplifikationskurven des 92 bp großen *Bdnf*-Produkts sowie der automatisch generierte Schwellenwert (grüne Linie), der als Ct-Wert für die weitere Analyse Verwendung findet. In der Tabelle sind die Einzelwerte sowie der Standardfehler verschiedener Triplikate zu einigen Hippokampus-Proben von Lernmäusen und Schwimmkontrollen des Zeitpunktes 3-1 dargestellt.

2.9 Statistik

Lernverhalten

Mit dem *EthoVision*-Programm (Version 2.3.19, Noldus Information Technology, Wageningen, Niederlande) wurden zu den Lerntagen 1-4 die Lernparameter „Latenz“, „geschwommene Strecke“ und „mittlerer Abstand zur Plattform“, zum *Probe Trial* die Gedächtnisparameter „Latenz“, „Aufenthalt in Zielquadrant“ und „Zahl der Überquerungen der Plattformzone“ sowie zum ersten Durchlauf an Tag 1 die „Geschwindigkeit“ ermittelt.

Der Lernerfolg der Tiere wurde mit dem gepaarten *t*-Test mittels der *SPSS 3.0-Software* (SPSS GmbH, München, Deutschland) überprüft, indem die Lernleistungen zwischen den aufeinander folgenden Lerntagen (Latenz-Mittelwerte der jeweils vier Durchläufe) miteinander verglichen wurden (Abbildungen 3.1.2 und 3.1.4).

Der statistische Vergleich der Geschwindigkeit der Tiere der verschiedenen Versuchsgruppen im ersten *MWM*-Durchlauf (Abbildungen 3.1.1 und 3.1.5) erfolgte mit dem unabhängigen *t*-Test.

Auch wurden die Unterschiede im *Probe Trial* zwischen guten Lernern (gL) und Schwimmkontrollen (SK) (Abbildung 3.1.3) sowie zwischen guten (gL) und schlechten Lernern (sL) (Abbildung 3.1.6) mit dem unabhängigen *t*-Test überprüft.

Zur Klassifizierung der beiden Gruppen „gute“ und „schlechte Lerner“ wurde eine Clusterzentrums-Analyse für zwei Cluster durchgeführt. Die Unterschiedlichkeit der beiden Gruppen wurde anschließend über eine Varianzanalyse (*ANOVA* mit $F(1,197) = 971,78$; $p < 0.0001$) auf ihre statistische Signifikanz hin verifiziert. Hierbei wurden die Ergebnisse zu dem Parameter „Latenz“ verwendet, wobei ausschließlich jene Mäuse analysiert wurden, die den *MWM*-Test mindestens zwei Tage lang absolvierten. Da an *MWM*-Tag 1 ein mögliches zufälliges Erreichen der Plattform die tatsächliche Lernleistung eines Tieres verfälscht, wurde auf eine die Lernleistung betreffende Bewertung der „Tag 1-Mäuse“ verzichtet.

Microarray

Der statistische Vergleich der mit den verschiedenen Farbstoffen erzeugten Signale (Kapitel 3.2) erfolgte mit dem nichtparametrischen *Mann-Whitney U*-Test.

Zur Identifikation gleichartig regulierter Gene wurde am IMBEI eine Clusteranalyse (Datta und Datta 2006) durchgeführt (Abbildungen 3.3.2 und 3.3.3). Hierbei wurde der Algorithmus „*Complete Linkage* mit Verwendung der euklidischen Distanz“ verwendet. Für die Erstellung der Cluster wurden jeweils die Gene verwendet, die an mindestens einem Zeitpunkt ein $p < 0,05$ (siehe nächster Ansatz) sowie eine 1,5-fache Hoch- beziehungsweise Herunterregulation zeigten.

Die acht einem Gen zugehörigen *Spots* wurden in den beiden Testgruppen gute Lerner und Schwimmkontrollen mit dem nichtparametrischen *Mann-Whitney U*-Test am IMBEI auf die statistische Signifikanz der Unterschiede untersucht (Tabellen 3.4 und 5).

Real-Time PCR

In der Genexpressionsstudie in der quantitativen *Real-time PCR* wurden die *Actb*-normalisierten ΔCt -Werte der verschiedenen Testgruppen (gL, sL, SK, KK) mittels des nichtparametrischen *Mann-Whitney U*-Tests auf die statistische Signifikanz der Unterschiede untersucht (Kapitel 3.4).

Western Blot

Die statistische Analyse der *Western Blot*-Daten (gL, sL) erfolgte am Institut für Pathobiochemie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz mit dem *Student's t*-Test (Kapitel 3.5).

3.1. Analyse des Lernverhaltens

3.1.1 Lernverhalten der wildtypischen FVB/NxC57Bl/6-Mäuse

Das Lernverhalten der FVB/NxC57Bl/6-Mäuse wurde in der *Morris Water Maze* mit dem Parameter „Latenz“ gemessen. Die beiden Lernparameter „geschwommene Distanz“ und „durchschnittlicher Abstand“ zur Plattform lieferten analoge Ergebnisse, so dass für die weitere, hier in diesem Kapitel dargestellte Analyse der Lernleistungen der erstgenannte Parameter herangezogen wurde.

Tabelle 3.1: Anzahl der in der MWM getesteten Lernmäuse.

Dargestellt sind die Fallzahlen der MWM-getesteten Lernmäuse (L) pro untersuchten Zeitpunkt nach Unterscheidung der FBZ-behandelten und nicht-FBZ-behandelten Tiere. In Klammer sind die schlechten Lerner (sL) angezeigt, vor der Klammer die Gesamtzahl der L-Mäuse zum jeweiligen Zeitpunkt.

		Tag1			Tag2			Tag3			Tag4			Tag5			
		1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	
04	mit FBZ	4	4	4	6(6)	4(2)	3(2)	6(3)	4(3)	5(1)	6(2)	4	6(2)	6(3)	6(3)	2	
05-07	ohne FBZ	12	15	10	8	8(1)	7(2)	10(1)	8	4(1)	6	6(1)	5	4	5	6	
	Σ	Σ	16	19	14	14(6)	12(3)	10(4)	16(4)	12(3)	9(2)	12(2)	10(1)	11(2)	10(3)	11(3)	8
	Σ ges	184															

Hierbei galt es zunächst, die Vergleichbarkeit der beiden MWM-Gruppen Lernmäuse (L, Tabelle 3.1) und Schwimmkontrollen (SK) zu bestimmen. Hierfür wurde der Parameter „Geschwindigkeit der Mäuse im ersten MWM-Durchlauf“ verwendet, der als Maß für Motivation und Lokomotion der Tiere gilt (Abbildung 3.1.1). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen L-Mäuse (23 ± 0 cm/sek) und SK-Mäuse (22 ± 0 cm/sek) gefunden.

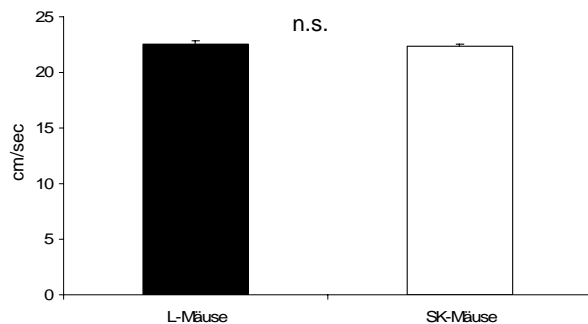


Abbildung 3.1.1: Geschwindigkeit der FVB/NxC57Bl/6-Mäuse.

Dargestellt ist die durchschnittliche „Geschwindigkeit“ (cm/sek) \pm Standardfehler der Lernmäuse (L) und der entsprechenden Schwimmkontrollen (SK) im ersten Durchlauf am ersten Trainingstag (je $n=150$).

Die für diese Studie verwendeten Mäuse zeigten eine für Wildtypmäuse typische Lernkurve (Abbildung 3.1.2). Die Tiere zeigten einen signifikanten Lernzuwachs von Tag 1 ($80 \text{ s} \pm 2 \text{ sek}$, $n=175$) zu Tag 2 ($49 \pm 2 \text{ sek}$, $n=136$, $p \leq 0,001$) sowie von Lerntag 2 zu Tag 3 ($31 \pm 2 \text{ sek}$, $n=99$, $p \leq 0,001$), jedoch nicht zwischen den Trainingsblocks 3 und 4 ($26 \pm 2 \text{ sek}$, $n=62$, n.s.). In der in Abbildung 3.1.2A dargestellten Lernkurve ist zu erkennen, dass bei Lerntag 4 eine Art Plateau war, ab dem keine signifikante Verbesserung der Lernleistung mehr erwartet wurde.

In der nach einzelnen Durchläufen aufgetrennten Lernkurve in Abbildung 3.1.2B ist zu erkennen, dass eine signifikante Verbesserung im *MWM*-Test zwischen den Trainingsläufen tr4 ($72 \pm 3 \text{ sek}$, $n=175$) und tr5 ($52 \pm 4 \text{ sek}$, $n=136$, $p \leq 0,001$), tr8 ($49 \pm 4 \text{ sek}$, $n=136$,) und tr9 ($31 \pm 4 \text{ sek}$, $n=99$, $p \leq 0,001$) sowie zwischen tr12 ($34 \pm 4 \text{ sek}$, $n=99$) und tr13 ($22 \pm 4 \text{ sek}$, $n=62$, $p \leq 0,01$) festzustellen war. Ein signifikanter Lernzuwachs wurde also vor allem nach dem langen, eine Schlafperiode beinhaltenden Intervall zwischen den Lernblöcken beobachtet. Eine Ausnahme bildete die Verbesserung zwischen den Durchläufen tr2 ($84 \pm 3 \text{ sek}$) und tr3 ($74 \pm 3 \text{ sek}$, $p \leq 0,01$) innerhalb des ersten Trainingsblocks. Im Gegensatz zu den Lerntagen 2, 3 und 4 verbesserten sich die Mäuse nur an Lerntag 1 zwischen dem jeweils ersten und letzten Durchlauf ($p \leq 0,001$).

Die Lern- und Schwimmkontrollmäuse zeigten die erwarteten Unterschiede im Gedächtnistest (*Probe Trial*, pt, Abbildung 3.1.3) am fünften Trainingstag. So benötigten die Kontrollmäuse ($46 \text{ s} \pm 9 \text{ sek}$) eine signifikant längere Zeit zum Erreichen der Plattformzone als die Lernmäuse (Abbildung 3.1.3A, $14 \pm 5 \text{ sek}$, $p \leq 0,01$). Auch schwammen die L-Mäuse (Abbildung 3.1.3B, $43 \pm 3 \%$) längere Zeit im Zielquadrant als die SK-Mäuse ($35 \pm 2 \%$, $p \leq 0,05$). Ebenso überquerten die L-Tiere (Abbildung 3.1.3C, 7 ± 1) die Plattformzone signifikant häufiger als ihre Kontrollen (3 ± 0 , $p \leq 0,001$).

Die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die FVB/NxC57Bl/6-Hybridmäuse ihre Lernleistung von Trainingstag zu Trainingstag stufenweise verbessern und nach vier Tagen ein maximales Lernniveau erreicht haben.

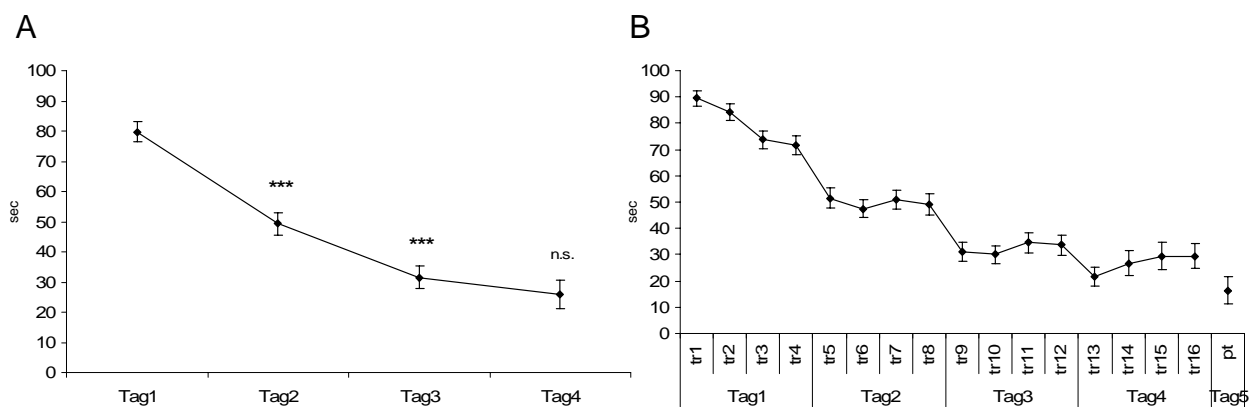


Abbildung 3.1.2: Lernkurven der FVB/NxC57Bl/6-Mäuse.

Jeder Messpunkt repräsentiert die durchschnittliche „Latenz“ in Sekunden zum Erreichen der verborgenen Plattform \pm Standardfehler. Sterne markieren einen signifikanten Lernzuwachs zwischen aufeinander folgenden Lerntagen (A, *** $p < 0,001$).

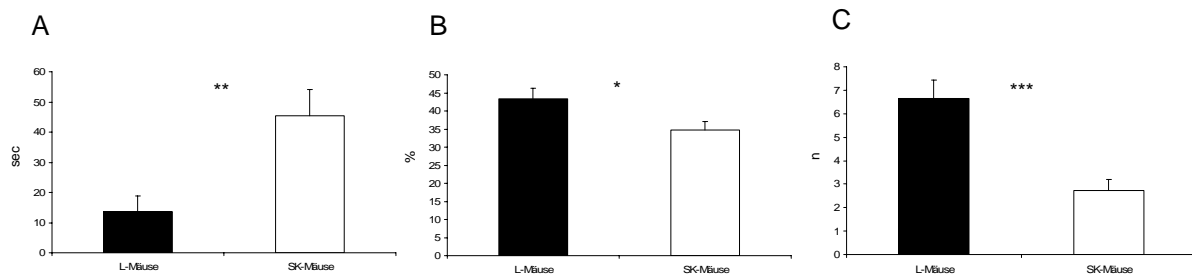


Abbildung 3.1.3: Gedächtnistest der FVB/NxC57Bl/6-Mäuse.

Die Lernmäuse (L, schwarz) zeigten beim Gedächtnistest (*Probe Trial*) bezüglich der drei Parameter „Latenz“ (in sek) (A), „Prozentualer Aufenthalt im Zielquadrant“ (B) sowie bei der „Zahl der Überquerungen der Plattformzone“ (C) signifikante Unterschiede zu den Schwimmkontrollmäusen (SK, weiß) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler innerhalb der jeweiligen Gruppen ($n=27$).

3.1.2 Lernverhalten bei guten und schlechten Lernern

Die in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Lernmäuse (L) wurden in die beiden Gruppen gute (gL) und schlechte (sL) Lerner aufgeteilt (vergleiche Tabelle 3.1), da deutliche individuelle Unterschiede in der Lernleistung beobachtet wurden. Für die Klassifizierung der beiden Gruppen wurde eine Clusteranalyse durchgeführt. Eine Zwei-Wege ANOVA bestätigte dieser Aufteilung.

Bei der Gruppe der guten Lerner wurden signifikante Verbesserungen der Lernleistung zwischen den Lerntagen 1 (75 ± 3 sek, $n=104$) und Tag 2 (35 ± 2 sek, $n=104$, $p \leq 0,001$), von Tag 2 zu Tag 3 (20 ± 2 sek, $n=80$, $p \leq 0,001$) sowie von Tag 3 zu Tag 4 (13 ± 1 sek, $n=51$, $p \leq 0,001$) beobachtet (Abbildung 3.1.4A). Bei dieser Lerngruppe wurden auch Verbesserungen zwischen den Trainingsläufen tr2 (82 ± 4 sek) und tr3 (67 ± 4 sek, $p \leq 0,01$), tr4 (63 ± 5 sek) und tr5 (35 ± 3 sek, $p \leq 0,001$), tr8 (34 ± 3 sek) und tr9 (19 ± 3 sek, $p \leq 0,01$), tr12 (19 ± 2 sek) und tr13 (13 ± 2 sek, $p \leq 0,05$) sowie tr16 (14 ± 3 sek) und dem *Probe Trial* (pt, 7 ± 1 sek, $n=21$, $p \leq 0,05$) gefunden (Abbildung 3.1.4B). Bei dem

Vergleich tr16 versus pt ist zu beachten, dass beim *Probe Trial*, bei dem die Plattform entfernt wurde, das erste Überqueren der Plattformzone detektiert wurde, wobei hier ein zufälliges Überqueren dieser Zone zu unklaren Ergebnissen führen kann.

Im Gegensatz zu den schlechten Lernern zeigten die guten Lerner eine deutliche Verbesserung ihrer Lernleistung innerhalb des ersten Trainingsblocks (tr1 bis tr4, $p \leq 0,001$), während sich die Tiere dieser Gruppe zwischen dem jeweils ersten und letzten Durchlauf der folgenden Lernblöcke (Lerntage) nicht verbesserten.

Die Gruppe der schlechten Lerner zeigte in der *MWM* keine Lernzuwächse zwischen den Lerntagen 1 (104 ± 3 sek, $n=32$) und 2 (96 ± 4 sek, $n=32$, n.s.), 2 und 3 (80 ± 2 sek, $n=16$, n.s.) sowie von Tag 3 zu Tag 4 (87 ± 7 sek $n=11$, n.s.) (Abbildung 3.1.4A). Auch wurde kein Lernzuwachs zwischen aufeinander folgenden Durchläufen festgestellt. Mit Ausnahme des Gedächtnistests (pt) unterschied sich das Lernergebnis zwischen guten und schlechten Lernern an allen *MWM*-Durchläufen (Abbildung 3.1.4B).

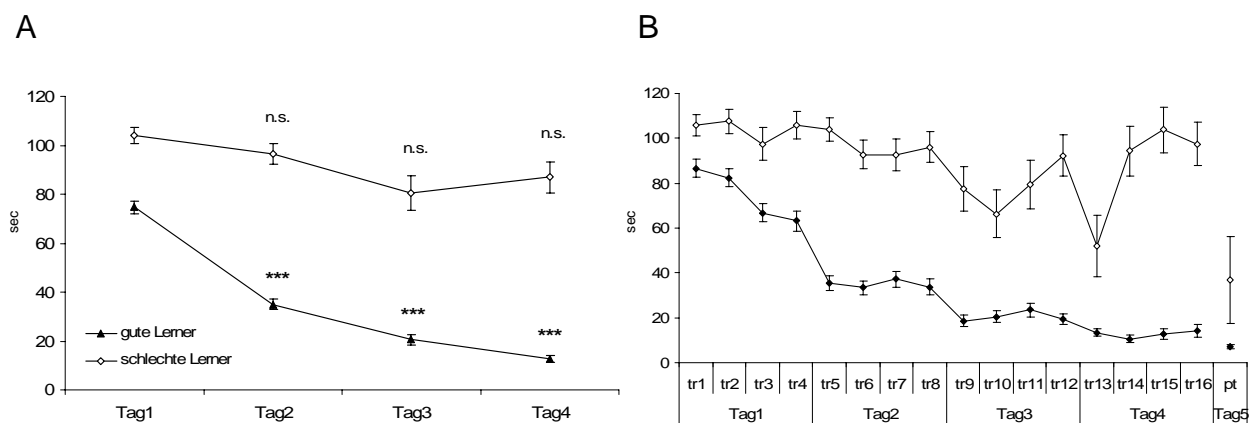


Abbildung 3.1.4: Lernkurven der guten und schlechten Lernern.

Jeder Messpunkt repräsentiert die durchschnittliche „Latenz“ zum Erreichen der verborgenen Plattform (in sek) \pm Standardfehler an aufeinander folgenden Lerntagen (A) beziehungsweise zwischen einzelnen Trainingsläufen (B). Sterne markieren den signifikanten Lernzuwachs zwischen den Lerntagen (A, *** $p < 0,001$).

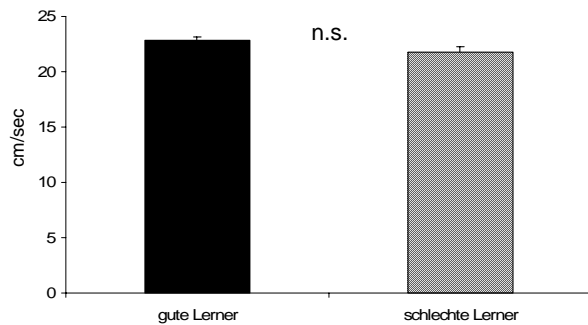


Abbildung 3.1.5: Geschwindigkeit der guten und schlechten Lerner.

Dargestellt ist die durchschnittliche „Geschwindigkeit“ (cm/sek) \pm Standardfehler der beiden Gruppen gute (n=101) und schlechte Lerner (n=21) am ersten Durchlauf an Tag 1 (tr1).

Die beiden Gruppen gute (23 ± 0 cm/sek) und schlechte Lerner (22 ± 1 cm/sek) unterschieden sich nicht bezüglich ihrer Schwimmgeschwindigkeit in der *MWM* (Abbildung 3.1.5). Daher ist ein Vergleich dieser beiden Gruppen bezüglich der Untersuchung ihres unterschiedlichen Lernverhaltens zulässig.

Beim Gedächtnistest wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen guten und schlechten Lernern bezüglich der Parameter „Latenz“ (Abbildung 3.1.4B) und „Aufenthalt im Zielquadrant“ (Abbildung 3.1.6A; gL, 45 ± 3 %; sL, 35 ± 7 %, n.s.) gefunden. Im Gegensatz dazu wurde bei der „Zahl der Überquerungen der Plattformzone“ während des 90 Sekunden dauernden Gedächtnistests ein signifikanter Unterschied detektiert (Abbildung 3.1.6B; gL, 8 ± 1 ; sL, 2 ± 1 , $p \leq 0,001$).

Als zusammenfassende Aussage wurde festgestellt, dass sich innerhalb desselben Mausstammes zwei lernleistungsabhängige Gruppen bilden lassen, die sich deutlich in ihrem Lernverhalten in der *MWM* unterscheiden.

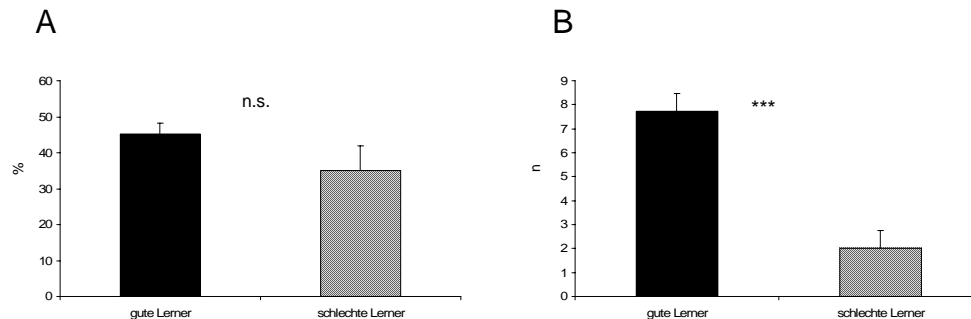


Abbildung 3.1.6: Gedächtnistest bei guten und schlechten Lernern.

Es sind die Auswertungen zu den Parametern „Prozentualer Aufenthalt im Zielquadrant“ (A) sowie „Zahl der Überquerungen der Plattformzone“ (B) dargestellt. Die Sterne zeigen den signifikanten Unterschied (***) $p < 0,001$ zwischen den Gruppen gute ($n=22$) und schlechte Lerner ($n=5$), die Fehlerbalken den Standardfehler.

3.2 Ein methodischer Vergleich: Die Farbstoffe *Cy3/Cy5*, *AA-Cy3/Cy5* und *Alexa555/647*

Als Maß für die Auswertbarkeit eines *Spots* wurde die absolute Intensität des *Microarray*-Signals (>500) sowie das Verhältnis von *Spot*- zu Hintergrundsignal ($Spot > 3 \cdot \text{Hintergrund}$) angesehen (siehe Kapitel 2.6.4). Bei Verwendung dieser beiden Qualitätskriterien wurden bei *Cy3/Cy5* durchschnittlich $81,9 \pm 2,6$ % der *Spots* pro Genchip als auswertbar erachtet. Beim *Alexa*-Farbstoff blieben $74,8 \pm 1,9$ %, bei der *AA*-Variante $63,6 \pm 1,5$ % der *Spots* nach dieser Qualitätskontrolle für die weitere Auswertung übrig (Abbildung 3.2.1). Die Genchips mit dem *Cy3/Cy5*-Farbstoff lieferten demnach signifikant mehr auswertbare *Spots* als *Alexa* ($p \leq 0,001$) sowie *AA* ($p \leq 0,05$).

Entsprechend lag die durchschnittliche Signalintensität aller *Spots* bei *Cy3/Cy5* (*Cy3*, $4638,8 \pm 376,6$; *Cy5*, $4814,5 \pm 341,6$) signifikant über dem *Alexa*-Farbstoff (*555*, $3589,0 \pm 155,4$, $p \leq 0,05$; *647*, $3634,5 \pm 171,6$, $p \leq 0,001$), jedoch nicht signifikant über der Markierung über *AA*-Esterbindungen (*AA-Cy3*, $3167,85 \pm 61,78$, n.s.; *AA-Cy5*, $2815,34 \pm 75,31$, n.s.) (Abbildung 3.2.2).

Um die verschiedenen Signalintensitäten innerhalb eines Genchips zu quantifizieren, wurden die Signale in Intervalle eingeteilt und ausgezählt (Abbildung 3.2.3). Hierbei zeigte sich, dass bei niedrigen Signalintensitäten (<2000) die beiden Farbstoffe *Alexa* und *AA* relativ dominierten, während Signale >3000 verstärkt mit *Cy3/Cy5* erzeugt werden konnten (Abbildung 3.2.3). Hierbei sei erwähnt, dass alle Hybridisierungen mit dem gleichen Protokoll (siehe Kapitel 2.6.3) durchgeführt wurden. Auch die *cDNA*-Synthese mit dem Einbau von *Cy3/Cy5* beziehungsweise *Alexa555/647* erfolgte nach identischem Protokoll (siehe Kapitel 2.6.2). Den Vergleich der beiden Farbstoffe *Alexa* und *Cy3/Cy5* bezüglich ihrer Präsenz in den verschiedenen Intensitätsintervallen zeigen die Abbildungen 3.2.3B und D.

Anschließend wurde die Streuung der Signalwerte innerhalb des Genchips untersucht. Der Variationskoeffizient war bei *Alexa* (555, $0,74 \pm 0,02$; 647, $0,82 \pm 0,02$) signifikant geringer als bei den beiden anderen Farbstoffen (*Cy3*, $1,58 \pm 0,07$ $p \leq 0,001$; *Cy5*, $1,42 \pm 0,05$, $p \leq 0,001$; *AA-Cy3*, $1,57 \pm 0,14$, $p \leq 0,001$; *AA-Cy5*, $2,07 \pm 0,07$, $p \leq 0,001$) (Abbildung 3.2.4).

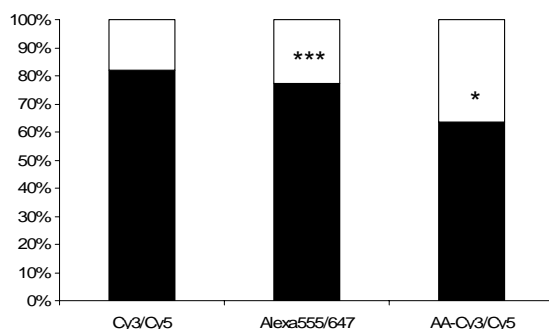


Abbildung 3.2.1: Auswertbare Signale.

Es ist der durchschnittliche prozentuale Anteil der auswertbaren *Spots* (schwarz) bei den drei Farbstoffkombinationen *Cy3/Cy5* ($n=44$), *Alexa555/647* ($n=72$) und *AA-Cy3/-Cy5* ($n=2$) dargestellt. Als Qualitätsmerkmal dienten hierbei die beiden Schwellenwerte „*Spot-Signal*>500“ sowie „*Spot-Signal*>3*Hintergrund-Signal“. Die Sterne markieren den signifikanten Unterschied zum *Cy3/Cy5*-Farbstoff (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

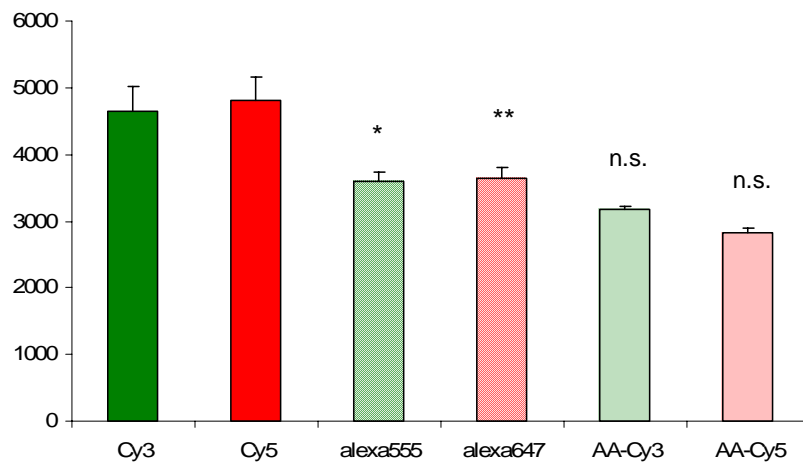


Abbildung 3.2.2: Signalintensität der *Microarray*-Rohdaten.

Es sind die durchschnittlichen Signalintensitäten aller *Spots* dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler zwischen den Mittelwerten der hybridisierten Genchips (Cy3/Cy5, n=44; Alexa555/647, n=72; AA-Cy3/Cy5, n=2). Sterne markieren den signifikanten Unterschied zwischen den jeweiligen Rot- und Grün-Signalen des Cy3/Cy5-Farbstoffes zu den Signalen der beiden anderen Farbstoffe (* p<0,05, ** p<0,01).

Um die Variation der mit den Farbstoffen Cy3/Cy5 und Alexa555/647 erzeugten Signale innerhalb der einem Gen zugeordneten *Spots* (Signalwerte) zu bestimmen, wurde die Streuung innerhalb der jeweils acht *Spots* der beiden Gene *Bdnf* (RZPD-Nr. 3a1) und *mt-Cytb* (2a5) analysiert. Während *Bdnf* in *Microarray* und *qPCR* keine Regulation der normalisierten Ratio-Werte zeigte, wurden die mitochondrialen Gene wie zum Beispiel *mt-Cytb* lernabhängig reguliert (siehe Kapitel 3.3). Die acht einem Gen zugeordneten Signalwerte bezogen sich jeweils auf dieselbe *mRNA*, vier mit dem grünen (Cy3 oder Alexa555) und vier mit dem reversen roten Farbstoff (Cy5 oder Alexa647) markiert. Der Alexa-Farbstoff zeigte bei beiden Genen einen niedrigeren Variationskoeffizienten (*Bdnf*, $0,41 \pm 0,03$; *mt-Cytb*, $0,31 \pm 0,02$) als die Cy3/Cy5-Kombination (*Bdnf*, $0,49 \pm 0,03$, $p \leq 0,05$; *mt-Cytb*, $0,40 \pm 0,03$, $p \leq 0,01$) (Abbildung 3.2.5).

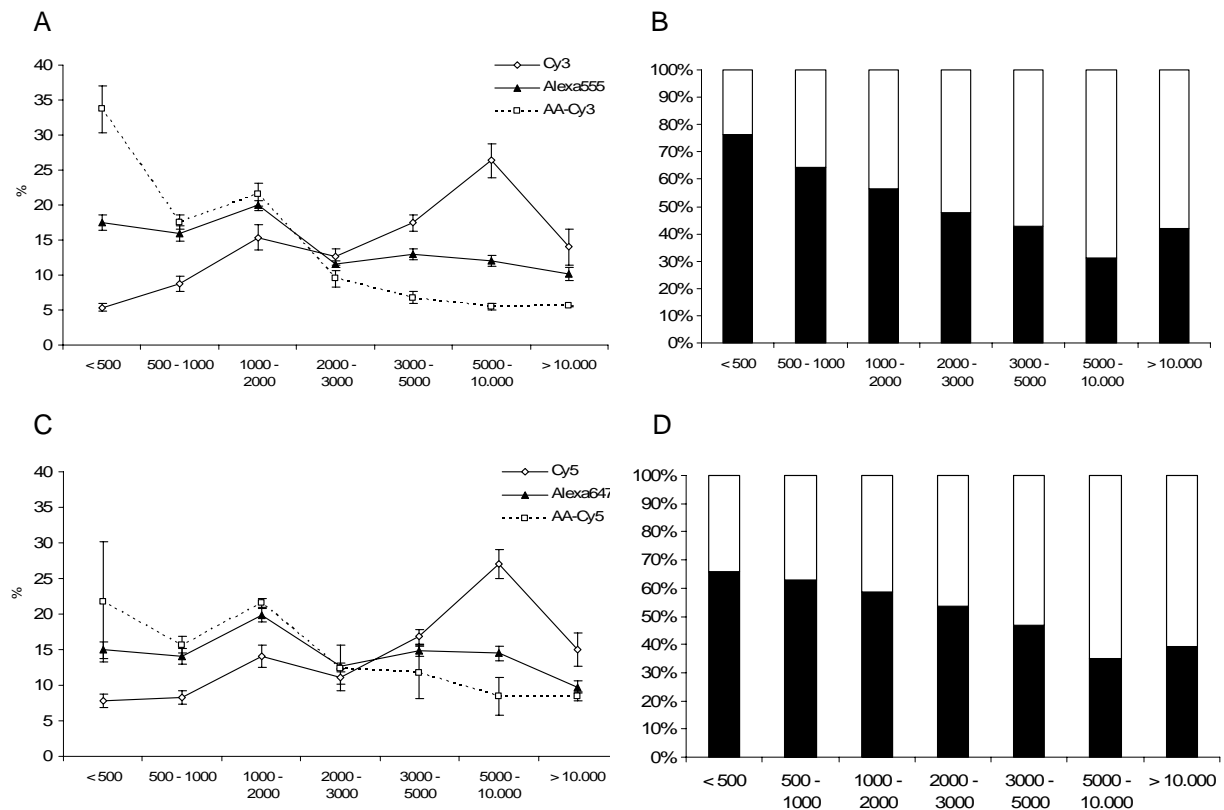


Abbildung 3.2.3: Signalstärke in verschiedenen Signalintensitätsfenstern.

In (A) und (C) sind die mit den Farbstoffkombinationen Cy3/Cy5 (n je Farbstoff = $44 \cdot 2880 = 126.720 \text{ Spots}$), Alexa555/647 (n je Farbstoff = $72 \cdot 3840 = 276.480 \text{ Spots}$) und AA-Cy3/Cy5 (n je Farbstoff = $2 \cdot 6144 = 12.288 \text{ Spots}$) erzeugten Signale nach Intensitätsintervallen aufgeteilt dargestellt. Hierzu wurde deren prozentuale Verteilung in den jeweiligen Signalstärken berechnet. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der pro Intensitätsfenster ausgezählten Spots zwischen den verschiedenen Genchips.

In (B) ist die relative Verteilung der beiden Farbstoffe Alexa555 (schwarz) und Cy3 (weiß), in (D) die von Alexa647 (schwarz) und Cy5 (weiß) in den verschiedenen Signalintensitätsfenstern dargestellt.

Beim Vergleich der drei Farbstoffvarianten wurde festgestellt, dass der Cy3/Cy5-Farbstoff signifikant stärkere Signale lieferte als die beiden anderen Farbstoffe. Die mit dem Alexa555/647 durchgeführten *Microarrays* zeigten jedoch signifikant geringere Variationen vor allem zwischen den beiden reversen Signalen derselben mRNA-Probe als der Cy3/Cy5-Farbstoff. Entsprechend wurde in der vorliegenden Studie zur lernabhängigen Genregulation (Kapitel 3.3) der Alexa555/647-Farbstoff verwendet.

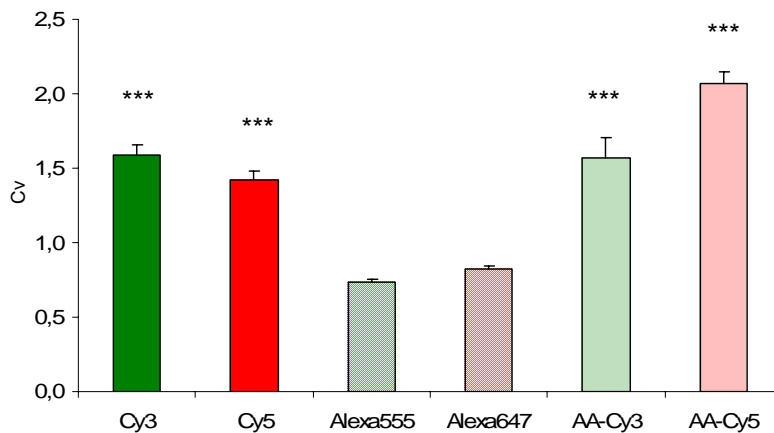


Abbildung 3.2.4: Variation der *Microarray*-Rohdaten.

Die Streuung der Signalwerte aller *Spots* eines Genchips ist hier für verschiedene Farbstoffe dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler der Variationskoeffizienten der verschiedenen Genchips. Sterne markieren den signifikanten Unterschied zwischen den Rot- und Grün-Signalen des *Alexa*-Farbstoffes (je $n=72$) zu den Signalen der Farbstoffe *Cy3/Cy5* (je $n=44$) und *AA-Cy3/Cy5* (je $n=2$) (***) ($p < 0,001$).

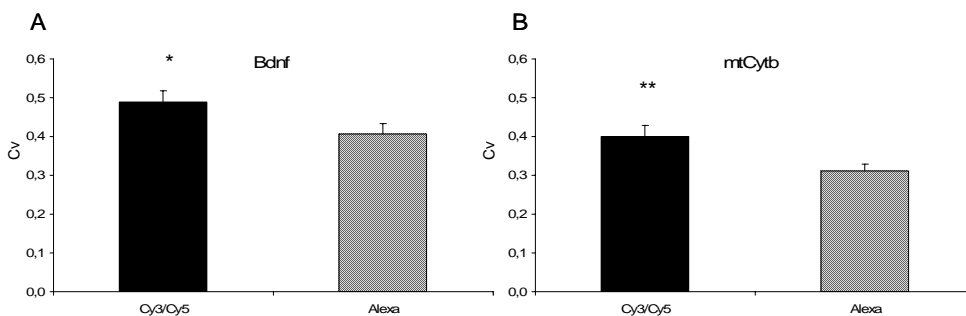


Abbildung 3.2.5: Variation der der *Microarray*-Rohdaten von *Bdnf* und *mt-Cytb*.

Der Ratio-Wert eines Gens wird aus vier *Cy3*- beziehungsweise *Alexa555*- sowie vier *Cy5*- beziehungsweise *Alexa647*-Signalwerten gebildet. Die Streuung der Signalwerte aller acht *Spots* ist hier für die Gene *Bdnf* und *mt-Cytb* dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler zwischen den jeweiligen, aus 8 *Spots* errechneten Variationskoeffizienten, Sterne markieren den signifikanten Unterschied zwischen *Cy3/Cy5* ($n=44$) und *Alexa* ($n=72$) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

3.3 Detektion lernrelevanter Gene im Alexa-Microarray

Um lernrelevante Gene zu identifizieren, wurde mit einem 776 verschiedene *EST*-Sequenzen enthaltenden Genchip die Genexpression im Hippokampus von guten Lernern (gL) im Vergleich zu gepaarten Schwimmkontrollen (SK) untersucht. Die lernabhängige Genregulation wurde während eines fünftägigen *MWM*-Trainings jeweils eine, sechs und 24 Stunden nach dem letzten *MWM*-Durchlauf an den Lerntagen 1, 2, 3 und 4 sowie nach dem Gedächtnistest an Tag 5 gemessen.

Mit dem in Kapitel 2.6.4.2 beschriebenen Farbkode wurden zunächst die mit dem räumlichen Lernen assoziierte Regulation von Genen beurteilt (Abbildung 5 im Anhang). Hierbei zeigten die mitochondrialen Gene der Atmungskette (Abbildungen 1.4 und 1.5), *mt-Nd1* (Komplex I, NADH-Dehydrogenase, Untereinheit 1), *mt-Nd6* (Komplex I, NADH-Dehydrogenase, Untereinheit 6), *mt-Cytb* (Komplex III, Cytochrom B) und *mt-CO1* (Komplex IV, Cytochrom C-Oxidase, Untereinheit 1), eine gleichartige Bewertung ihrer Regulation im Hippokampus der guten Lerner (Abbildung 3.3.1). Auch die mit dem Genchip untersuchten technischen Replikate, die jeweils verschiedenen *PCR*-Produkte der identischen Gensequenz von *mt-CO1* (*cDNA*-Klon 8f4) und *mt-Nd1* (7a3) sowie der beiden verschiedenen Sequenzen von *mt-Cytb* (2a5 und 8a5), zeigten jeweils ähnliche Regulationen. Es sei jedoch erwähnt, dass der *cDNA*-Klon 2a4 von *mt-Cytb* keine lernassoziierte Regulation zeigte (siehe Abbildung 5).

Zusätzlich zu dieser Auswertung mit dem Farbkode wurden mit einer Clusteranalyse gleichartig regulierte Gene während des viertägigen *MWM*-Lernens (Abbildung 3.3.2 und Tabelle 3.2) sowie während des gesamten fünftägigen *MWM*-Trainings (Abbildung 3.3.3 und Tabelle 3.3) detektiert. In beiden *Heat Maps* wurden jeweils die mitochondrialen Gene im gleichen Untercluster detektiert. In beiden Fällen war diesen Unterclustern das Gen *Timm8a1* zu finden, das für die Translokase 8a1 der inneren Mitochondrienmembran kodiert. Die Translokase-Gene *Timm13*, *Timm8b* und *Timm17a* wurden zusammen mit dem nukleär kodierten Gen *Cox8a* der Cytochrom C-Oxidase-Untereinheit 8a in einem benachbarten Untercluster detektiert (Tabellen 3.2 und 3.3).

Genkürzel	RZPD-Nr.	Tag 1			Tag 2			Tag 3			Tag 4			Tag 5		
		1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h
mt-CO1	8f4			↓	↑		↑			↑	↑		↓	↑↑	↑	
mt-CO1	8f4			↓	↑		↑			↑	↑		↓	↑		
mt-Cytb	2a4															
mt-Cytb	2a5			↓	↑		↑			↑	↓	↓	↓	↑↑		
mt-Cytb	8a5		↑		↑		↑			↑	↑		↓	↑↑		
mt-Nd1	7a3		↑	↓				↓		↑			↓	↑↑		
mt-Nd1	7a3		↑							↑	↑		↓	↑↑		
mt-Nd6	2a7						↑			↑	↑		↓	↑↑↑		

Abbildung 3.3.1: Farbkode zu den mitochondrialen Genen der Atmungskette.

Die acht Signalwerte zu jedem gespotteten *PCR*-Produkt wurden mit einem Farbkode bewertet (siehe Kapitel 2.6.4.2). Von den *cDNA*-Klonen 8f4 (*mt-CO1*) und 7a3 (*mt-Cytb*) wurden zwei verschiedene *PCR*-Produkte der identischen Gensequenz auf den Genchip gespottet. Gelbe und Rote Farbtöne deuten eine Hoch-, blaue Farbtöne eine Herunterregulation an, weiß zeigt ein nicht reguliertes Gen an. Die Farbtönung (von hell nach dunkel) sowie die zunehmende Anzahl der Pfeile symbolisiert die gesteigerte Qualität der Beurteilung der Genregulation (Abbildungen 2.7 und 2.8). Hierbei bedeuten die Pfeile eine eindeutige Bewertung der Hoch- beziehungsweise Herunterregulation.

Um die Signifikanz der detektierten Ratio-Werte zu bestimmen wurden für jedes Gen die acht Signalwerte der guten Lerner mit denen der Schwimmkontrollen verglichen (Tabelle 4 im Anhang) verglichen. Für die Atmungsketten-Gene *mt-Nd1*, *mt-Nd6*, *mt-Cytb*, *mt-CO1* und *Cox8a* sowie für die mitochondrialen Translokase-Gene *Timm8a*, *Timm8b* und *Timm13* wurden zu mehreren Zeitpunkten während des *MWM*-Lernens signifikante Unterschiede gemessen. Es wurden signifikante Regulationen dieser Gene zu den Zeitpunkten 1-6 (*Cox8a*, $p \leq 0,05$), 2-1 (*mt-CO1*, $p \leq 0,01$, *mt-Cytb*, $p \leq 0,05$, *mt-Nd1*, $p \leq 0,05$, *Timm8a1*, $p \leq 0,05$ und *Timm13*, $p \leq 0,05$), 2-6 (*Timm8b*, $p \leq 0,05$), 2-24 (*Cox8a*, $p \leq 0,01$, *mt-Cytb*, $p \leq 0,05$, *mt-Nd1*, $p \leq 0,01$ und *Timm8a1*, $p \leq 0,05$), 3-1 (*mt-CO1*, $p \leq 0,05$), 3-6 (*mt-Nd6*, $p \leq 0,05$), 3-24 (*Cox8a*, $p \leq 0,01$, *mt-Cytb*, $p \leq 0,05$, *mt-Nd1*, $p \leq 0,001$, *mt-Nd6*, $p \leq 0,001$, *Timm8a1*, $p \leq 0,001$ und *Timm8b*, $p \leq 0,01$), 4-1 (*Cox8a*, $p \leq 0,001$, *mt-Cytb*, $p \leq 0,01$, *mt-Nd1*, $p \leq 0,001$, *mt-Nd6*, $p \leq 0,001$ und *Timm13*, $p \leq 0,001$), 4-6 (*Cox8a*, $p \leq 0,001$, *mt-Cytb*, $p \leq 0,05$, *mt-Nd1*, $p \leq 0,05$, *Timm8a1*, $p \leq 0,01$ und *Timm8b*, $p \leq 0,05$), 4-24 (*Cox8a*, $p \leq 0,01$), 5-6 (*mt-CO1*, $p \leq 0,01$, *mt-Cytb*, $p \leq 0,001$, *mt-Nd1*, $p \leq 0,001$, *mt-Nd6*, $p \leq 0,001$ und *Timm8a1*, $p \leq 0,001$) und 5-24 (*mt-CO1*, $p \leq 0,001$, *mt-Cytb*, $p \leq 0,001$, *mt-Nd1*, $p \leq 0,01$, *mt-Nd6*, $p \leq 0,01$, *Timm8a1*, $p \leq 0,001$ und *Timm8a1*, $p \leq 0,05$) gefunden (Tabelle 3.4).

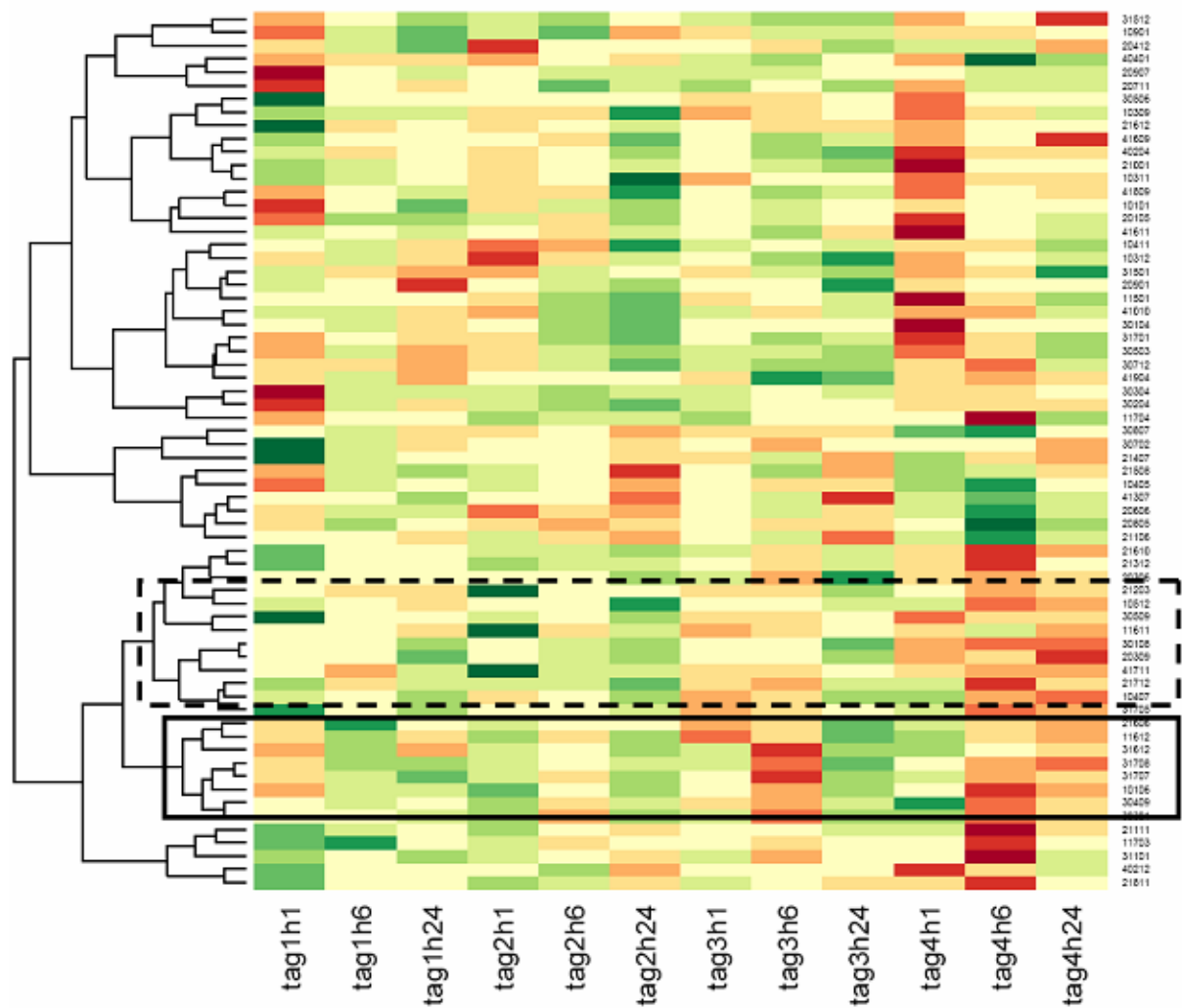


Abbildung 3.3.2: Clusteranalyse für die Tage 1-4.

Die rechts neben dem *Cluster* angezeigten *Spot-IDs* sind in Tabelle 3.2 den RZPD-Nummern sowie den Genkürzeln zugeordnet. Eingerahmte Untercluster beinhalten Gene von Proteinen der Atmungskette sowie von mitochondrialen Translokasen. Rötliche Farbtöne zeigen eine Hoch-, grünliche Farbtöne eine Herunterregulation in den 12 untersuchten Zeitpunkten während des *MWM*-Trainings an. Das Dendrogramm im linken Bereich des Diagramms stellt den „Verwandtschaftsgrad“ der Gene bezüglich ihrer Regulation während des viertägigen *MWM*-Trainings dar.

Tabelle 3.2: Gene der Clusteranalyse in Abbildung 3.3.2.

Die mit der Clusteranalyse in Abbildung 3.3.2 identifizierten gleichartig regulierten Gene sind hier von oben nach unten und in Untercluster gruppiert aufgelistet. Die Sequenz der kursiv dargestellten Gene *Apoa2*, *Met* sowie *Grm8* wurde nicht verifiziert. Mit durchgezogener Linie ist das Untercluster eingerahmt, das die mitochondrialen Gene der Atmungskette (*mt-Nd1*, *mt-Cytb* und *mt-CO1*) sowie die mitochondriale Translokase *Timm8a1* beinhaltet. Mit gestrichelter Linie sind die nukleär kodierten Gene eingerahmt, deren Proteine in die innere Mitochondrienmembran (*Cox8a* der Atmungskette, Translokase-Gene *Timm8b* und *Timm13*) der eingebaut werden. Die vollständigen Namen zu den dargestellten Genkürzeln sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Spot-ID	RZPD-Nr.	Genkürzel	Spot-ID	RZPD-Nr.	Genkürzel	Spot-ID	RZPD-Nr.	Genkürzel
31512	6d4	Gabre	30304	8g2	Mtap1b	21606	10d2	Nos2
10901	2b5	Igtp	30204	5d5	2610041P16Rik	11612	7a3	mt-Nd1
20412	2a6	Psg29	11704	8b12	Casp4	31612	7a2	Smek1
40401	7f5	Egf				31708	7b10	Dusp5
20907	3f6	Pkia	30807	3c10	Map2k3	31707	7a3	mt-Nd1
20711	4b11	Tomm40	30702	3b7	Cib1	10106	3d10	Timm8a1
			21407	8c2	Tcf3	30409	2a5	mt-Cytb
						30301	8f4	mt-CO1
30506	5h2	Ifngr1	21508	4g8	Map2k4	21111	1b10	Camk2b
10309	4a9	Kcnq1	10405	4g12	Syt15	11703	8b1	Cnr2
21612	7h6	Erf	41307	5c11	Centb5	31101	5h11	Syt7
41609	7b4	Dapk2	20606	2g3	Kcnk4	40212	8f2	Usp4
40204	5e8	Mapk14	20805	3b5	Prkcz	21811	10d8	Cnr2
21001	6a11	Hecw1	21106	5a7	Map2k7			
10311	4c3	Kcnmb1						
41809	8f11	Thra	21610	7c4	Cst3			
10101	3b1	Prkcsh	21312	10e2	Pde8b			
20105	7f1	<i>Apoa2</i>	20306	2c1	Nnat			
41611	7c7	Kcnj4	21203	1e7	Timm8b			
			10512	1g12	Pak1			
10411	2c7	Timp2	30509	1a11	Timm13			
10312	4c6	Kcnn1	11611	7a1	Mapk8			
31501	8d3	Pla2r1	30108	1g5	Tyrobp			
20901	3g7	Rnf44	20309	4d3	Grin3b			
11501	8d4	Ifna	41711	8h8	<i>Met</i>			
41010	5b4	Rps15	21712	7d1	<i>Grm8</i>			
30104	3d3	Gpld1	10407	1h2	Cox8a			
31701	7h9	Tubb6	31705	8c1	Rbp1			
30503	1g5	Tyrobp						
30712	4a2	Ptk9						
41904	6c8	Baiap2						

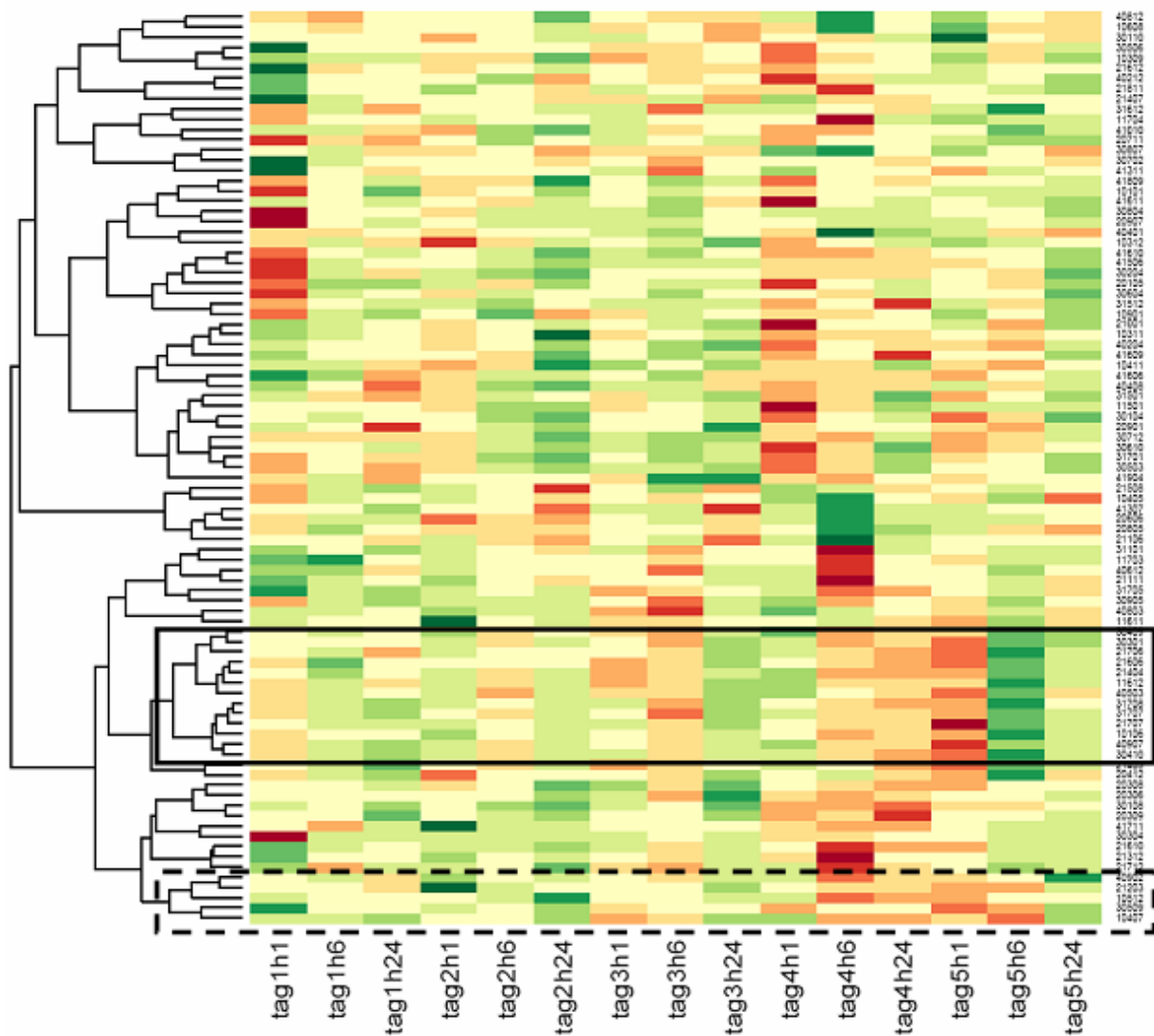


Abbildung 3.3.3: Clusteranalyse für die Tage 1-5.

Die rechts neben dem *Cluster* angezeigten *Spot-IDs* sind in Tabelle 3.3 den RZPD-Nummern sowie den Genkürzeln zugeordnet. Mit einer durchgezogenen Linie ist das Untercluster eingerahmt, das die mitochondrialen Gene der Atmungskette beinhaltet, mit einer gestrichelten Linie Gene von in die innere Mitochondrienmembran eingebauten Proteinen. Rötliche Farbtöne zeigen eine Hoch-, grünliche Farbtöne eine Herunterregulation in den 15 untersuchten Zeitpunkten während des *MWM*-Trainings an. Das Dendrogramm im linken Bereich des Diagramms stellt den „Verwandtschaftsgrad“ der Gene bezüglich ihrer Regulation während des fünftägigen *MWM*-Trainings dar.

Tabelle 3.3: Gene der Clusteranalyse für die Tage 1-5.

Die mit der Clusteranalyse in Abbildung 3.3.1 identifizierten gleichartig regulierten Gene sind hier – in Untercluster gruppiert – aufgelistet. Die Sequenz der kursiv dargestellten Gene *Apoa2*, *Met*, *Grm8* sowie *Timm17a* konnte nicht verifiziert werden, da die Sequenzierung nicht identifizierbare Sequenzen lieferte. Mit durchgezogener Linie ist das Untercluster eingerahmt, das die mitochondrialen Gene der Atmungskette (*mt-Nd1*, *mt-Nd6*, *mt-Cytb* und *mt-CO1*) sowie die mitochondriale Translokase *Timm8a1* beinhaltet. Mit gestrichelter Linie sind die nukleär kodierten Gene eingerahmt, deren Proteine in die innere Mitochondrienmembran (*Cox8* der Atmungskette, Translokase-Gene *Timm8b*, *Timm13* und *Timm17a* der eingebaut werden. Die vollständigen Namen zu den dargestellten Genkürzeln sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Spot-ID	RZPD-Nr.	Genkürzel	Spot-ID	RZPD-Nr.	Genkürzel	Spot-ID	RZPD-Nr.	Genkürzel
40812	3e11	Slc6a13	21001	6a11	Hecw1	30409	2a5	mt-Cytb
10608	2g9	Terf1	10311	4c3	Kcnmb1	30301	8f4	mt-CO1
30110	1f2	Gabrq	40204	5e8	Mapk14	21706	7a2	Smek1
30506	5h2	Ifngr1	41609	7b4	Dapk2	21606	10d2	Nos2
10309	4a9	Kcnq1	10411	2c7	Timp2	21404	8a5	mt-Cytb
21612	7h6	Erf	41606	6b9	Igfbp2	11612	7a3	mt-Nd1
40212	8f2	Usp4	40408	2d7	Rps6ka1	40503	2a7	mt-Nd6
21811	10d8	Cnr2	31501	8d3	Pla2r1	31708	7b10	Dusp5
21407	8c2	Tcf3	11501	8d4	Ifna	31707	7a3	mt-Nd1
31612	7a2	Smek1	30104	3d3	Gpld1	21707	7d2	Ptgis
11704	8b12	Casp4	20901	3g7	Rnf44	10106	3d10	Timm8a1
41010	5b4	Rps15	30712	4a2	Ptk9	40907	2a8	Atp1b3
20711	4b11	Tomm40	30610	2g12	Cks1b	30410	2f6	Timp2
30807	3c10	Map2k3	31701	7h9	Tubb6			
30702	3b7	Cib1	30503	1g5	Tyrobp	21405	8a7	Xcl1
41311	6a5	Camk2a	41904	6c8	Baiap2	20412	2a6	Psg29
			21508	4g8	Map2k4			
41809	8f11	Thra				20308	4e2	Gabbr2
10101	3b1	Prkcsh	10405	4g12	Syt15	20306	2c1	Nnat
41611	7c7	Kcnj4	41307	5c11	Centb5	30108	1g5	Tyrobp
30804	3e3	Cicnkb	20606	2g3	Kcnk4	20309	4d3	Grin3b
20907	3f6	Pkia	20805	3b5	Prkcz	41711	8h8	<i>Met</i>
40401	7f5	Egf	21106	5a7	Map2k7	30304	8g2	Mtap1b
10312	4c6	Kcnn1				21610	7c4	Cst3
41610	7b10	Dusp5	31101	5h11	Syt7	21312	10e2	Pde8b
41506	8g5	Stat3	11703	8b1	Cnr2	21712	7d1	<i>Grm8</i>
30204	5d5	2610041P16Rik	40612	3a11	Psmb5	40902	3h9	<i>Timm17a</i>
20105	7f1	<i>Apoa2</i>	21111	1b10	Camk2b	21203	1e7	Timm8b
30604	2c3	Pacsin1	31705	8c1	Rbp1	10512	1g12	Pak1
31512	6d4	Gabre	30905	3a7	Il1b	30509	1a11	Timm13
10901	2b5	Igtp	40803	1h7	Kcna7	10407	1h2	Cox8a
			11611	7a1	Mapk8			

Tabelle 3.4: p-Werte zur lernassoziierten Regulation Mitochondrium-assoziierter Gene.

In dieser Tabelle sind die p-Werte zu allen auf dem Genchip enthaltenen Gene zu Proteinen der Atmungskette sowie zu Translokasen der inneren Mitochondrienmembran dargestellt. Die p-Werte geben den statistischen Unterschied zwischen den jeweils acht Ratio-Werten der guten Lerner und den Schwimmkontrollen an. Eine gleiche RZPD-Nummer zeigt die identische Gensequenz, jedoch verschiedene PCR-Produkte an. Die signifikanten p-Werte sind hervorgehoben. Querstriche zeigen nicht detektierbare Signale, kursiv und nicht fett dargestellte Genkürzel nicht sequenzverifizierte Gene an.

spotID	RZPD-Nr.	Genkürzel	Tag 1			Tag 2			Tag 3			Tag 4			Tag 5		
			1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h
10407	1h2	Cox8a	---	0,029	0,145	0,397	0,364	0,005	---	0,826	0,031	0,001	0,000	0,003	---	---	---
30805	1h4	Cox8a	---	0,406	0,030	0,113	0,542	0,001	0,470	---	---	0,040	0,060	---	---	0,855	0,064
30301	8f4	mt-CO1	0,684	0,975	0,432	0,005	0,594	0,093	0,799	0,095	0,131	0,200	0,227	0,460	0,447	0,005	0,000
41502	8f4	mt-CO1	0,366	0,329	0,538	0,030	0,499	0,437	0,743	0,414	0,244	0,017	0,527	0,482	0,232	0,038	0,502
10408	2a4	mt-Cytb	---	---	---	0,390	0,298	---	0,290	---	---	---	0,242	---	---	---	---
30409	2a5	mt-Cytb	0,574	0,366	0,800	0,021	0,681	---	0,430	0,154	0,018	0,009	0,023	0,459	0,254	0,001	0,001
21404	8a5	mt-Cytb	0,600	0,138	0,900	0,027	0,370	0,025	---	0,312	0,011	0,045	0,394	0,424	0,200	0,003	0,019
11612	7a3	mt-Nd1	0,452	0,242	0,829	0,042	0,525	---	---	0,149	0,000	0,001	0,030	0,224	0,219	0,002	0,430
31707	7a3	mt-Nd1	0,745	0,236	0,058	0,108	0,290	0,004	0,454	---	0,000	0,004	0,021	0,295	0,182	0,001	0,009
40503	2a7	mt-Nd6	0,133	0,831	0,953	0,433	0,349	---	0,789	0,012	0,000	0,000	0,939	0,056	---	0,001	0,005
10106	3d10	Timm8a1	0,309	0,283	0,149	0,032	0,314	0,017	0,228	0,230	0,001	0,714	0,010	0,431	0,077	0,001	0,001
11012	5d7	Timm8a1	0,445	0,175	0,703	0,307	0,479	---	---	0,453	0,512	---	0,079	0,988	---	0,998	0,019
30205	5d7	Timm8a1	0,477	0,165	0,626	0,965	0,410	---	0,739	0,816	0,690	0,029	0,032	0,943	0,854	0,361	0,103
21203	1e7	Timm8b	0,206	0,555	0,395	0,121	0,017	0,642	---	0,747	0,005	---	0,027	0,229	0,090	0,059	0,134
21110	1b8	Timm8b	0,432	0,198	0,053	0,050	0,209	0,217	0,244	0,288	0,883	0,378	0,673	0,533	0,282	0,732	0,734
11201	1c4	<i>Timm9</i>	0,218	0,762	0,625	0,651	0,035	---	0,348	0,465	0,002	0,347	0,703	0,792	0,646	0,260	0,006
30611	2h4	Timm10	---	0,569	0,159	0,123	0,323	---	---	---	0,054	0,720	0,076	0,525	0,846	0,308	0,061
20608	3a2	<i>Timm10</i>	---	0,090	0,634	0,361	0,016	0,750	---	---	---	0,156	0,001	0,046	0,020	0,080	0,017
30509	1a11	Timm13	---	0,818	0,564	0,013	0,579	0,328	0,076	0,432	0,627	0,000	0,348	0,961	---	0,148	0,035
41107	1a11	Timm13	---	0,661	0,002	0,016	0,264	0,045	---	0,049	0,004	0,001	0,490	0,339	0,226	0,363	0,816
20510	2f11	Timm17a	---	0,087	0,092	0,836	0,092	0,081	0,519	0,365	0,045	0,715	0,182	0,376	0,594	---	0,001
10709	3h9	<i>Timm17a</i>	0,029	0,803	0,617	0,052	0,476	0,983	---	0,168	0,962	0,829	0,113	0,982	0,843	---	0,000
40902	3h9	<i>Timm17a</i>	0,769	0,199	0,081	0,010	0,065	0,111	0,386	---	0,429	0,194	0,097	0,153	0,011	0,129	0,003
20910	4e1	Timm17b	---	---	0,622	0,119	0,937	---	---	0,754	---	---	---	---	0,683	0,149	0,022
10105	3d8	Timm17b	---	0,365	0,675	0,119	0,430	---	---	0,604	0,353	---	---	0,543	---	0,363	0,001
30808	3d8	Timm17b	---	0,198	0,109	0,462	0,388	0,945	---	---	---	0,002	0,000	0,160	0,978	0,193	0,092
31111	1a4	Timm22	0,453	0,242	0,961	0,485	0,843	0,279	0,617	0,115	0,030	0,956	0,000	0,004	0,559	0,553	0,201
20803	1a4	Timm22	0,147	0,537	0,197	0,619	0,171	0,056	0,551	0,218	0,973	0,420	0,503	0,040	0,701	0,070	0,355
40706	3h2	<i>Timm23</i>	0,438	0,011	0,316	0,154	0,592	---	0,092	---	0,286	---	---	0,946	0,834	0,632	0,091
20102	3e2	<i>Timm44</i>	---	0,001	0,157	0,004	0,250	0,594	---	0,477	0,442	---	---	0,443	---	---	0,021
20502	1f12	Timm44	---	0,910	0,664	0,848	0,755	0,003	0,084	0,372	0,862	0,645	0,502	0,162	0,078	0,098	0,792
20402	1f12	Timm44	---	0,298	0,076	0,139	0,542	---	0,745	0,867	0,027	---	---	---	0,023	0,856	---

3.4 Detektion *MWM*-relevanter Gene mit der Real-Time PCR

Um den Einfluss der *MWM*-Erfahrung auf die Genexpression sowie die lernabhängige Genregulation bestimmter Kandidatengene zu bestimmen, wurden neben dem im *Microarray* detektierten *mt-CO1* zusätzlich aus der Literatur ausgewählte Gene in der quantitativen *Real-Time PCR* an Einzeltieren untersucht (Abbildungen 3.4.1 und 3.4.2, Tabelle 3.5).

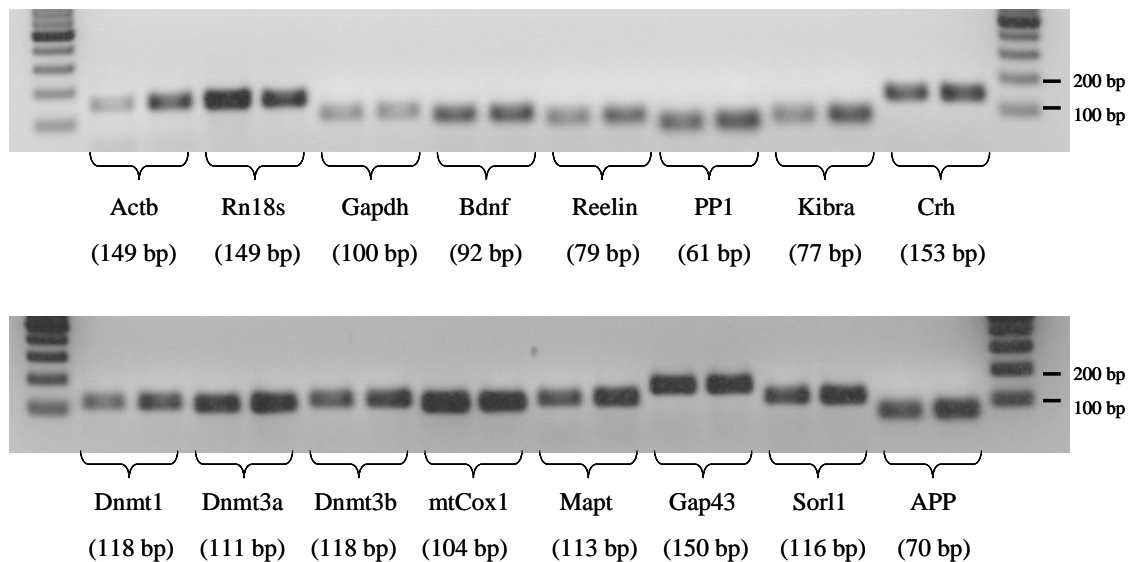


Abbildung 3.4.1: *PCR*-Produkte zu den in der *qPCR* verwendeten *Primern*.

Dargestellt sind beispielhaft die mit der *qPCR* erhaltenen *PCR*-Produkte zu den Hippokampus-Proben der Mäuse KK22 (jeweils links) und KK23 (jeweils rechts).

Tabelle 3.5: Anzahl der für die *qPCR*-Studie verwendeten Mäuse.

Es sind die Anzahl der für die *qPCR*-Studie verwendeten Mäuse pro Testgruppe und Zeitpunkt für Hippokampus (A) und Cerebellum (B) dargestellt. Diese Zahl kann je nach untersuchtem Gen variieren.

		1-1h	1-6h	1-24h	2-1h	2-6h	2-24h	3-1h	3-6h	3-24h	4-1h	4-6h	4-24h	5-1h	5-6h	5-24h	
A	gute Lerner (gL)	5	5	5	5-6	5-6	5	5-9	5	3	4	4	5	4	5	2-5	
	schlechte Lerner (sL)				4	3	3	3	3	2		1	2	2	3		
	Schwimmkontrollen (SK)	4-6	4-5	5	4-6	6-7	7	5-9	6	4	4	5	6	3-4	5	2-4	
	Käfigkontrollen (KK)	10															
		4-1h	4-6h	4-24h													
B	gute Lerner (gL)	4	4	5													
	Schwimmkontrollen (SK)	4	4	5													
	Käfigkontrollen (KK)	8															

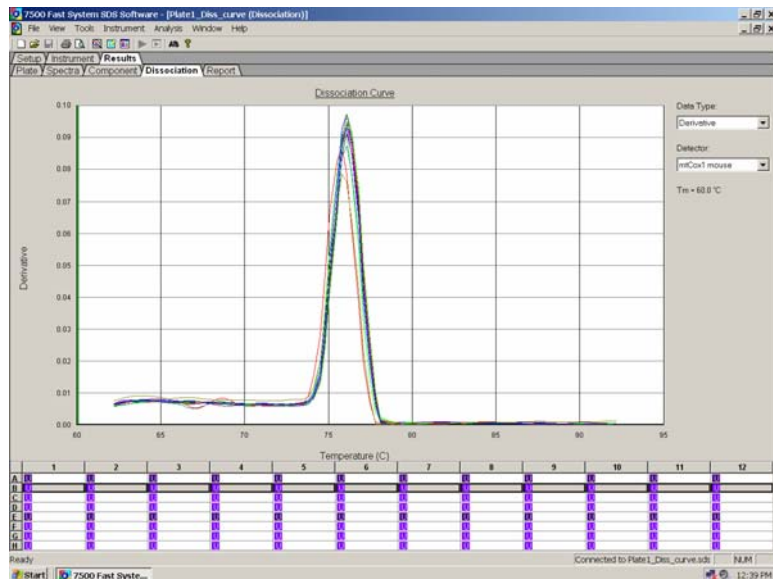


Abbildung 3.4.2: Schmelzkurvenanalyse.

Dargestellt sind beispielhaft die Schmelzpunkte von zwölf 92 bp langen *Bdnf*-Amplifikons. Alle produzierten Amplifikate (Abbildung 3.4.1) lieferten ausschließlich einen gemäß der Amplikonlänge spezifischen Schmelzpunkt.

3.4.1 Evaluation der stabilsten endogenen Kontrolle

Da die Expression so genannter Haushaltsgene je nach Experiment variieren kann, wurde für diese *qPCR*-Studie zuerst eine Evaluation der stabilsten endogenen Kontrolle durchgeführt. Hierbei wurden die drei am häufigsten verwendeten Referenzgene, *Rn18s* (18S-rRNA), *Gapdh* (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) und *Actb* (Aktin-beta), auf ihre Stabilität in Bezug auf die hier angewandten *MWM*-Experimente untersucht. Zur Ermittlung der stabilsten endogenen Kontrolle für die *qPCR*-Studie wurde eine von Vandesompele und Mitarbeiter (2002) vorgestellte Methode zur Evaluation von Haushaltsgenen angewandt. Mit Hilfe des frei erhältlichen *geNorm*-Programms (Download auf <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) wurde die Stabilität der Referenzgene *Rn18s*, *Gapdh* und *Actb* in allen untersuchten Testgruppen und Zeitpunkten durch Kalkulation des so genannten M-Wertes bestimmt.

Bei dieser Methode wurden zunächst jeweils die *Ct*-Werte der drei Kandidatengene der Experimentalgruppe (SK beziehungsweise gL, sL) durch die *Ct*-Werte in der Kalibratorgruppe (KK beziehungsweise SK) dividiert. Mit Hilfe dieser *Quantity*-Werte können mit dem auf Excel basierenden *geNorm*-Programm so genannte M-Werte berechnet werden. Die M-Werte werden hierbei aus den Standardabweichungen der verschiedenen *Quantity*-Werte gebildet, so dass niedrige Werte eine höhere Stabilität des Haushaltsgens anzeigen.

Für die Untersuchungen der Genregulation in Hippokampus (Tabelle 3.6A) und Cerebellum (Tabelle 3.6B) wurde *Actb* (Hipp, M=0,656; Cereb, M=0,421) als das stabilste Referenzgen determiniert, während *Rn18s* (Hipp, M=0,850; Cereb, M=0,436) und *Gapdh* (Hipp, M=0,789; Cereb, M=0,490) höhere M-Werte und damit eine größere Variation ihrer Expression über das gesamte Versuchsdesign hinweg zeigten. Es sei hierbei erwähnt, dass an den Zeitpunkten 1-1 im Hippokampus sowie an 4-24 im Cerebellum jeweils *Gapdh* eine stabilere Expression zeigte als *Actb* (Hipp 1-1: *Actb*, M=0,524 > *Gapdh*, M=0,496; Cereb 4-24: *Actb*, M=0,784 > *Gapdh*, M=0,723).

3.4.2 Mit *MWM*-Erfahrung assoziierte Genexpression in Hippokampus

Um die Auswirkungen der *Water Maze*-Erfahrung auf die *de novo*-Genexpression zu untersuchen, wurden Schwimmkontrollmäuse (SK) mit Test-naiven Käfigkontrollen (KK) verglichen. Hierbei wurde bei allen untersuchten Genen eine Herunterregulation vor allem an den „späten“ *MWM*-Tagen 4 und 5 gefunden, wobei die Gene jeweils spezifische Expressionsmuster zeigten (Abbildung 3.4.3). Eine Hochregulation an *MWM*-Tag 1 zeigten das mitochondriale Gen *mt-CO1* (1-1, $3,48 \pm 0,46$ -fach, $p \leq 0,05$) und *Kibra* (1-6, $1,88 \pm 0,22$ -fach, $p \leq 0,05$), während die *mRNA* von *Sor11* (1-1, $1,62 \pm 0,19$ -fach, $p \leq 0,05$; 1-6, $1,61 \pm 0,16$ -fach, $p \leq 0,05$) sowie *Dnmt1* (1-24, $2,87 \pm 0,41$ -fach, $p \leq 0,05$) herunterreguliert waren.

Tabelle 3.6. Stabilität der Referenzgene *Actb*, *Rn18s* und *Gapdh*.

Es sind die M-Werte der in der *qPCR* getesteten Zeitpunkte (n=gL+sL+SK) sowie der Test-naiven Käfigkontrollen (KK) (vergleiche Tabelle 3.5) für Hippokampus (A) und Cerebellum (B) aufgelistet. Geringere M-Werte zeigen eine höhere Stabilität des Referenzgens an (Vandesompele *et al.* 2002). Das geometrische Mittel (\emptyset) gibt den Durchschnittswert aller untersuchten Zeitpunkte beziehungsweise der Experimentalgruppen an. Das Gen *Gapdh* wurde nicht zu allen Zeitpunkten untersucht. Die in Klammern dargestellten geometrischen Mittel in (A) zeigen den Durchschnittswert aller mit *Gapdh* untersuchten Zeitpunkte der Referenzgene *Actb* und *Rn18s* an.

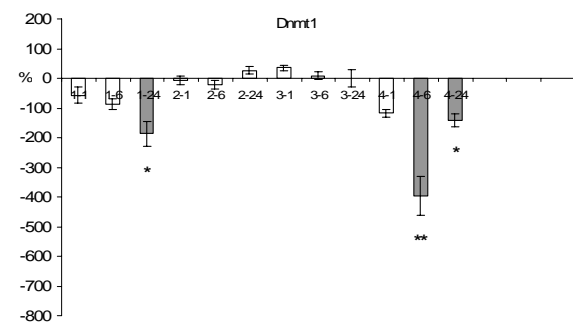
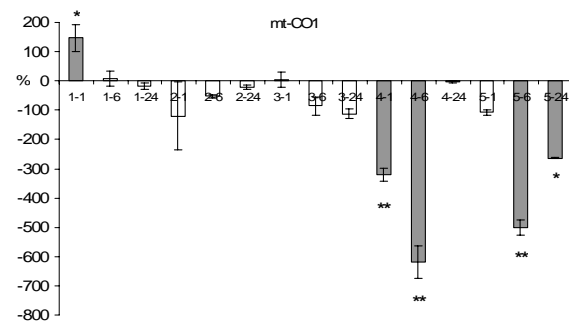
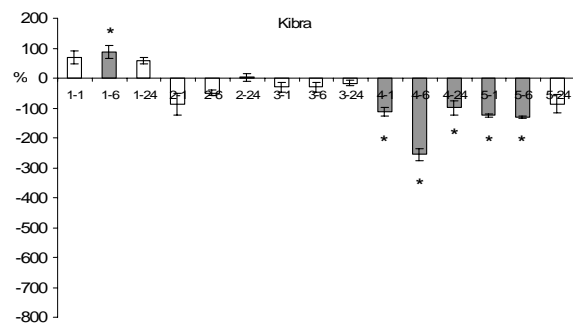
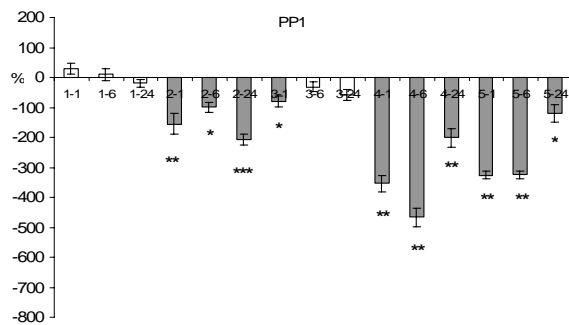
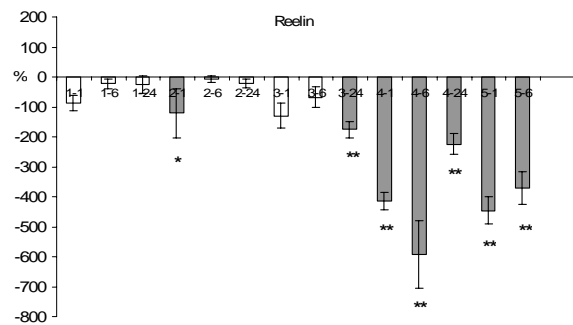
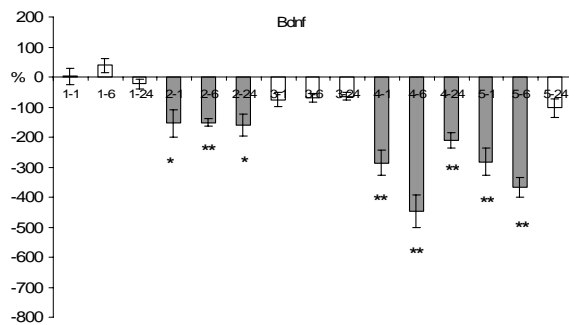
A	<i>Actb</i>	<i>Rn18s</i>	<i>Gapdh</i>
KK (n=10)	1,056	1,290	1,580
1-1 (n=10)	0,524	0,636	0,496
1-6 (n=10)	0,594	0,833	0,991
1-24 (n=10)	0,590	0,920	0,712
2-1 (n=15)	0,962	0,968	
2-6 (n=14)	0,814	1,306	
2-24 (n=15)	0,785	1,019	
3-1 (n=12)	0,937	1,516	
3-6 (n=14)	0,387	0,475	0,538
3-24 (n=9)	0,955	1,331	1,319
4-1 (n=8)	0,386	0,492	0,485
4-6 (n=10)	0,339	0,517	
4-24 (n=13)	0,766	0,931	
\emptyset	0,656 (0,598)	0,850 (0,792)	0,789

B	<i>Actb</i>	<i>Rn18s</i>	<i>Gapdh</i>
KK (n=8)	0,798	0,997	1,296
4-1 (n=8)	0,243	0,315	0,271
4-6 (n=8)	0,190	0,205	0,227
4-24 (n=10)	0,784	0,563	0,723
\emptyset	0,412	0,436	0,490

Eine *de novo*-Expression der restlichen hier untersuchten Gene konnte nach diesem ersten *MWM*-Tag nicht festgestellt werden. Das Stresshormon *Crh* (Kortikotropin *Releasing*-Hormon) war eine Stunde nach dem letzten Schwimmdurchlauf an Tag 1 in der *MWM* hochreguliert (1-1, $1,67 \pm 0,22$ -fach, $p \leq 0,05$; 1-6, $1,37 \pm 0,20$ -fach, n.s.; 1-24, $1,56 \pm 0,13$ -fach, n.s.). Die Genexpression dieses Gens wurde nur an *MWM*-Tag 1 untersucht und ist nicht in Abbildung 3.4.1 dargestellt. An den beiden „mittleren“ *MWM*-Tagen 2 und 3 wur-

de keine Regulation der Gene *Kibra*, *mt-CO1*, *Dnmt1* und *APP* gefunden. Im Gegensatz dazu wurde hier eine Herunterregulation von *Bdnf* (2-1, $2,54 \pm 0,45$ -fach, $p \leq 0,05$; 2-6, $2,52 \pm 0,13$ -fach, $p \leq 0,01$; 2-24, $2,60 \pm 0,35$ -fach, $p \leq 0,05$), *PP1* (2-1, $2,55 \pm 0,34$ -fach, $p \leq 0,01$; 2-6, $1,99 \pm 0,17$ -fach, $p \leq 0,01$; 2-24, $3,08 \pm 0,18$ -fach, $p \leq 0,001$; 3-1, $1,79 \pm 0,19$ -fach, $p \leq 0,05$), *Reelin* (2-1, $2,21 \pm 0,82$ -fach, $p \leq 0,05$; 3-24, $2,76 \pm 0,26$ -fach, $p \leq 0,01$), *Dnmt3a* (2-1, $2,54 \pm 0,37$ -fach, $p \leq 0,01$; 2-6, $2,57 \pm 0,23$ -fach, $p \leq 0,01$; 2-24, $1,92 \pm 0,16$ -fach, $p \leq 0,05$; 3-1, $1,74 \pm 0,11$ -fach, $p \leq 0,05$), *Dnmt3b* (2-1, $2,33 \pm 0,39$ -fach, $p \leq 0,01$; 2-6, $2,48 \pm 0,25$ -fach, $p \leq 0,01$), *Mapt* (2-6, $2,07 \pm 0,19$ -fach, $p \leq 0,01$; 2-24, $1,82 \pm 0,11$ -fach, $p \leq 0,01$), *Gap43* (2-6, $2,51 \pm 0,30$ -fach, $p \leq 0,01$; 2-24, $2,32 \pm 0,16$ -fach, $p \leq 0,01$) und *Sorl1* (2-1, $1,96 \pm 0,46$ -fach, $p \leq 0,05$; 2-6, $1,82 \pm 0,17$ -fach, $p \leq 0,05$; 2-24, $2,08 \pm 0,14$ -fach, $p \leq 0,05$; 3-1, $1,88 \pm 0,16$ -fach, $p \leq 0,05$; 3-6, $2,21 \pm 0,35$ -fach, $p \leq 0,05$; 3-24, $2,52 \pm 0,26$ -fach, $p \leq 0,05$) gefunden. Eine Ausnahme hierbei bildete die signifikant erhöhte mRNA-Synthese von *Mapt* zum Zeitpunkt 3-24 ($1,96 \pm 0,20$ -fach, $p \leq 0,05$). Alle hier untersuchten Gene zeigten eine Herunterregulation an den „späten“ MWM-Tagen 4 und 5, wobei nicht alle Gene an MWM-Tag 5 untersucht wurden (Abbildung 3.4.3). So wurden durch die MWM-Erfahrung die Gene *Bdnf* (4-1, $3,86 \pm 0,41$ -fach, $p \leq 0,01$; 4-6, $5,48 \pm 0,54$ -fach, $p \leq 0,01$; 4-24, $3,11 \pm 0,24$ -fach, $p \leq 0,01$; 5-1, $3,83 \pm 0,45$ -fach, $p \leq 0,01$; 5-6, $4,67 \pm 0,33$ -fach, $p \leq 0,01$), *PP1* (4-1, $4,54 \pm 0,27$ -fach, $p \leq 0,01$; 4-6, $5,67 \pm 0,32$ -fach, $p \leq 0,01$; 4-24, $3,02 \pm 0,30$ -fach, $p \leq 0,01$; 5-1, $4,26 \pm 0,13$ -fach, $p \leq 0,01$; 5-6, $4,25 \pm 0,13$ -fach, $p \leq 0,01$; 5-24, $2,20 \pm 0,28$ -fach, $p \leq 0,05$), *Reelin* (4-1, $5,15 \pm 0,29$ -fach, $p \leq 0,01$; 4-6, $6,92 \pm 1,13$ -fach, $p \leq 0,01$; 4-24, $3,24 \pm 0,34$ -fach, $p \leq 0,01$; 5-1, $5,46 \pm 0,45$ -fach, $p \leq 0,01$; 5-6, $4,72 \pm 0,55$ -fach, $p \leq 0,01$; 5-24, n.u.), *Kibra* (4-1, $2,13 \pm 0,14$ -fach, $p \leq 0,05$; 4-6, $3,56 \pm 0,21$ -fach, $p \leq 0,05$; 4-24, $2,00 \pm 0,24$ -fach, $p \leq 0,05$; 5-1, $2,25 \pm 0,05$ -fach, $p \leq 0,05$; 5-6, $2,31 \pm 0,05$ -fach, $p \leq 0,05$), *mt-CO1* (4-1, $4,21 \pm 0,22$ -fach, $p \leq 0,01$; 4-6, $7,20 \pm 0,54$ -fach, $p \leq 0,01$; 5-6, $6,02 \pm 0,26$ -fach, $p \leq 0,01$; 5-24, $3,63 \pm 0,03$ -fach, $p \leq 0,05$), *Dnmt1* (4-6, $4,95 \pm 0,66$ -fach, $p \leq 0,01$; 4-24, $2,42 \pm 0,22$ -fach, $p \leq 0,05$; Tag 5, n.u.), *Dnmt3a* (4-6, $3,16 \pm 0,14$ -fach, $p \leq 0,01$; 4-24, $1,78 \pm 0,11$ -fach, $p \leq 0,05$; 5-1, $2,40 \pm 0,04$ -fach, $p \leq 0,01$; 5-6, $2,55 \pm 0,11$ -fach, $p \leq 0,01$), *Dnmt3b* (4-1, $2,32 \pm 0,15$ -fach, $p \leq 0,05$; 4-6, $3,23 \pm 0,17$ -fach, $p \leq 0,01$; 5-1, $3,19 \pm 0,34$ -fach, $p \leq 0,05$; 5-6, $3,18 \pm 0,14$ -

fach, $p \leq 0,01$; 5-24, n.u.), *Mapt* (4-1, $1,88 \pm 0,10$ -fach, $p \leq 0,05$; 4-6, $2,37 \pm 0,06$ -fach, $p \leq 0,05$; 4-24, $1,45 \pm 0,10$ -fach, $p \leq 0,05$; Tag 5, n.u.), *Gap43* (4-1, $2,10 \pm 0,09$ -fach, $p \leq 0,01$; 4-6, $1,89 \pm 0,10$ -fach, $p \leq 0,05$; Tag 5, n.u.), *Sorl1* (4-1, $4,45 \pm 0,26$ -fach, $p \leq 0,01$; 4-6, $6,13 \pm 0,51$ -fach, $p \leq 0,01$; 4-24, $3,07 \pm 0,25$ -fach, $p \leq 0,01$; Tag 5, n.u.) und *APP* (4-1, $2,81 \pm 0,09$ -fach, $p \leq 0,01$; 4-6, $3,72 \pm 0,18$ -fach, $p \leq 0,01$; Tag 5, n.u.) herunterreguliert.



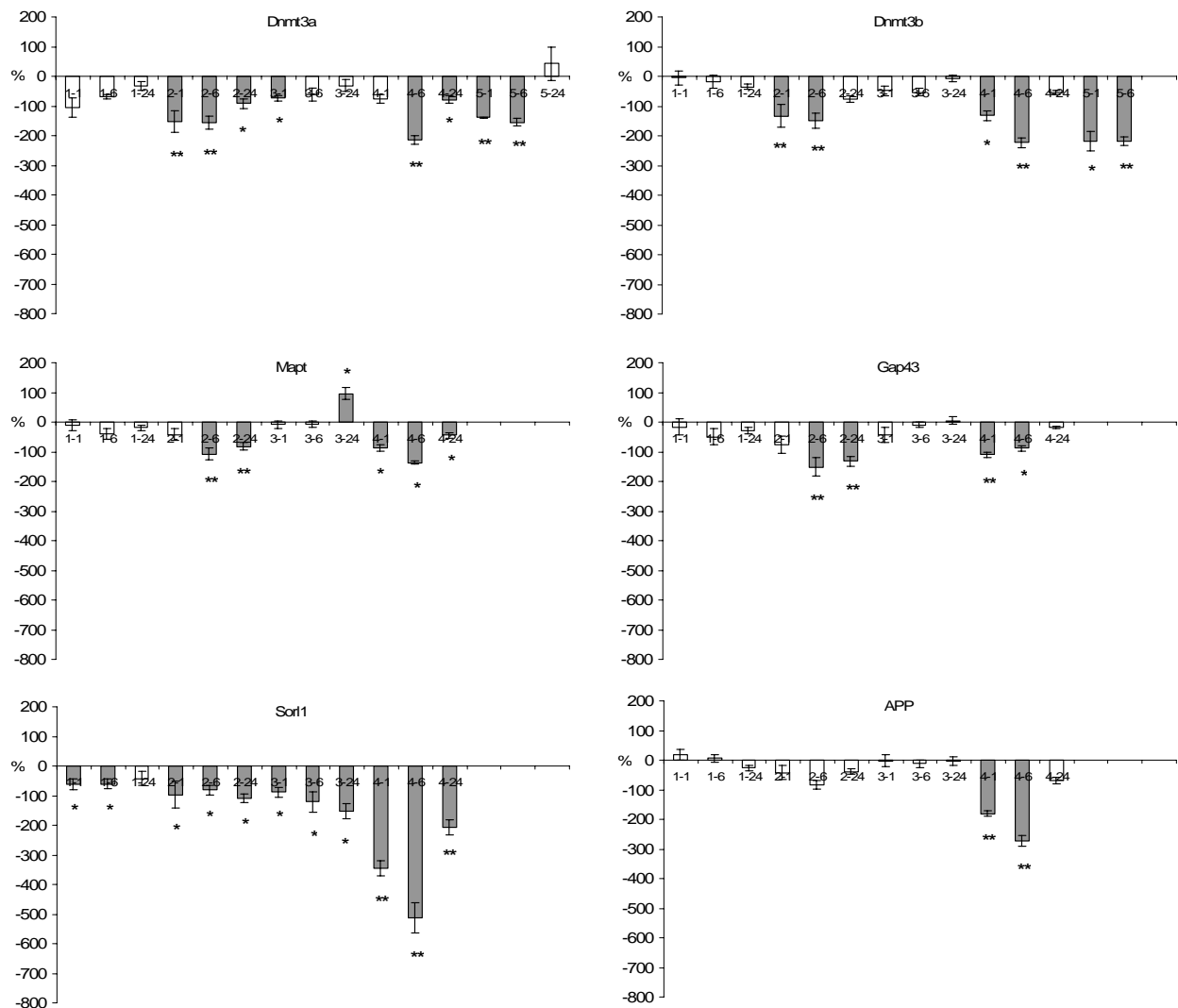


Abbildung 3.4.3: Mit *MWM*-Erfahrung assoziierte Genexpression im Hippokampus.

Es sind die durch die *Water Maze*-Erfahrung herbeigeführte Regulation der Gene *Bdnf*, *PP1*, *Reelin*, *Kibra*, *mt-CO1*, *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Mapt*, *Gap43*, *Sor1* und *APP* dargestellt. Dazu wurden Schwimmkontrollen (SK, n=5-7) mit Test-naiven Käfigkontrollen (KK, n=10) verglichen, wobei insgesamt 15 verschiedene Zeitpunkte während der fünftägigen *MWM*-Erfahrung der Mäuse untersucht wurden. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Tabelle 3.5A angezeigt. Die Hoch- beziehungsweise Herunterregulation sind in Prozent (SK-Einzelmäuse versus KK-Pool) \pm Standardfehler dargestellt. Die signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen ΔCt -Werten von SK- und KK-Mäusen sind als graue Balken hervorgehoben (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). Nicht untersuchte Zeitpunkte (n.u.) an *MWM*-Tag 5 sind freigelassen.

3.4.3 Mit *MWM*-Erfahrung assoziierte Genexpression im Cerebellum

Es wurde auch der Einfluss der *Water Maze*-Erfahrung auf die *de novo*-Genexpression von *Bdnf*, *PP1*, *Kibra*, *mt-CO1* und *Dnmt3b* im Cerebellum an *MWM*-Tag 4 untersucht (Abbildung 3.4.4). Wie im Hippokampus wurde auch in diesem Gehirnnareal eine deutliche Herunterregulation von *Bdnf* (4-1, $5,11 \pm 0,60$ -fach, $p \leq 0,05$; 4-6, $6,35 \pm 1,43$ -fach, $p \leq 0,05$; 4-24, $1,96 \pm 0,21$ -fach, n.s.), *PP1* (4-1, $3,92 \pm 0,17$ -fach, $p \leq 0,05$; 4-6, $3,01 \pm 0,05$ -fach, $p \leq 0,05$; 4-24, $1,82 \pm 0,31$ -fach, n.s.), *Kibra* (4-1, $3,52 \pm 0,11$ -fach, $p \leq 0,01$; 4-6, $2,99 \pm 0,06$ -fach, $p \leq 0,05$; 4-24, $1,86 \pm 0,19$ -fach, $p \leq 0,05$), *mt-CO1* (4-1, $11,22 \pm 0,70$ -fach, $p \leq 0,01$; 4-6, $9,66 \pm 0,23$ -fach, $p \leq 0,01$; 4-24, $1,56 \pm 0,26$ -fach, n.s.) und *Dnmt3b* (4-1, $4,55 \pm 0,31$ -fach, $p \leq 0,01$; 4-6, $4,33 \pm 0,17$ -fach, $p \leq 0,01$; 4-24, $1,58 \pm 0,24$ -fach, n.s.) detektiert.

3.4.4 *mRNA*-Synthese in Hippokampus und Cerebellum

Die in den Abbildungen 3.4.1 und 3.4.2 dargestellten Herunterregulationen in den SK-Mäusen basierten jedoch auf unterschiedlichen *mRNA*-Levels in beiden Gehirnregionen, das heißt die Stärke der *mRNA*-Synthese unterschied sich zwischen Hippokampus und Cerebellum zum Teil deutlich. Das Analogon zur *mRNA*-Synthese ist der in der *Real-Time* PCR gemessene *Ct*-Wert. Eine Differenz von einem *Ct*-Wert zwischen zwei Proben bedeutet einen zweifachen Unterschied in der *mRNA*-Synthese (Bubner *et al.* 2004). Der durchschnittliche *Ct*-Wert aller sieben in beiden Geweben untersuchten Experimentalgruppen (KK, SK4-1, gL4-1, SK4-6, gL4-6, SK4-24 und gL4-24; siehe Abbildung 3.4.5) lag für *Bdnf* ($\Delta Ct^{\text{Hipp-Cereb}} = 4,07 \pm 0,27$) im Hippokampus unter dem im Cerebellum. Dies bedeutete eine $2^{4,07}$ -fach höhere Expression dieses Gens im Hippokampus. Im Gegensatz dazu wurden die Gene *PP1* ($\Delta Ct^{\text{Hipp-Cereb}} = 3,46 \pm 0,15$), *Kibra* ($\Delta Ct^{\text{Hipp-Cereb}} = 0,79 \pm 0,17$), *mt-CO1* ($\Delta Ct^{\text{Hipp-Cereb}} = 1,02 \pm 0,14$) und *Dnmt3b* ($\Delta Ct^{\text{Hipp-Cereb}}$

= $2,41 \pm 0,12$) im Cerebellum stärker exprimiert. Die *Actb*-Expression unterschied sich hingegen in beiden Gehirnarealen nicht signifikant ($\Delta Ct^{\text{Hipp-Cereb}} = 0,04 \pm 0,18$.)

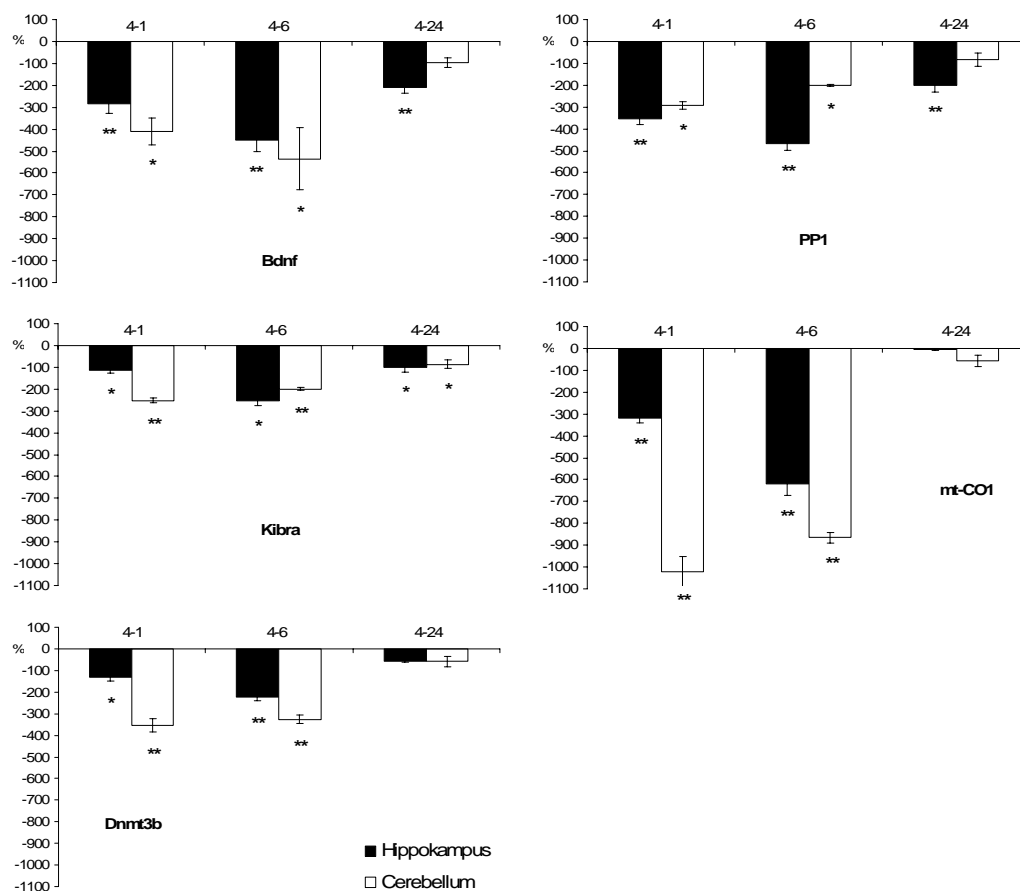


Abbildung 3.4.4: Mit *MWM*-Erfahrung assoziierte Genexpression im Cerebellum.

Es sind die durch mit *MWM*-Erfahrung assoziierte Regulation der Gene *Bdnf*, *PP1*, *Kibra*, *mt-CO1* und *Dnmt3b* in Hippokampus (schwarz, siehe auch Abbildung 3.4.3) und Cerebellum (weiß) gegenübergestellt. Sterne markieren den signifikanten Unterschied zwischen den ΔCt -Werten der SK- und KK-Mäuse (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$). Die Anzahl der hierbei untersuchten Tiere ist in Tabelle 3.5B angezeigt.

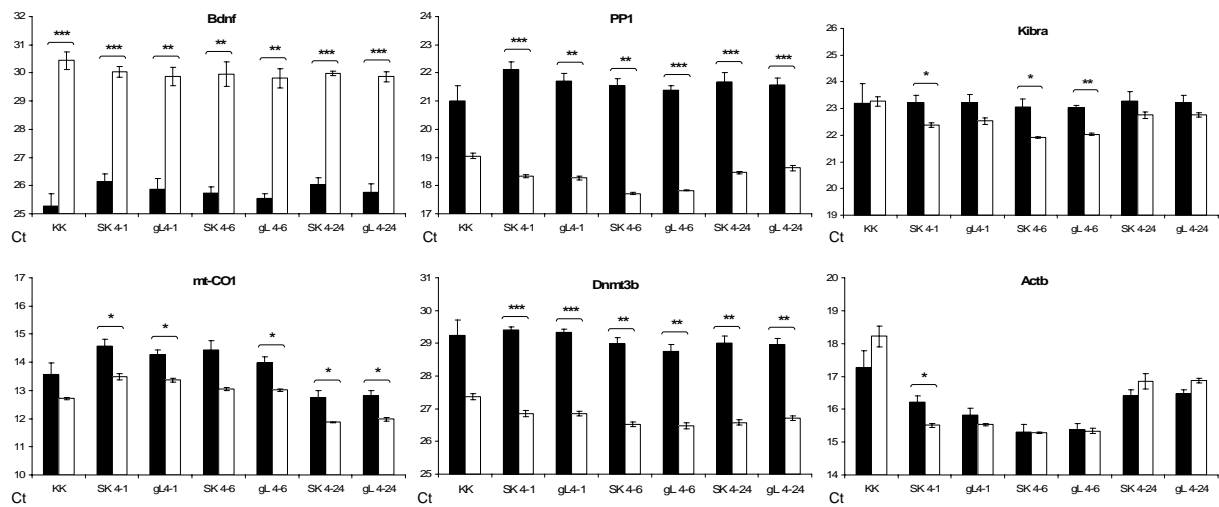


Abbildung 3.4.5: Ct-Werte in Hippokampus und Cerebellum.

Es sind die Ct-Werte \pm Standardfehler in sieben verschiedenen Experimentalgruppen in Hippokampus (schwarz) und Cerebellum (weiß) dargestellt. Die Anzahl der hierbei untersuchten Tiere ist in Tabelle 3.5B angezeigt. Sterne markieren den signifikanten Unterschied zwischen den Ct-Werten in beiden Gehirnbereichen (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

3.4.5 Lernassoziierte Genexpression im Hippokampus

Die lernabhängige *mRNA*-Synthese wurde durch Vergleich von Lernmäusen der Gruppe gute Lerner (gL) mit den entsprechenden Schwimmkontrollen (SK) überprüft.

Es wurde eine mit erfolgreichem *MWM*-Lernen assoziierte Herunterregulation von *mt-CO1* am Zeitpunkt 1-1 ($1,40 \pm 0,12$ -fach, $p \leq 0,05$) und *Dnmt1* bei 3-6 ($2,19 \pm 0,45$ -fach, $p \leq 0,05$) (Abbildung 3.4.6A) gemessen. Eine erhöhte *mRNA*-Synthese zeigte *mt-CO1* hingegen zu späteren Zeitpunkten (2-6, $1,27 \pm 0,06$ -fach, $p \leq 0,05$; 2-24, $1,46 \pm 0,15$ -fach, $p \leq 0,01$; 4-6, $1,42 \pm 0,02$ -fach, $p \leq 0,05$). Ebenfalls hochreguliert wurden die Gene *Mapt* (1-24, $1,38 \pm 0,08$ -fach, $p \leq 0,05$; 2-24, $1,23 \pm 0,07$ -fach, $p \leq 0,05$; 4-6, $1,17 \pm 0,04$ -fach, $p \leq 0,05$), *PP1* (2-24, $1,49 \pm 0,11$ -fach, $p \leq 0,05$; 4-6, $1,17 \pm 0,05$ -fach, $p \leq 0,05$), *Dnmt3b* (2-1, $1,83 \pm 0,32$ -fach, $p \leq 0,05$; 2-24, $1,41 \pm 0,08$ -fach, $p \leq 0,05$), *Dnmt3a* (1-6, $1,48 \pm 0,15$ -fach,

$p \leq 0,01$), *Kibra* (1-24, $1,33 \pm 0,09$ -fach, $p \leq 0,05$) und *Sorl1* (3-24, $1,61 \pm 0,14$ -fach, $p \leq 0,05$) (Abbildung 3.4.6B). Hierbei sei erwähnt, dass die Alzheimer-assoziierten Gene *Mapt*, *Gap43*, *Sorl1* und *APP* nicht zu Tag 5 untersucht wurden. In den zu Tag 5 untersuchten Genen konnte keine mit dem Gedächtnistest assoziierte Regulation festgestellt werden.

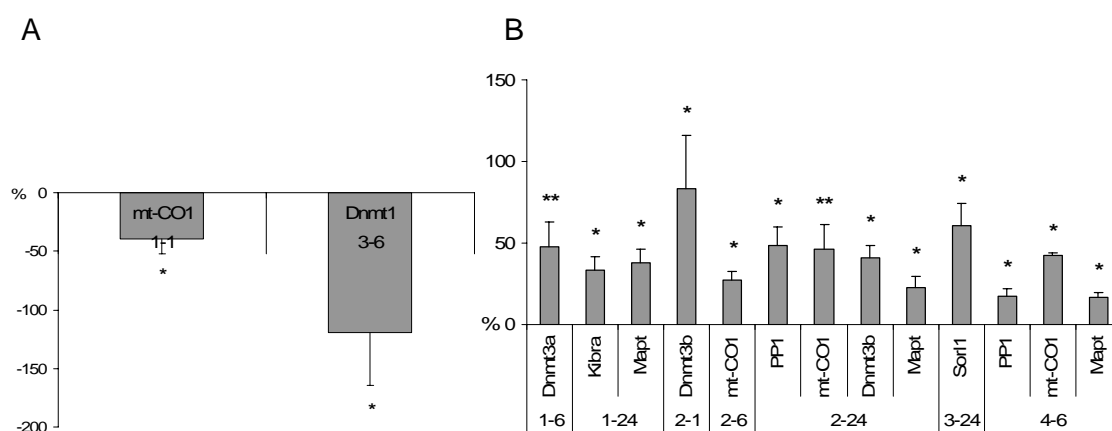


Abb. 3.4.6: Lernassoziierte Genexpression im Hippokampus.

Es sind alle mit dem *MWM*-Lernen assoziierten signifikanten Herunter- (A) beziehungsweise Hochregulationen (B) in Prozent \pm Standardfehler dargestellt. Hierbei wurden gute Lerner mit „gematchten“ Schwimmkontrollen verglichen, wobei insgesamt 15 verschiedene Zeitpunkte während des viertägigen Lernprozesses sowie nach dem Gedächtnistest an Tag 5 untersucht wurden. Die Anzahl der hierbei untersuchten Tiere ist in Tabelle 3.5A angezeigt. Die Sterne markieren den signifikanten Unterschied zwischen den ΔCt -Werten in beiden Gruppen (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

3.4.6 Lernassoziierte Genexpression im Cerebellum

Im gL/SK-Vergleich konnte keine lernabhängige Regulation der Gene *Bdnf*, *PP1*, *Kibra*, *mt-CO1* und *Dnmt3b* im Kleinhirn an den drei Zeitpunkten zu Tag 4 – andere Zeitpunkte wurden in diesem Gewebe nicht untersucht – festgestellt werden. Auch die im Hippokampus zum Zeitpunkt 4-6 hochregulierten Gene *PP1* und *mt-CO1* (Abbildung 3.4.6B) zeigten im Cerebellum keine lernassoziierte Erhöhung der *mRNA*-Synthese (*PP1*, $1,04 \pm 0,06$ -fach, n.s.; *mt-CO1*, $1,06 \pm 0,06$ -fach, n.s.).

3.4.7 Unterschiede in der lernassoziierten Genexpression zwischen guten und schlechten Lernern

Ein Vergleich der ΔCt -Werte der beiden in Kapitel 3.1.2 beschriebenen lernleistungsabhängigen Gruppen gute (gL) und schlechte (sL) Lerner zeigte zu bestimmten Zeitpunkten eine Überexpression von Genen in der sL-Gruppe (Abbildung 3.4.7). Eine Ausnahme bildete hierbei die Unterexpression der *Kibra*-mRNA in der sL-Gruppe zum Zeitpunkt 2-24 ($1,61 \pm 0,24$ -fach, $p \leq 0,05$) (Abbildung 3.4.7A). Das Gen *Bdnf* wurde als einzigstes der untersuchten Gene zu keinem Zeitpunkt differentiell reguliert. Ein Vergleich zwischen beiden Lerngruppen erfolgte über die Zeitpunkte 2-1, 2-6, 2-24, 3-1, 3-6, 3-24, 4-6, 4-24, 5-1 und 5-6, wobei vor allem bei 4-6 die Fallzahl der schlechten Lerner ($n=1$, siehe Tabelle 3.5A) zu gering für eine aussagekräftige Auswertung war. Eine Überexpression der mRNA in den sL-Mäusen hingegen zeigten die Gene *PP1* (3-1, $2,12 \pm 0,51$ -fach, $p \leq 0,05$; 3-6, $2,30 \pm 0,06$ -fach, $p \leq 0,05$; 5-1, $3,77 \pm 0,52$ -fach, $p \leq 0,05$; 5-6, $3,05 \pm 0,66$ -fach, $p \leq 0,05$), *Kibra* (3-1, $1,97 \pm 0,15$ -fach, $p \leq 0,05$; 3-6, $2,54 \pm 0,09$ -fach, $p \leq 0,05$; 5-1, $3,06 \pm 0,34$ -fach, $p \leq 0,05$; 5-6, $3,11 \pm 0,40$ -fach, $p \leq 0,05$), *Dnmt3b* (3-1, $1,40 \pm 0,11$ -fach, $p \leq 0,05$; 3-6, $1,50 \pm 0,06$ -fach, $p \leq 0,05$; 5-1, $2,80 \pm 0,09$ -fach, $p \leq 0,05$; 5-6, $2,53 \pm 0,44$ -fach, $p \leq 0,05$), *Dnmt3a* (5-1, $1,89 \pm 0,07$ -fach, $p \leq 0,05$; 5-6, $5,34 \pm 3,03$ -fach, $p \leq 0,05$), *Mapt* (3-1, $1,45 \pm 0,05$ -fach, $p \leq 0,05$; 3-6, $1,69 \pm 0,12$ -fach, $p \leq 0,05$), *Sorl1* (3-1, $1,51 \pm 0,02$ -fach, $p \leq 0,05$; 3-6, $2,46 \pm 0,13$ -fach, $p \leq 0,05$), *APP* (3-1, $1,43 \pm 0,05$ -fach, $p \leq 0,05$; 3-6, $1,59 \pm 0,03$ -fach, $p \leq 0,05$), *Reelin* (5-6, $3,79 \pm 0,21$ -fach, $p \leq 0,05$) und *Dnmt1* (3-1, $1,33 \pm 0,01$ -fach, $p \leq 0,05$) (Abbildung 3.4.7B-E).

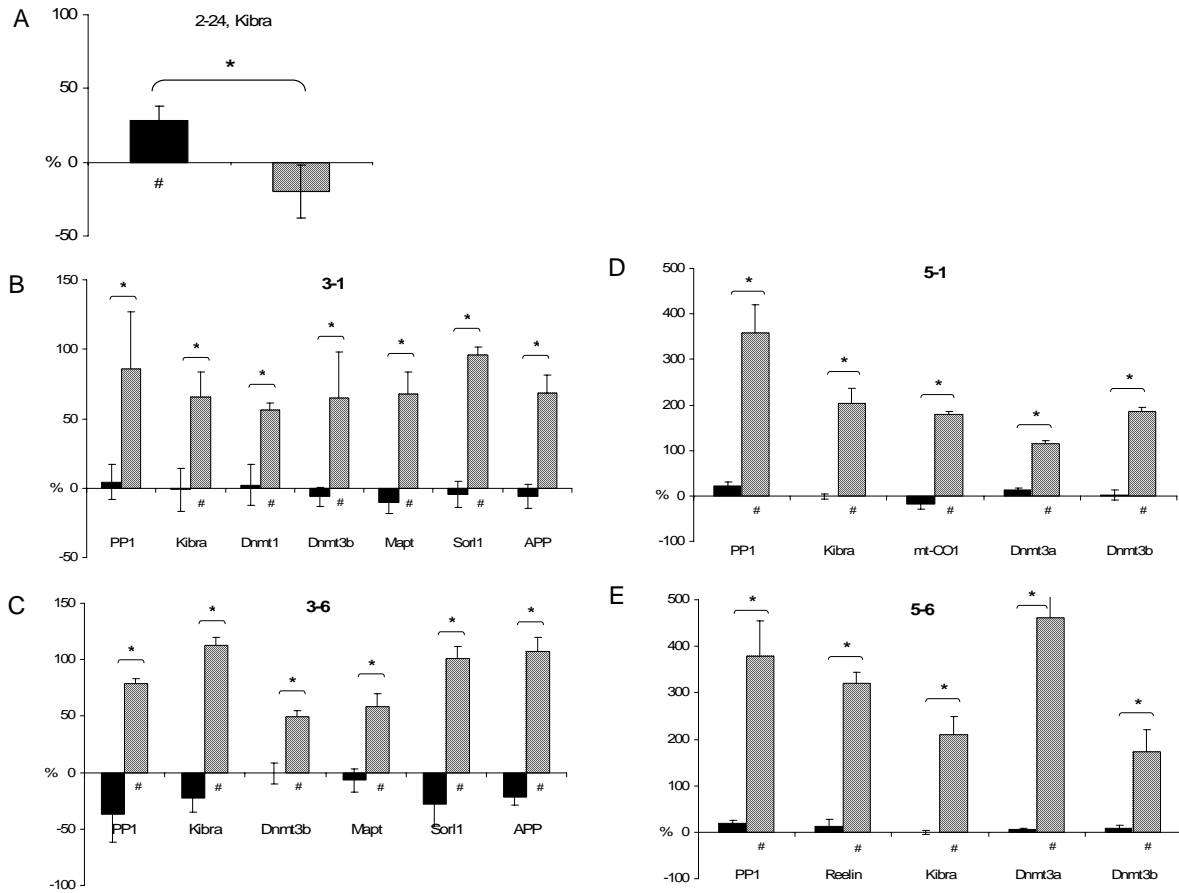


Abbildung 3.4.7: Unterschiedliche lernassoziierte Genexpression im Hippokampus von guten und schlechten Lernern.

In diesem Diagramm sind alle detektierten signifikanten Unterschiede in der lernassoziierten Genexpression zwischen den ΔCt -Werten der guten (schwarz) und schlechten (gestreift) Lerner dargestellt (* $p \leq 0,05$). Die Balken zeigen die Genregulation in Prozent \pm Standardfehler der beiden Gruppen im Vergleich zu den Schwimmkontrollen. Mit der Raute (# $p \leq 0,05$) sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Lern- und Kontrolltieren angezeigt. Die Anzahl der hierbei untersuchten Tiere ist in Tabelle 3.5A angezeigt.

3.5 Lernassoziierte Proteinexpression in guten und schlechten Lernern

Um die Frage zu klären, ob sich die *mRNA*-Daten auch auf Proteinebene verifizieren lassen, wurde die Menge an Tau-Protein sowie der katalytischen Untereinheit der Protein-Phosphatase 1 in guten und schlechten Lernern im *Western Blot* untersucht. Während für Tau (2-6, $1,15 \pm 0,01$ -fach, n.s.; 3-6, $1,69 \pm 0,35$ -fach, n.s.) keine signifikanten Unterschiede zwischen guten und schlechten Lernern festgestellt werden konnten (Abbildung 3.4.6A), wurden für PP1 (2-6, $3,17 \pm 0,25$ -fach, $p \leq 0,01$; 3-1, $3,63 \pm 0,72$ -fach, $p \leq 0,05$; 3-6, $1,65 \pm 0,50$ -fach, n.s.) erhöhte Proteinmengen im Hippokampus der schlechten Lerner (Abbildung 3.4.6B) gemessen. Daher wurde der Phosphorylierungsgrad des PP1-Zielproteins CREB sowie die Menge von CREB-abhängigem Bdnf analysiert. Hierbei wurde an Zeitpunkt 3-1 eine tendenzielle, aber nicht signifikante Herunterregulation von Phospho-CREB ($1,87 \pm 0,28$ -fach, n.s.), des Bdnf-Vorläuferproteins ($1,30 \pm 0,18$ -fach, n.s.) sowie des reifen Bdnf-Proteins ($4,61 \pm 0,35$ -fach, n.s.) (Abbildung 3.4.6C) beobachtet.

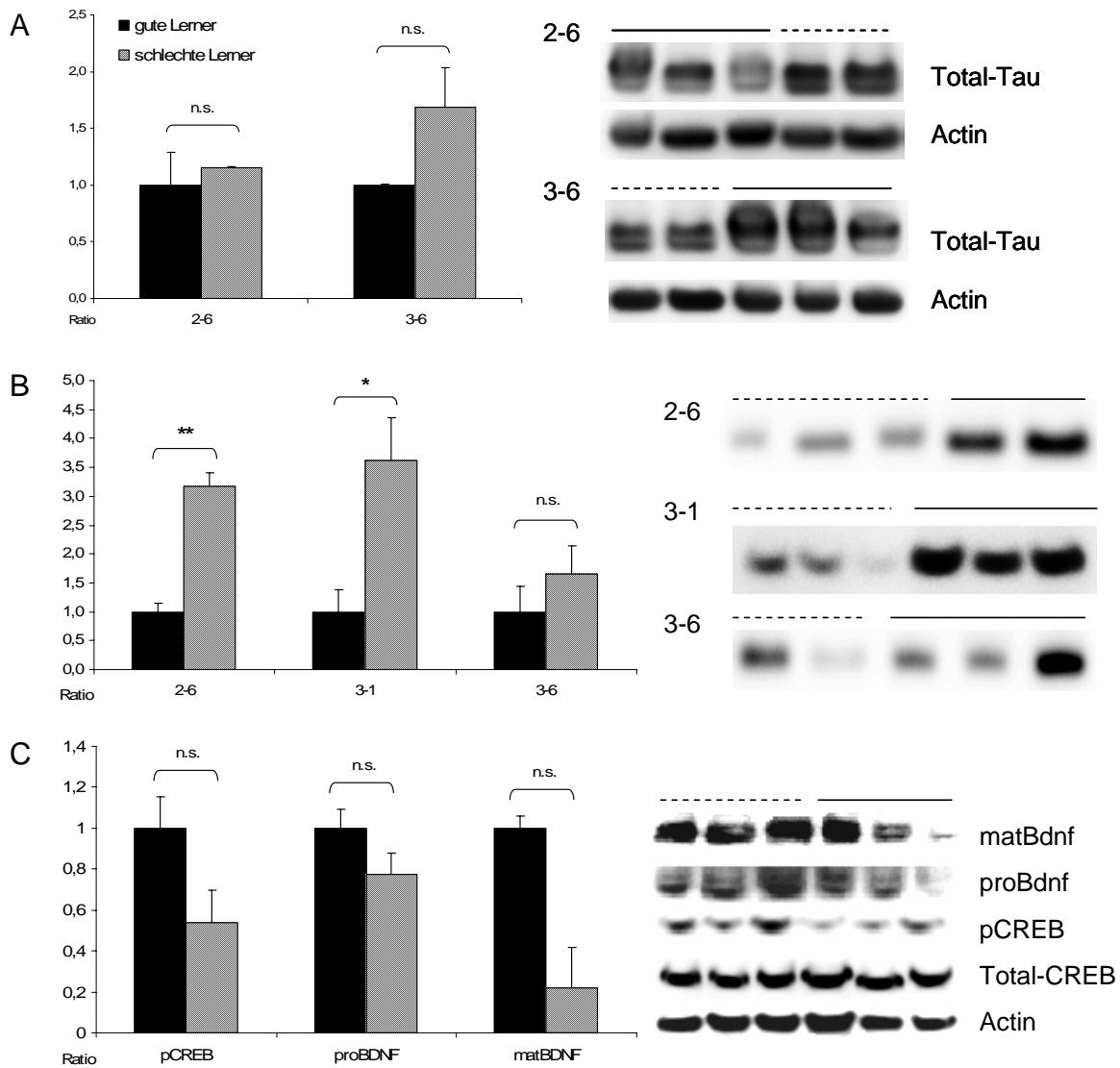


Abbildung 3.5: Lernassoziierte Proteinexpression im Hippokampus von guten und schlechten Lernern.

Es sind die mit den Western Blots (rechts) quantifizierten Signale \pm Standardfehler zur Expression von Tau (A) und PP1 (B) zu bestimmten Zeitpunkten sowie von einigen *Downstream*-Zielproteinen zu Zeitpunkt 3-1 (C) dargestellt. Die gestrichelten Linien über den Blots markieren die schlechten, durchgezogene Linien die guten Lerner. Der Durchschnittswert der guten Lerner wurde auf 1,0 gesetzt. Sterne markieren den signifikanten Unterschied zwischen den beiden Lerngruppen (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

4. Diskussion

Das Ziel dieser Doktorarbeit bestand darin, mit Hilfe der Methoden *Microarray* und *Real-Time PCR* die lernassoziierte Regulation von Genen während des mehrtägigen *Water Maze*-Trainingsprozesses zu untersuchen.

Die von Cavallaro *et al.* (2002; nach eintägigem *MWM*-Lernen von Ratten) sowie von Leil *et al.* (2002; nach dreitägigem *MWM*-Lernen von Mäusen) publizierten Genexpressionsdaten konnten in der hier präsentierten Studie nicht repliziert werden. So konnte weder die von Cavallaro und Mitarbeitern (2002) beschriebene lernabhängige Regulation des Gens *FGF-18* (*Fibroblast Growth Factor 18*, Abbildung 5) noch die von Leil und Kollegen (2002) detektierte *de novo*-Genexpression bestätigt werden.

Dies kann einerseits daran liegen, dass Leil *et al.* (2002) andere Mausstämme untersuchte. Andererseits wurden in beiden Genexpressionsstudien andere *Microarray*-Techniken angewandt. Während Cavallaro und Mitarbeiter (2002) einen *Affymetrix*-Genchip (siehe Kapitel 1.6) benutzten, wurde bei Leil *et al.* (2002) ein anderer Farbstoff (*Cy3/Cy5*) zur Markierung der *cDNA* verwendet als in dieser Studie. Auch wurden in beiden Arbeiten die *Microarray*-Rohdaten nicht mit der *LOWESS*-Methode normalisiert, die in dieser sowie in der Mehrzahl der jüngeren Studien Anwendung findet. Entsprechend der *MIAME*-Kriterien (Tabelle 1) ist daher ein Vergleich dieser mit den beiden Vergleichsstudien mit äußerster Vorsicht zu genießen. Auch ist zu bemerken, dass die noch junge Methode des *Microarray* viele „Knackpunkte“ (zum Beispiel Farbstodd-Bias, Normalisierung) aufweist, die zu falsch-positiven beziehungsweise falsch-negativen Ergebnissen führen können. Ein derzeit üblicher Ausweg ist die Verwendung zahlreicher Replikate, um die Aussagekraft der *Microarray*-Ergebnisse zu erhöhen.

Auch unterschied sich die Normalisierung der *Real-Time PCR*-Daten in beiden Vergleichsarbeiten von der hier präsentierten *qPCR*-Studie. Während Cavallaro und Mitarbeiter (2002) keine Angaben (!) zur verwendeten endogenen Kontrolle machen, wurden die *Ct*-Werte bei Leil *et al.* (2002) über *Gapdh* normalisiert.

In einer methodischen Untersuchung zur Genexpressionsstudie dieser Doktorarbeit wurden entsprechend die stabilste endogene Kontrolle für die *qPCR*-Studie (Kapitel 4.1.3) sowie der am besten geeignete Farbstoff für die *Microarray*-Experimente (Kapitel 4.1.1) ermittelt. Zudem wurde ein Auswertesystem entwickelt, das die Problematik des Farbstoff-*Bias* mit in die *Microarray*-Analyse einbezieht. Durch eine solche gesonderte Betrachtung der einzelnen Ratio-Werte ließe sich die kostspielige Untersuchung mehrerer technischer Replikate minimieren (Kapitel 4.1.2).

Durch die Klassifizierung von guten und schlechten Lernern im *MWM*-Test (Kapitel 4.2) kann die *de novo*-*mRNA*-Synthese mit der Lernleistung korreliert werden (Kapitel 4.4 und 4.5). In Kapitel 4.3 wird zudem der starke Einfluss der *MWM*-Testapparatur auf die Expression von Genen beschrieben.

4.7 Methodendiskussion

4.7.1 Vergleich der *Alexa*- und *Cy*-Farbstoffe im *Microarray*

In diesem methodischen Kapitel der Doktorarbeit werden die Farbstoffpaare *Alexa555/647* und *Cy3/Cy5* in Bezug auf Quantität und Qualität der im *Microarray* erzeugten Signale verglichen.

Wie bei Ballard und Mitarbeiter (2007) wurden signifikant stärkere Signale beim *Cy3/Cy5*-Farbstoff (Abbildungen 3.2.2 und 3.2.3) detektiert. Diese Feststellung steht im Gegensatz zu den Angaben der Herstellerfirma Invitrogen, die eine höhere Fluoreszenz des *Alexa*-Farbstoffs proklamiert (Abbildung 1.3B). Das Invitrogen-Handbuch zitiert hierbei die Arbeit von Cox *et al.* (2004), bei der die Fluoreszenz der markierten Einzelstrang-*cDNA* gemessen wurde. Die Studie von Ballard *et al.* (2007) sowie die hier präsentierte Farbstoffanalyse untersuchten hingegen die „tatsächlichen“ Signalwerte der mit der Ziel-*DNA* des Genchips hy-

bridisierten *cDNA* im *Microarray*-Experiment. Die geringere *Alexa*-Fluoreszenz im *Microarray*-Experiment kann damit begründet werden, dass die stark wasserlöslichen *Alexa*-Farbstoffe durch das Trocknen der *Slides* nach der Hybridisierung beziehungsweise vor dem Einscannen beeinträchtigt werden.

Qualitativ höherwertige Signale wurden hingegen mit dem *Alexa*-Farbstoff erzeugt. Sowohl innerhalb des Rot- oder Grün-Signals (Abbildung 3.2.4) als auch zwischen den beiden Signalen (Abbildung 3.2.5) wurden mit *Alexa555/647* geringere Varianzen gemessen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den von Cox *et al.* (2004) präsentierten Daten, die höhere Korrelationskoeffizienten beim *Alexa*-Farbstoff zeigen. Diesen höheren *Signal-Bias* beim *Cy*-Farbstoff erklären Cox *et al.* (2004) damit, dass die Fluoreszenz von *Cy3* und *Cy5* unterschiedlich stark ausgelöscht wird (*Fluoreszenz-Quenching*). Analog dazu begründen Ballard und Mitarbeiter (2007) den Unterschied zwischen den *Cy3*- und *Cy5*-Signalen mit der relativ geringeren Photostabilität des *Cy5*-Fluophors. Hierbei sei erwähnt, dass keine systematischen Unterschiede beim Einbau des Rot- und Grün-Farbstoffs in die *cDNA* bei *Cy3/Cy5* sowie bei *Alexa555/647* festgestellt wurden (Daten nicht angezeigt).

Für diese *Microarray*-Studie wurde entsprechend des geringeren Farbstoff-*Bias* (Unterschiede zwischen dem Rot- und Grün-Signal) des *Alexa555/647*-Farbstoffs gegenüber *Cy3/Cy5* die *Alexa*-Farbstoffkombination gewählt. Somit können die dargestellten Ergebnisse als stabiler im Vergleich zu Leil *et al.* (2002, 2003) angesehen werden.

4.1.2 Auswertung der *Microarray*-Daten

Um dem auch mit der *Alexa*-Variante erzeugten Farbstoff-*Bias* entgegenzuwirken, werden beim *Zwei-Farben-Microarray* so genannte *Dye-Swap*-Experimente (Abbildung 2.4) vorgeschlagen (Jin *et al.* 2001, Ramdas *et al.* 2001, Tseng *et al.* 2001, Dudoit *et al.* 2002, Yang *et al.* 2002, Yu *et al.* 2002). Dennoch kommt der „Rot/Grün-abhängigen“ Normalisierung von *Microarray*-Daten eine Schlüsselposition zuteil, da schwächere Signale einen anderen Rot/Grün-*Bias* aufzeigen als stärkere Signale. Zur Eliminierung dieses von der Intensität der jeweiligen *Spot*-Signale abhängigen Farbstoff-*Bias* wird aktuell die weit verbreitete *LOWESS*-Methode (Yang *et al.* 2002, Park *et al.* 2003, Do und Choi 2006), die auch für die Normalisierung in dieser Studie verwendet wurde (Abbildung 2.6), angewandt. Dennoch wurde beobachtet, dass die normalisierten Ergebnisse (Ratio-Werte) von Norm- und Revers-*Slide* zum Teil erheblich voneinander abweichen (siehe Beispiele in Abbildung 2.7C; Bartosiewicz *et al.* 2000, Taniguchi *et al.* 2001, Jin *et al.* 2001).

Um den Unterschieden zwischen den Norm- und Revers-*Slides* besondere Rechnung zu tragen, wurde ein Auswertesystem (Kapitel 2.6.4.2) entwickelt, das diese Unterschiede speziell berücksichtigt. Der in den Abbildungen 2.7 und 2.8 vorgestellte Farbkode stellt einen Prototyp für ein zwei Farben-*Microarray*-spezifisches computergestütztes Auswerteprogramm dar. Eine derartige Analyse beurteilt in einem ersten Schritt die Regulation eines Gens durch besondere Gewichtung der einzelnen Ratio-Werte auf dem Norm- im Vergleich zum Revers-*Slide* (Farbkode 1 zum *Dye-Swap*, Abbildung 2.7). In einem zweiten Schritt können die verschiedenen biologischen und technischen Replikate mit einem weiteren Kode ausgewertet werden, wobei in dem vorliegenden Fall zwei technische Replikate ausgewertet wurden (Farbkode 2, Abbildung 2.8). Die Verwendung von Farben und Symbolen dient zudem der übersichtlichen Darstellung der verschiedenen Genregulationen (Abbildung 5). Die Farbtöne wurden hierbei so gewählt, dass die Aussagekraft der beurteilten Regulation optisch erkennbar ist.

Zur Erhöhung der Validität der *Microarray*-Ergebnisse sind neben der Verwendung biologischer Replikate (biologische Varianz) auch zahlreiche technische Replikate von Nöten (Churchill 2002, Gusnanto *et al.* 2007), um die oben beschriebene Problematik der *Microarray*-Technik zu minimieren. So verwenden zum Beispiel Renthall *et al.* (2007) sechs biologische sowie sechs technische Replikate und analysierten die normalisierten *Microarray*-Daten mit Hilfe einer Varianzanalyse (ANOVA). Für solche statistisch abgesicherten *Microarray*-Analysen werden für Cy3/Cy5 eine zweifache Änderung in der Genexpression akzeptiert (Skena *et al.* 1995 und 1996, DeRisi *et al.* 1996 und 1997, Schultz *et al.* 2001), während Cox *et al.* (2004) für den Alexa-Farbstoff eine 1,3-fache Genregulation als *Cut-Off* vorschlagen. In der in Kapitel 3.3 vorgestellten *Microarray*-Analyse zur Detektion lernrelevanter Gene wurde ein *Cut-Off* von 1,5 gewählt sowie vier technische Replikate – zwei verschiedene RNA-Proben derselben Mäuse jeweils im *Dye-Swap*-Ansatz – verwendet. Aufgrund des großen Versuchsdesigns (Untersuchung von insgesamt 15 Zeitpunkten) wurde bei dieser *Microarray*-Studie auf biologische Replikate verzichtet, wobei zu jedem Zeitpunkt zur Erzeugung eines „Mittelwertes“ jeweils vier Mäuse gepoolt wurden. Aufgrund der Verwendung solcher *Pools* sowie der geringen Fallzahlen sind demnach die *Microarray*-Experimente – wie bei Cavallaro *et al.* (2002) und Leil *et al.* (2002) – in ihrer Aussagekraft eingeschränkt. Um dennoch einen Eindruck zu gewinnen, wurde eine Clusteranalyse aller mit $p < 0,05$ regulierten Gene durchgeführt.

4.1.3 Evaluation der stabilsten endogenen Kontrolle für die *Real-Time PCR*-Analyse

Die Frage nach dem am besten geeigneten Referenzgen für die Verwendung als endogene Kontrolle in *qPCR*-Experimenten wird seit Jahren diskutiert, zumal bekannt ist, dass diese Gene je nach experimenteller Situation und untersuchtem Gewebe eine variable Expression zeigen (Vandesompele *et al.* 2002, Johansson

et al. 2007). Obwohl mehrere Arbeiten zur Evaluation der optimalen endogenen Kontrolle veröffentlicht sind (Gerard *et al.* 2000, Vandesompele *et al.* 2002, Gutala und Reddy 2004, Johansson *et al.* 2007, Jung *et al.* 2007), wird in zahlreichen Untersuchungen ein (zufällig ausgewähltes?) Haushaltsgen als interne Referenz eingesetzt, ohne dessen Stabilität im Experiment überprüft zu haben.

In der Arbeit von Johansson und Mitarbeitern (2007) wird die unterschiedliche Stabilität von 16 Referenzgenen im frontalen sowie motorischen Kortex von Alkoholikern und Kontrollpersonen beschrieben. Während beispielsweise das Gen *Actb* (Aktin-Beta) die von all diesen Genen höchste Stabilität im frontalen Kortex aller untersuchten Personen aufweist, liegt es diesbezüglich im motorischen Kortex an viertletzter Stelle. Auch der Artikel von Vandesompele *et al.* (2002) zeigt die Heterogenität der Expression von Haushaltsgenen in verschiedenen Geweben sowie die enorme Bedeutung der Bestimmung der stabilsten endogenen Kontrolle, da die *qPCR*-Ergebnisse je nach verwendetem Referenzgen zum Teil deutlich voneinander abweichen können.

Die Gene *Gapdh* (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) und *Actb* sind die mit Abstand am häufigsten verwendeten endogenen Kontrollen in den verschiedensten Geweben. In den letzten Jahren hat *Rn18s* (ribosomale 18S-*rRNA*) zunehmend an Bedeutung für die Normalisierung bei *qPCR*-Experimenten gewonnen. Demnach wurden für die Genexpressionsstudie zu den *MWM*-Experimenten die drei Haushaltsgene *Gapdh*, *Actb* und *Rn18s* auf ihre Stabilität hin untersucht. Hierzu wurde die von Vandesompele und Mitarbeitern (2002) entwickelte *geNorm*-Methode benutzt und dabei *Actb* als das am besten geeignete Gen für die Verwendung als endogenen Kontrolle (Tabelle 3.6) detektiert.

Da Haushaltsgene je nach Experiment differentiell exprimiert werden können, wird in diesem methodischen Kapitel der Doktorarbeit vorgeschlagen, zu Beginn jeder Genexpressionsstudie eine Evaluation der Stabilität von Kandidatengenen für die Verwendung als interne Kontrolle durchzuführen.

4.8 Lernleistungsabhängige Klassifikation der FVB/NxC57Bl/6-Mäuse

Der von Morris und Mitarbeitern (1982) entwickelte *Water Maze*-Test mit der verborgenen Plattform ist ein weit verbreiteter und akzeptierter Test zur Überprüfung kognitiver Funktionen bei Nagetieren. Daher wird er häufig in präklinischen Studien zur Ermittlung beziehungsweise Beschreibung kognitiver Defizite eingesetzt (Zagreda *et al.* 1999, Mizoguchi *et al.* 2000, Chen *et al.* 2000, Morgan *et al.* 2000, Ramsden *et al.* 2005, Drapeau *et al.* 2007, Chrobak *et al.* 2008). Für diese Doktorarbeit wurde der MWM-Test eingesetzt, um Lern- und Gedächtnisspuren im Hippokampus zu erzeugen und eine damit einhergehende *de novo*-mRNA-Synthese zu untersuchen (Cavallaro *et al.* 2002, Leil *et al.* 2002 und 2003, Aguilar-Valles *et al.* 2007).

In der vorliegenden Studie wurden FVB/NxC57Bl/6-Mäuse verwendet, um die Ergebnisse dieser F1-Hybride in zukünftigen Studien mit vorhandenen Mutanten eines Alzheimer-Modells mit gleichem genetischen Hintergrund vergleichen zu können. Die Tiere lieferten eine typische Lernkurve (Abbildung 3.1.2), die diese F1-Generation auch bei den *MWM*-Versuchen von Owen und Mitarbeitern (1997) zeigte. Diese Autoren demonstrieren zudem, ebenso wie Royle *et al.* (1999) und Voikar *et al.* (2001), die deutlich schlechtere Lernleistung von FVB/NJ-Mäusen in der *Water Maze* als beispielsweise der C57Bl/6J-Stamm oder die FVB/NxC57Bl/6-Hybride. Obwohl Mineur und Crusio (2002) in FVB-Mäusen eine von anderen Mausstämmen abweichende Anatomie der Moosfasern im Hippokampus beschreiben, ist nicht geklärt, ob die beobachteten Lerndefizite in diesem Inzucht-Stamm tatsächlich auf kognitiven Defiziten beruhen. Andere Gründe können zum Beispiel Hyperaktivität (Voikar *et al.* 2001, Mineur und Crusio 2002) sowie die homozygote *rd*-Mutation sein, die zu einer visuellen Beeinträchtigung bei den Tieren führt (Giménez und Montoliu 2001). Mineur und Crusio (2002) detektierten zudem ein signifikant erhöhtes Angstverhalten der FVB-Tiere im *Elevated Plus Maze*-Test im Vergleich zu C57Bl/6J-Mäusen, die allerdings im Gegensatz zu den Aussagen von Voikar und Mitarbeiter (2001) steht.

Entsprechend kann man annehmen, dass die FVB/NxC57Bl/6-Tiere möglicherwei-

se bezüglich Neuroanatomie, Sehfähigkeit, Angstverhalten, Aktivität sowie der Lernleistung einen intermediären Phänotyp darstellen. Auf jeden Fall bleibt festzuhalten, dass durch die Kreuzung der beiden Inzuchtstämme FVB/N und C57Bl/6 die genetische Diversität innerhalb des F1-Hybridstammes erhöht wird. Diese Annahme könnte die in dieser Studie beobachteten, zum Teil erheblichen individuellen Unterschiede in der *MWM*-Lernleistung erklären. Aufgrund der großen Lernunterschiede zwischen den Individuen innerhalb der F1-Kohorte ist nicht auszuschließen, dass potentiell schlechte *MWM*-Lerner auch in den Kontrollgruppen (KK, SK), die nicht bezüglich ihrer *MWM*-Lernleistung untersucht werden konnten, vorhanden waren. Um dieser Problematik gerecht zu werden, wurden die beiden Testgruppen gute und schlechte Lerner klassifiziert (Kapitel 2.3 und 2.9) und direkt miteinander verglichen. Durch diesen direkten Vergleich der *mRNA*-Synthese in beiden Gruppen konnte die Expression bestimmter Gene mit der unterschiedlichen Lern- (Abbildung 3.1.4) und Gedächtnisleistung (Abbildung 3.1.6) korreliert werden. In beiden Gruppen wurden keine Unterschiede bezüglich Schwimmaktivität und Motivation beobachtet (Abbildung 3.1.5), so dass die Lernunterschiede auf „kognitive Faktoren“ zurückgeführt werden können und entsprechend Expressionsuntersuchungen zu lernrelevanten Genen sinnvoll sind.

Schulz und Mitarbeiter (2002), die gealterte Wistar-Ratten gemäß ihrer *MWM*-Lernleistung in zwei Lerngruppen unterteilten, beschreiben eine Korrelation zwischen der *MWM*-Leistung der guten und schlechten Lerner und den in Hippokampus-Schnitten dieser Tiere erzeugten *LTP* und *STP*. Die Autoren zeigen zudem ein verstärktes *Thigmotaxis*-Verhalten bei den schlechten Lernern. Dieses vermehrte Schwimmen im Bereich der Wand der *Water Maze* kann mit der Vermeidung des „offenen Gewässers“, also mit erhöhtem Angstverhalten erklärt werden (Bonsignore *et al.* 2008). Analog dazu illustrieren zahlreiche Autoren (Gold 1995, Liebsch *et al.* 1998, Morley *et al.* 2001, Ramos *et al.* 2003, Herrero *et al.* 2006) einen negativen Einfluss von verstärktem Angstverhalten auf die Lernfähigkeit. Ebenso ist ein negativer Einfluss von übermäßigen Stressreaktionen auf das *MWM*-Lernen beschrieben (Hölscher 1999, Roozendaal 2003, Beiko *et al.* 2004, Venero *et al.* 2004). Entsprechend ist es möglich, dass

die hier beobachteten Lerndefizite bei einigen Individuen auf ein verstärktes Angst-/Stressverhalten zurückzuführen sind.

In Studien an Auszucht-Mäusen – denen eine größere genetische Diversität sowie eine größere „Nähe“ zu natürlichen Populationen zugeschrieben wird als den Inzuchtstämmen – wurde ein „genereller kognitiver Faktor“ aus den Ergebnissen verschiedener Lerntests ermittelt (Galsworthy *et al.* 2002, Matzel *et al.* 2003, Kolata *et al.* 2005). Schulz und Kollegen (2002) konnten entsprechend die Ergebnisse aus *Water Maze*, *Open Field* und Elektrophysiologie korrelieren.

In dieser Doktorarbeit konnten die unterschiedlichen Lern- (Abbildung 3.1.4) und Gedächtnisleistungen (Abbildung 3.1.6) in den beiden Lernleistungsgruppen mit Unterschieden in der *de novo*-mRNA-Synthese (Abbildung 3.4.7) korreliert werden und damit ein Zusammenhang zwischen kognitiver Leistungsfähigkeit und Genexpression aufgezeigt werden.

4.9 Regulation von Genen durch *MWM*-Erfahrung

In diesem Teil der Studie wurde der Einfluss der *MWM*-Erfahrung auf die Genexpression im *qPCR*-Experiment untersucht. Während die *MWM*-Durchläufe am ersten Tag für die Mäuse eine neue unbekannte Situation bedeuten (*NS*, *Novelty* und *Stress*), können sich die Tiere in den darauf folgenden Tagen an diese Prozedur gewöhnen (*Habituation*), wobei *Habituation* eine Abnahme der Reizantwort auf wiederholte Stimuli bedeutet (Hanser 2001, Holmes *et al.* 2006). Auch könnte, wie bei Cavallaro *et al.* (2002) beschrieben, die Schwimmaktivität Einfluss auf die Genexpression im Hippokampus nehmen. Eine solche Beziehung wird jedoch nicht angenommen, da diese Hirnregion, die für die Bildung von Langzeitgedächtnisinhalten sowie für das räumliche Lernen essentiell ist, eher marginal – wenn überhaupt – an der Verarbeitung motorischer Aspekte beteiligt ist.

In dieser Studie führte die *NS*-Situation an *MWM*-Tag 1 im Hippokampus zu einer Hochregulation von drei der insgesamt 13 untersuchten Gene. Die schnelle Hoch-

regulation vom Stresshormon-Gen *Crh* kann einer Stressantwort (Herman *et al.* 1995, Givalois *et al.* 2000, Vellucci und Parrott 2000, Sillaber *et al.* 2002), die von *mt-CO1* mit erhöhter neuronaler Aktivität (Gunter *et al.* 1994, Hevner und Wong-Riley 1993, Williams *et al.* 1998, Gutsaeva *et al.* 2006) und die des lernassoziierten Gens *Kibra* einem dem neuen *MWM*-Stimulus assoziierten Lern- und Gedächtnisprozess (Papassotiropoulos *et al.* 2006, Nacimas *et al.* 2008) zugeordnet werden (Abbildung 3.4.3).

Eine Bedeutung des Hippokampus für die *Novelty*-assoziierte Gedächtnisbildung (*Novelty-Encoding Hypotheses* von Tulving *et al.* 1996) ist mehrfach beschrieben (Knight 1996, Suzuki 1999, Brown und Aggleton 2001, Yamaguchi *et al.* 2004, Köhler *et al.* 2005, Hasselmo und Stern 2006, Kumaran und Maguire 2007). Auch ist bekannt, dass diese limbische Struktur bei der Verarbeitung von Stress eine wichtige Rolle spielt. Die mit dieser Untersuchung zu *MWM*-Tag 1 vergleichbare Arbeit von Cavallaro *et al.* (2002) konnte im *Microarray*-Experiment zeigen, dass nach der ungewohnten *NS*-Situation eine mindestens zweifache Regulation von insgesamt 345 Genen im Hippokampus von Ratten stattfindet, die die Autoren als *Physical Activity-Related Genes* bezeichnen. Wie oben beschrieben, wird die hier detektierte *de novo*-Genexpression hingegen als Stressantwort sowie mit impliziten Lernprozessen erklärt, die mit der Verarbeitung der neuen Situation (*Novelty*) assoziiert sind. Diese Annahme wird durch die Angaben von Winograd und Viola (2004) unterstützt, die eine Phosphorylierung von CREB, also der Stimulation von Genexpression, mit *Novelty* in Verbindung bringen, während sie bei einer wiederholten *Open Field*-Situation im Hippokampus von Ratten keine *de novo*-Aktivität dieses Transkriptionsfaktors beobachteten.

Bereits im Jahre 1963 beschrieb Sokolov, dass die neuronale Antwort auf neue Stimuli mit zunehmendem Bekanntheitsgrad des Reizes abnimmt (Habituation). Auch bei diesem impliziten Lern- und Gedächtnisprozess spielt der Hippokampus eine wichtige Rolle (Cerbone und Sadile 1994, Bunsey und Eichenbaum 1996, Yamaguchi *et al.* 2004, Fernández und Tendolkar 2006). Die PET-Studie von Tulving und Kollegen (1996) zeigt, dass die neuronale Aktivität im Temporallappen signifikant abnimmt, wenn den Probanden visuelle Stimuli wiederholt gezeigt werden. Auch Yamaguchi und Mitarbeiter (2004) beschreiben

die Abnahme der neuronalen Aktivität durch Habituation (Überblick in Ranganath und Rainer 2003, Nyberg 2005). Diese Aussagen stehen im Einklang mit den hier präsentierten *qPCR*-Ergebnissen, die eine Herunterregulation von allen untersuchten Genen inklusive die des Markers für neuronale Aktivität (*mt-CO1*) ab *MWM*-Tag 2 zeigen (Abbildung 3.4.3).

Da an *MWM*-Tag 4 in Hippokampus und Cerebellum eine analoge Herunterregulation von *PP1*, *Kibra*, *Dnmt3b* und *mt-CO1* gemessen wurde (Abbildung 3.4.4), wird hier vermutet, dass beide Hirnregionen bei dem mit Habituation assoziierten impliziten Lernen zusammenarbeiten. Diese Annahme wird durch die Behauptung von Petrosini (2007) unterstützt, dass das Kleinhirn mit anderen für die Gedächtnisbildung essentiellen Hirnregionen bei der Erarbeitung von Handlungsstrategien interagiert. Entsprechend zeigen nicht nur Mäuse mit Läsionen im Hippokampus (unter anderem Morris *et al.* 1982), sondern auch Tiere mit cerebralen Schädigungen verschlechterte Lernleistungen in der *Water Maze* (Lalonde 1994, Lalonde und Strazielle 2003, Martin *et al.* 2003). Die Herunterregulation von *Dnmt3b* in beiden Hirnregionen führt zudem zu der Annahme, dass möglicherweise epigenetische Vorgänge bei molekularen Habituationsprozessen eine Rolle spielen.

Die in Abbildung 3.4.5 dargestellte *qPCR*-Messung zeigt, dass *Bdnf* (ca. 16-fach) stärker im Hippokampus sowie die Gene *PP1* (ca. 11-fach), *Dnmt3b* (ca. 5-fach), *mt-CO1* (ca. 2-fach) und *Kibra* (ca. 1,7-fach) im Cerebellum stärker exprimiert wurden. Dies weist darauf hin, dass sich hier die der Habituation zugrunde liegenden molekularen Prozesse in beiden Hirnregionen unterscheiden. Die Beobachtung, dass die Unterschiede bei *PP1*, *Kibra*, *Dnmt3b* und *mt-CO1* in den „*MWM*-Gruppen“, also nicht in der Test-naiven KK-Gruppe (Abbildung 3.4.5), gefunden wurden, unterstützt diese Vermutung, dass in beiden Gehirnarealen unterschiedliche Habituationsprozesse ablaufen.

Mit dieser Studie wurde also gezeigt, dass sich *MWM*-Erfahrung auf die Transkription von Genen auswirkt. Während die *NS*-Situation (Tag 1) zu einer verstärkten *mRNA*-Synthese einiger Gene im Hippokampus führte, wurde diese im Zuge der Habituation der Tiere an die *MWM*-Situation (Tage 2 bis 5) deutlich zurückgefahren.

4.10 Regulation von Genen bei effizientem *MWM*-Lernen

4.4.1 Detektion Mitochondrium-assoziiierter Gene im *Microarray*

Die *Microarray*-Studie lieferte eine gleichartige Regulation der mitochondrialen Gene *mt-Nd1* und *mt-Nd6* (Komplex I), *mt-Cytb* (Komplex III) und *mt-CO1* (Komplex IV) der Atmungskette (siehe Abbildung 1.5) während des mehrtägigen *MWM*-Lernens (Abbildung 3.3.1, Tabellen 3.1 und 3.2). Dieser Befund steht im Einklang mit den von Williams und Mitarbeitern (1998) publizierten *in vitro*-Ergebnissen, die nach hochfrequenter Stimulation des *Tractus Perforans* eine gemeinsame Hochregulation von *mt-Nd6*, *mt-Cytb* und *mt-CO1* zeigen. Diese sowie die in Kapitel 3.3 beschriebene Beobachtung scheint auch nicht verwunderlich, da zum Beispiel die *mRNA*'s von *mt-Nd1*, *mt-Cytb* und *mt-CO1* von derselben Prä-*mRNA* abstammen, während *mt-Nd6* aus einem vom inneren *mtDNA*-Strang kodierten Prä-Transkript herausgeschnitten wird (Abbildung 1.9). Dennoch bleibt festzuhalten, dass während eines mehrtägigen *MWM*-Lernprozesses offensichtlich der innere und äußere Strang des Mitochondriengenoms simultan „abgelesen“ wurden sowie die hier detektierten mitochondrialen *mRNA*'s die gleiche Stabilität aufwiesen.

Zusätzlich beschreiben Liang *et al.* (2006) die gleichgeschaltete transkriptionelle Antwort aller drei mitochondrial sowie zehn nukleär kodierten Gene des Cytochrom C-Oxidase-Komplexes (Abbildung 1.10) in primären neuronalen Zellkulturen sowohl nach Depolarisation (Hochregulation) als auch nach Blockade von Na⁺-Kanälen (Herunterregulation). Dies entspricht dem Befund, dass das nukleär kodierte *Cox8a* ein den mitochondrialen *CO*-Genen ähnliches Regulationsmuster aufzeigte (Tabelle 3.1 und 3.2).

Im Zellkern kodierte und im Zytoplasma synthetisierte Proteine werden über Translokasen in der äußeren (*Tomm*-Gene) und inneren (*Timm*-Gene) Mitochondrienmembran in die Mitochondrienmatrix transportiert (Überblick in Kutik *et al.* 2007, Perry *et al.* 2008). Die mit der lernassoziierten Regulation der Atmungskettengene vergleichbaren Expressionsmuster von *Timm8a*, *Timm8b* und *Timm13* (Tabellen 3.1 und 3.2) weisen darauf hin, dass diese Translokase-Gene offensichtlich durch neuronale Aktivität – die Gene der Atmungskette wie *mt-CO1* werden als molekularer Marker für neuronale Aktivität angesehen (Hevner und Wong-Riley 1991) – reguliert werden. Da der Energiemetabolismus in Neuronen aktiv auf der genetischen Ebene reguliert wird (Hevner und Wong-Riley 1991 und 1993, Bindokas *et al.* 1998, Yang *et al.* 2006), wird hier ein Zusammenhang zwischen erhöhtem Energiebedarf der hippokampalen Neurone, der lernassoziierten Synthese der Atmungskette und dem damit verbundenen Import nukleär kodierter Proteine (wie zum Beispiel von *Cox8a*) sowie der Produktion neuer Translokasen postuliert. Diese Hypothese wird auch durch die Arbeiten von Conejo und Mitarbeitern unterstützt, die einen erhöhten Energiemetabolismus in den Mamillarkörpern (2004) und im Hippokampus (2007) mit dem *Water Maze*-Lernen assoziieren. Es ist auch möglich, dass durch das mehrtägige *MWM*-Lernen zur Deckung des erhöhten Energiebedarfs ganze Mitochondrien (Überblick in Kann und Kovács 2007) in den hippokampalen Neuronen und Gliazellen synthetisiert werden. Daher werden zukünftige Studien vorgeschlagen, die die Expression von mitochondrial sowie nukleär kodierten *mRNA*'s und Proteinen untersuchen, die bei der Synthese neuer Mitochondrien eine Rolle spielen.

Um die *Microarray*-Ergebnisse zur lernassoziierten Regulation von *mt-CO1* auf ihre biologische Varianz hin zu überprüfen, wurde anschließend die Regulation der *mRNA* dieses mitochondrialen Gens an Einzelmäusen im *qPCR*-Experiment gemessen. Hierbei wurde aufgrund von dessen Bedeutung bei der neuronalen Plastizität sowie bei der CREB-abhängigen Regulation (siehe Abbildung 1.2) zusätzlich das in der *Microarray*-Studie nicht auffällige Gen *Bdnf* (Abbildung 5, Tabelle 5) untersucht.

4.4.2 Detektion lernassoziierter Gene in der *Real-Time PCR*

Während bei den schlechten Lernern keine Verbesserung der Lernleistung beobachtet wurde, zeigten die guten Lerner signifikante Lernverbesserungen zwischen aufeinander folgenden Lerntagen in der *Water Maze* (Abbildung 3.1.4). Daher wurde dieses sich über vier Tage erstreckende *MWM*-Lernen als ein vierstufiger Lernprozess charakterisiert (Abbildung 4.1).

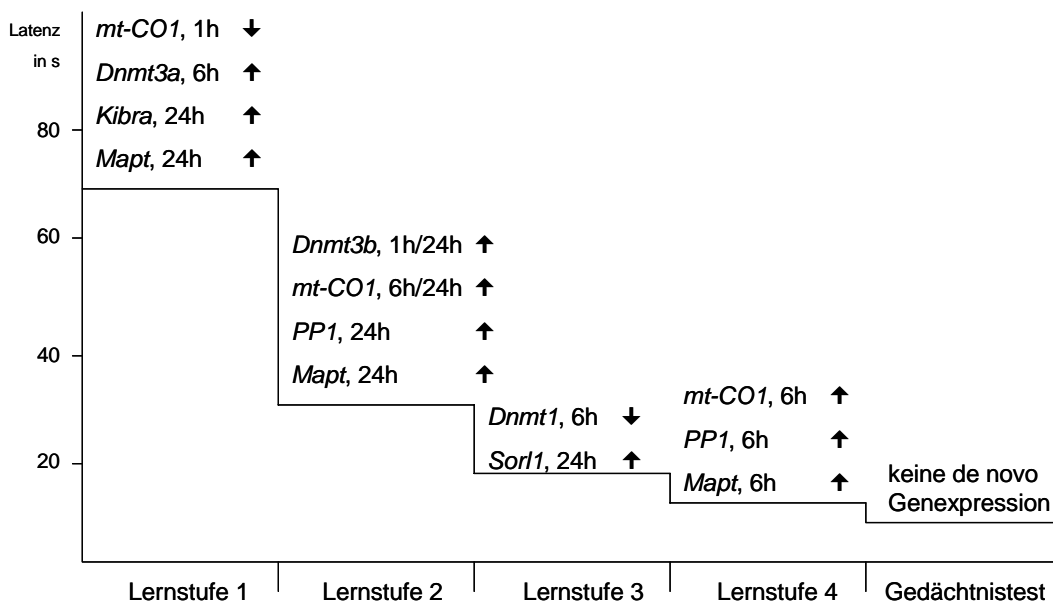


Abbildung 4.1: Genregulation während des vierstufigen *MWM*-Lernprozesses.

Es sind die in Abbildung 3.4.6 angezeigten lernassozierten Genregulationen im Hippokampus schematisch dargestellt. Die Stundenwerte geben den Zeitpunkt der Probenentnahme nach dem jeweils letzten Schwimmdurchlauf an; jede Lernstufe beinhaltet vier Durchläufe. Die Pfeile zeigen die Richtung der mit dem *MWM*-Lernen assoziierten Genregulation an (↑ Hochregulation, ↓ Herunterregulation).

Während des effizienten *MWM*-Lernens (gL/SK-Vergleichs) wurden fast ausschließlich hochregulierte Gene detektiert, das heißt, es fand eine *de novo*-*mRNA*-Synthese statt, die mit effizientem *Water Maze*-Lernen assoziiert werden kann. Ausnahmen bildeten hierbei die schwer zu deutende Herunterregulation des Energiemarkers *mt-CO1* unmittelbar nach dem ersten Lernblock sowie die spätere Repression des *Dnmt1*-Gens (Abbildung 3.4.6A). Dennoch kann die Hochregulation von *mt-CO1* zu späteren Zeitpunkten (Abbildungen 3.4.6B und 4.1) dem erhöhten Energiebedarf der hippokampalen Neurone und Gliazellen während des *MWM*-Lernens zugeordnet werden. Ein erhöhter Energiemetabolismus, der mit erhöhter *mt-CO1 mRNA*-Synthese assoziiert ist (Hevner und Wong-Riley 1991, 1993), ist für den Hippokampus nach dem räumlichen Lernen in der *Water Maze* (Conejo *et al.* 2007) sowie in der *Radial Arm Maze* (Ros *et al.* 2006) dokumentiert. Entsprechend kann die von Williams und Mitarbeiter (1998) detektierte simultane Hochregulation verschiedener mitochondrialer Atmungskettengene nach hochfrequenter Stimulation des *Tractus Perforans* mit dem erhöhten Energiebedarf dieser Neurone begründet werden. Hierbei wird das an der Atmungskette produzierte ATP für die Funktion der Na^+/K^+ -ATPasen, für den schnellen axonalen Transport sowie für die Synthese von Makromolekülen und Neurotransmittern benötigt (Wong-Riley 1989).

Es wurde zudem eine Hochregulation von *Dnmt3a* (Lernstufe 1) und *Dnmt3b* (Lernstufe 2) sowie die Repression des Gens *Dnmt1* (Lernstufe 3) (Abbildung 4.1) detektiert. Es ist also möglich, dass während der ersten beiden Lernstufen – nicht jedoch an den darauf folgenden Lerntagen – eine *de novo*-Methylierung stattfindet. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *mRNA* dieser drei *DNMT*'s während des *MWM*-Lernens in unterschiedlicher Art und Weise reguliert wurde beziehungsweise dass alle drei *DNMT*-Gene in das räumliche Lernen involviert waren. Die Ergebnisse stehen damit im Einklang mit den Aussagen von Miller und Sweatt (2007, *Dnmt3a* und *Dnmt3b*) sowie mit Rampon *et al.* (2000, *Dnmt1*), die eine mögliche Rolle dieser drei *DNMT*'s in Lern- und Gedächtnisprozessen postulieren.

Die CpG-Inseln im 5'-Bereich der Gene *Bdnf* (Martinowich *et al.* 2003) und *Reelin* werden von Levenson und Mitarbeitern (2006) als Ziel von *de novo*-Methylierung beziehungsweise -Demethylierungen beschrieben. Die verstärkte Synthese von *Dnmt3a*- und *Dnmt3b*-mRNA an den MWM-Tagen 1 und 2 könnte demnach dazu führen, dass die *de novo*-Expression von *Bdnf* und *Reelin* zu Beginn des MWM-Lernens unterdrückt wird. Da mit den hier verwendeten Primern die ExonI- und II-Transkripte des *Bdnf*-Gens detektiert wurden, ist es jedoch möglich, dass nicht diese sondern die ExonIII-Splicevariante in das MWM-Lernen involviert ist. Allerdings zeigen Levenson und Kollegen (2006), dass der ExonI-Promotor ein Ziel epigenetischer Regulation ist. Den hier präsentierten Ergebnissen zufolge spielten offensichtlich die *Bdnf*-ExonI/II-Transkripte beim MWM-Lernen keine Rolle, während mit dieser Arbeit keine Aussagen über die Bedeutung der ExonIII-Variante bei diesem räumlichen Lerntest getroffen werden kann. Bisher ist keine mit dem räumlichen Lernen assoziierte Regulation der mRNA-Synthese von *Reelin* beschrieben. Auch die von Miller und Sweatt (2007) beschriebene Hochregulation von *Reelin* ist sehr wahrscheinlich der Stresskomponente des *Fear Conditioning*-Tests zuzuschreiben. Beffert und Kollegen (2005) zeigen, dass die Reelin-abhängige Phosphorylierung des NMDA-Rezeptors die korrekte Expression des Exon19-enthaltenden Transkripts des Reelin-Rezeptors Apoer2 benötigt. Demnach hängt ein erfolgreiches MWM-Lernen nicht direkt von der *de novo*-mRNA-Synthese von *Reelin* ab, sondern vom akkuraten Spleißen von Apoer2-Transkripten, zumal Apoer2/Exon19-defiziente Mäuse ein verschlechtertes Lernen in Hippokampus-abhängigen Lerntests zeigen (Beffert *et al.* 2005, Barr *et al.* 2007). Folgerichtig zeigen auch heterozygote Reeler-Mäuse – die eine Mutation im *Reelin*-Gen tragen – ähnliche MWM-Ergebnisse wie Wildtyp-Mäuse, während sie schlechtere *Fear Conditioning*-Lernleistungen sowie eine geringere hippokampale Plastizität zeigen (Qiu *et al.* 2006). Das Fehlen der *de novo*-mRNA-Synthese von *Bdnf* (Exon I+II) sowie von *Reelin* lässt jedoch den Schluss zu, dass strukturelle Veränderungen an den hippokampalen Synapsen während des MWM-Lernens eine eher untergeordnete Rolle spielen.

Ein weiteres Zielgen der DNMT's ist *PP1* (Abbildung 1.4, Miller und Sweatt 2007), bei dem eine erhöhte *mRNA*-Synthese an den *MWM*-Tagen 2 und 4 gemessen wurde. Während Miller und Sweatt (2007) eine Repression der Synthese von *PP1-mRNA* mit einer Hochregulation der Gene *Dnmt3a* und *Dnmt3b* und dem „Stress-einschließenden“ *Fear Conditioning*-Protokoll assoziieren, wurde eine simultane *de novo-mRNA*-Synthese von *PP1* und *Dnmt3b* bei der hier verwendeten „Stress-ausschließenden“ *Water Maze*-Untersuchung detektiert. Diese gleichzeitige Hochregulation der beiden Gene lässt den Schluss zu, dass der *PP1*-Promotor nicht das Ziel der *Dnmt3b* ist. Es wird zudem angenommen, dass die *PP1*-Herunterregulation bei Miller und Sweatt (2007) durch Stress hervorgerufen wird, wobei dieses Gen keine Änderung bei der *mRNA*-Synthese beim mit „milderen“ *MWM*-Stress assoziierten SK/KK-Vergleich an Tag 1 (Abbildung 3.4.3) zeigte. Genoux und Kollegen (2002) behaupten, dass lange Intervalle (30-60 Minuten) zwischen den *MWM*-Durchläufen – bei unserer Studie lagen 24 Stunden zwischen den einzelnen Lernblöcken – das Lernen fördert sowie die *PP1*-Aktivität senkt, die sie allerdings auf die erhöhte Synthese von *Inhibitor I1-mRNA* zurückführen. Entsprechend zeigen Ratten, denen der *PP1*-Inhibitor Calyculin A in den Hippokampus injiziert wurde, Defizite im *MWM*-Lernen (Sun *et al.* 2003). Dies bestätigt die Hypothese, dass *PP1* als „Gegenspieler“ der lernabhängigen Kinasen eine wichtige physiologische Funktion beim Lernen besitzt. Demzufolge ist es auch logisch, dass das *PP1*-Gen während eines Lernprozesses reguliert wird. Mit der hier präsentierten Studie konnte gezeigt werden, dass während des *MWM*-Lernprozesses eine *de novo*-Synthese von *PP1-mRNA* stattfindet, welche mit der Hochregulation von *mt-CO1* (Abbildung 4.1) und damit einer erhöhten Energieproduktion einherging. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Aussage von Munton *et al.* (2004), dass *PP1* bei der Regulation des Glukose-Metabolismus mitwirkt.

Es wurde auch eine simultane *mRNA*-Synthese von *PP1* und *Mapt* während der Lernstufen 2 und 4 detektiert. Liao und Mitarbeiter (1998) beschreiben die vermittelnde Funktion von Tau-Protein bei der Entstehung von LTD, indem es für die Verankerung von *PP1* an die Mikrotubuli sorgt. Die Bedeutung von Tau bei Lernen und Gedächtnis wird von Dixit und Kollegen (2008) unterstützt, die mit

ihrer Motorprotein-Studie zeigen, dass Tau den axonalen Transport reguliert. Auf jeden Fall lieferten die hier erarbeiteten Daten weitere Beweise dafür, dass Tau eine wichtige Funktion beim Lernen besitzt, da eine lernassoziierte Synthese von *Mapt-mRNA* während der Lernstufen 1, 2 und 4 detektiert wurde (Abbildung 4.1). Zeitgleich mit *Mapt* wird an Lerntag 1 die *Kibra-mRNA* hochreguliert. Das Kibra-Protein besitzt wie die PIN1 (Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase) eine WW-Domäne (Kremerskothen *et al.* 2003), mit der PIN1 an das Tau-Protein binden kann (Lu *et al.* 1999). Es sind auch Interaktionen von Kibra mit Dendrin (Kremerskothen *et al.* 2003) – einem potentiellen Regulator des postsynaptischen Zytoskeletts – sowie dem mit dem Motorprotein Dynein (DLC1) (Rayala *et al.* 2006) beschrieben. Daher ist es möglich, dass neben Tau auch Kibra an Zytoskelett-Umstrukturierungen und/oder an axonalen Transportprozessen beteiligt ist und somit eine wichtige Funktion bei der synaptischen Plastizität aufweist. Rayala und Kollegen (2006) vermuten jedoch eine transkriptionelle Rolle des Kibra-DLC1-Komplexes und schlagen ein Modell vor, bei dem Kibra simultan mit DLC1 und Histon H3 interagiert und somit genregulatorische Aufgaben übernimmt. Die Bedeutung von Kibra bei Lern- und Gedächtnisprozessen (Papassotiropoulos *et al.* 2006, Nacimas *et al.* 2008) sowie beim altersbedingten kognitiven Abbau (Schaper *et al.* 2007, Rodríguez-Rodríguez *et al.* 2007, Almeida *et al.* 2008) ist für den Menschen beschrieben, wobei hierzu keine Genexpressionsdaten bekannt sind. Entsprechend lieferte diese Studie erste Beweise für eine lernassoziierte Synthese von *Kibra-mRNA*.

Das einzige an Lerntag 3 hochregulierte Gen war *Sorl1* (Abbildung 4.1). Dieser Befund entspricht den Angaben von Sager *et al.* (2007), die eine Korrelation zwischen verringerter *Sorl1*-Expression und verschlechterten kognitiven Funktionen fanden. Entsprechend beschreiben Scherzer und Kollegen (2004) eine Herunterregulation von *Sorl1* in Patienten mit Alzheimer Demenz. Die verringerte *Sorl1*-Expression wird von Rogaeva und Mitarbeitern (2007) als ein erster Schritt in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit angesehen, so dass die akkurate Expression von *Sorl1* möglicherweise für ein funktionales Lern- und Gedächtnissystem von Bedeutung ist. Das *Sorl1*-Gen kodiert für einen *Sorting*-Rezeptor, der zwischen Golgi-Apparat und Plasmamembran hin und her transpor-

tiert wird (Andersen *et al.* 2005). Man kann annehmen, dass Sorl1 beim Transport von Proteinen vom Zellsoma in die Zellperipherie (und umgekehrt) eine wichtige Funktion übernimmt. Hierbei ist eine Bindung von Sorl1 an APP (Andersen *et al.* 2005, Rogaeva *et al.* 2007) sowie an ApoE (Jacobsen *et al.* 2001) beschrieben. Wie auch immer, diese Studie lieferte erste Beweise dafür, dass eine *de novo*-Synthese von *Sorl1-mRNA* im Hippokampus bei intakten Lern- und Gedächtnisprozessen stattfand.

Auffällig war, dass nach dem Gedächtnistest an *MWM*-Tag 5 keines der hier untersuchten Gene (*Bdnf*, *Reelin*, *PP1*, *Kibra*, *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Mapt*, *Gap43*, *Sorl1*, *APP*) reguliert wurde (Abbildung 4.1). Dies zeigt, dass weder die durch das Entfernen der Plattform neu auftretende Stresskomponente noch das Suchen nach der imaginären Plattform in diesem *Probe Trial* einen Effekt auf die *de novo-mRNA*-Synthese dieser Gene in der Lerngruppe hat. Während also während des viertägigen *MWM*-Lernens *de novo-mRNA*-Synthese stattfand, konnte diese beim *Probe Trial* nicht nachgewiesen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass beim Abrufen von abgespeicherten Informationen keine Synthese neuer *mRNA* sowie von Proteinen im Hippokampus erfolgt.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass erstens an verschiedenen Zeitpunkten während des *MWM*-Lernprozesses die Synthese neuer *mRNA* erfolgt. Zweitens wurde eine Hochregulation des Energiemarkers *mt-CO1*, der lernassoziierten Gene *PP1* und *Kibra*, der *de novo-DNA*-Methylierungsgene *Dnmt3a* und *Dnmt3b* sowie der bei Alzheimer Demenz eine Rolle spielenden Gene *Mapt* und *Sorl1* detektiert. Keine *de novo-mRNA*-Synthese fand sich bei den mit dem neuronalen Wachstum assoziierten Gene *Bdnf* (ExonI+II) und *Reelin*, der *Steady State-DNA*-Methyltransferase *Dnmt1* sowie der Alzheimer-Biomarker-Gene *APP* und *Gap43*. Obwohl also aktuell eine Bedeutung von APP und Gap43 bei der synaptischen Transmission diskutiert wird (siehe Kapitel 1.7.2), wurde beim *MWM*-Lernen in dieser Studie keine Regulation der APP-beziehungsweise *Gap43-mRNA* festgestellt.

4.5 Expression von Genen und Protein bei verschlechtertem *MWM*-Lernen

Die Gruppe der schlechten Lerner, die auch nach mehrtägigem *MWM*-Training keinen Lernzuwachs verzeichnen konnten (Abbildung 3.1.4), zeigten eine Überexpression von einigen Genen im Zusammenhang mit dem *MWM*-Lernen sowie dem *Probe Trial* (Gedächtnis).

Gegen Ende von Kapitel 4.4.2 wird die Stresskomponente des *Probe Trials* für die Gruppe der guten Lerner angesprochen. Für die schlechten Lerner, die während der Lerntage 1-4 offensichtlich nicht die Lokalisation der verborgenen Plattform erlernten, dürfte das Entfernen der Plattform in diesem Gedächtnistest weder Gedächtnisspuren im Hippokampus aktivieren noch eine für die Mäuse neue Stresssituation darstellen. Daher wird angenommen, dass die an *MWM*-Tag 5 detektierten Hochregulationen (Abbildung 3.4.7B,D) nicht diesen Gedächtnistest-spezifischen Verhaltenskomponenten zuzuordnen sind. Entsprechend werden bei der an Lerntag 3 gemessenen erhöhten Expression einiger Gene (Abbildung 3.4.7B,C) *MWM*-unabhängige Einflussfaktoren vermutet. Diese Annahme wird durch den in Abbildung 4.1 gezeigten Befund unterstützt, dass die *de novo*-*mRNA*-Synthese in den guten Lernern während dieser Lernstufe 3 eine eher untergeordnete Rolle spielte. Vielmehr wird eine allgemeine hippokampale Hyperfunktion für möglich gehalten, die gemäß McNaughton (1997) zu einem erhöhten Angstverhalten sowie einer kognitiven Dysfunktion führt. In der Theorie von Gray (1982) wird das septo-hippokampale System als zentrales Element eines *Behavioural Inhibition System* beschrieben, welches auf neue Stimuli (*Novelty*) reagiert und somit eine wichtige Funktion bei der Entscheidungsfindung hat. Wird dieses System beispielsweise durch neurotoxische Agenzien hyperaktiviert oder durch ein pathologisch erhöhtes Stress-/Angstverhalten gestört, können kognitive Dysfunktionen – die man mit Lerntests wie der *Water Maze* überprüfen kann – auftreten. Es wird daher angenommen, dass die von McNaughton (1997) beschriebene inhibierende Wirkung von hippokampaler Hyperaktivität auf die kognitive Leistungsfähigkeit durch die erhöhte Synthese von *mRNA* und Protein vermittelt wird (Abbildung 4.2).

Eine Interpretation der Überexpression der einzelnen Gene ist schwierig und erfordert weitere Experimente. Allerdings kann der Befund, dass *mt-CO1* auch bei schlechten Lernern hochreguliert wurde (Abbildung 3.4.7D), bedeuten, dass der Hippokampus dieser Tiere einen abnormal erhöhten Energieverbrauch beziehungsweise eine erhöhte neuronale Aktivität zeigte.

Auch die „pathologische“ Auswirkung einer Überexpression der Gene *Mapt*, *Sorl1* und *APP*, die zeitgleich an Tag 3 gemessen wurde (Abbildung 3.4.7B,C), erscheint aufgrund deren Assoziation zu demenziellen Erkrankungen verständlich (siehe Kapitel 1.7.2). Hierbei sei jedoch erwähnt, dass eine verringerte *Sorl1*-Expression mit den kognitiven Defiziten beim *Mild Cognitive Impairment* (Sager *et al.* 2007) sowie bei der Alzheimer Demenz (Scherzer *et al.* 2004) beschrieben ist.

Die gesteigerte Synthese von *Dnmt1*, *Dnmt3a* und *Dnmt3b-mRNA* (Abbildung 3.4.7B-E) kann ebenso einer kognitiven Dysfunktion zugeordnet werden, zumal die Misregulation von *DNA*-Methylierung bei zahlreichen, die Kognition beeinflussenden Krankheiten wie Autismus (Samaco *et al.* 2005), Fragiles X-Syndrom (Ashley *et al.* 1993, Gecz *et al.* 1996, Gu *et al.* 1996, Turner *et al.* 1996), bipolarer Störung (Veldic *et al.* 2007) und Schizophrenie (Chen *et al.* 2002, Costa *et al.* 2002, Veldic *et al.* 2004, 2007, Grayson *et al.* 2006) gefunden wurde. So berichten Veldic und Mitarbeiter (2004) von erhöhter *Dnmt1*-Expression und *DNA*-Methylierung im Gehirn von verstorbenen Schizophrenie-Patienten.

Über die Misregulation der *Kibra-mRNA* (Abbildung 3.4.7A-E) in den schlechten Lernern kann nur spekuliert werden. Es ist jedoch möglich, dass diese erhöhte Expression auf das von Papassotiropoulos und Kollegen (2006) detektierte veränderte *Kibra*-Allel (Basenaustausch im 9. Intron) in den schlechten Lernern zurückzuführen ist. Hierzu wären allerdings weitere Untersuchungen notwendig.

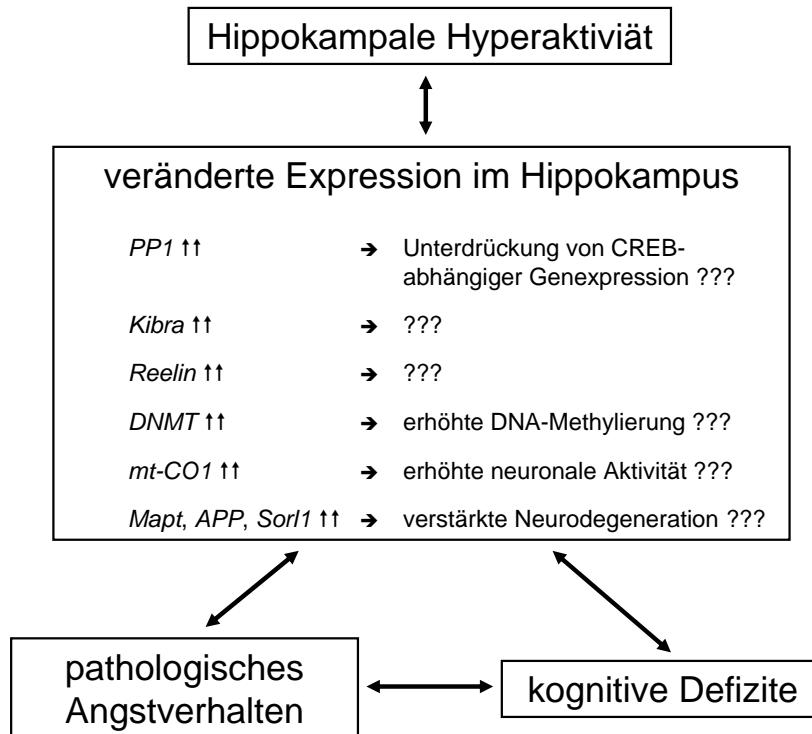


Abbildung 4.2: Modell für die Beteiligung einer spezifisch erhöhten Genexpression bei kognitiven Defiziten.

McNaughton (1997) begründet kognitive Defizite sowie eine erhöhte Sensitivität auf potentiell bedrohende Reize (pathologisches Angstverhalten) mit einer Hyperaktivität im Hippokampus. Die in dieser Studie detektierte erhöhte Expression bestimmter Gene (Abbildung 3.4.7) sowie des PP1-Proteins (Abbildung 3.5) in schlechten Lernern könnte ein biologisches Korrelat hierfür sein.

In Anlehnung an Genoux *et al.* (2002), die ein verbessertes *MWM*-Lernen bei „PP1-inhibierten“ Mäusen beobachteten, wird hier behauptet, dass die erhöhte Expression von *PP1-mRNA* (Abbildung 3.4.7B-E) und PP1-Protein im Hippokampus von schlechten Lernern (Abbildung 3.5B) zu Defiziten beim räumlichen Lernen in der *Water Maze* führte. Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung dieses Befundes wurden *Downstream*-Zielproteine von PP1 untersucht; den durch die Proteinphosphatase 1 dephosphorylierbaren Transkrip-

tionsfaktor CREB (Hagiwara *et al.* 1992) sowie das CREB-abhängig exprimierte Bdnf (Barco *et al.* 2005) (Abbildung 1.5). Hierbei wurde eine tendenzielle Herunterregulation von phospho-CREB sowie der Vorläufer- (pro) und prozessierten Form (mat) von Bdnf (Abbildung 3.5C) gemessen. Wie es scheint, wird der Effekt der dramatischen PP1-Überexpression *downstream* der Phosphatase abgemildert. Dennoch legen die hier präsentierten Ergebnisse nahe, dass durch die erhöhte Synthese von *PP1-mRNA* und PP1-Protein die CREB-vermittelte Genexpression reduziert wird. Dadurch kann die Synthese von jenen Proteinen unterdrückt werden, die für ein erfolgreiches Lernen von Bedeutung sind.

In dieser Studie konnte eine (unspezifische?) Hochregulation der Synthese von *mRNA* im Hippokampus bei lerngestörten Mäusen festgestellt werden. Entsprechend wird in dieser Doktorarbeit vorgeschlagen, dass diese offensichtliche Hyperaktivität des Transkriptoms mit einer allgemeinen Hyperaktivität im Hippokampus, mit kognitiven Dysfunktionen sowie mit pathologischem Angstverhalten assoziiert ist (Abbildung 4.2). Es ist bekannt, dass die Erhöhung der Synthese von *mRNA* nicht gleichzusetzen ist mit einer Erhöhung der Proteinsynthese. So ist es möglich, dass bei einigen der überexprimierten Gene eine Art *Rescue*-Effekt die gestörte *mRNA*-Synthese abmildert. Im Gegensatz zu den *mRNA*- und Proteindaten zu PP1 wurde zum Beispiel keine Übereinstimmung der Expression von *Mapt*-Gen (Abbildung 3.7B,C) und dem zugehörigen Tau-Protein (Abbildung 3.5A) gemessen.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Mit dieser Hypothesen-generierenden Studie konnte eine mit *MWM*-Erfahrung (Kapitel 4.3) sowie mit effizientem (Kapitel 4.4) und gestörtem Lernen (Kapitel 4.5) in der *Water Maze* assoziierte Regulation von Genen im Hippokampus der Maus detektiert werden.

Den größten Einfluss auf die Genexpression hatte die *MWM*-Erfahrung, da hier eine bis zu 6-fache Herunterregulation der *mRNA*-Synthese im Zuge der Habituation der Tiere an die *Water Maze* gemessen wurde. Dies zeigt die enorme Bedeutung der Verwendung von Verhaltenstest-spezifischen Kontrollen (hier: Schwimmkontrollen) bei der Untersuchung von molekularen Prozessen, die einem Test-spezifischen Verhalten (hier: räumliches Lernen) zugrunde liegen. Unter Benutzung dieser Schwimmkontrollen konnte zu bestimmten Zeitpunkten während eines viertägigen beziehungsweise vierstufigen *MWM*-Lernprozesses die *de novo* Synthese einiger *mRNA*'s festgestellt werden. Mit der *Microarray*-Studie (Kapitel 3.3) wurde eine gemeinsame Regulation mitochondrialer sowie Mitochondrium-assoziiierter Gene aufgedeckt, die mit der Biosynthese neuer Mitochondrien beziehungsweise einem erhöhten Energiebedarf der hippokampalen Neurone und Gliazellen während des *MWM*-Lernens begründet wird. In der „Feinanalyse“ (Kapitel 3.4) wurde eine Hochregulation von Genen mittels *qPCR* gemessen, die im Zusammenhang mit Lernen und Gedächtnis (*PP1*, *Kibra*), neurodegenerativen Erkrankungen (*Mapt*, *Sor11*), hippokampaler Aktivität (*mt-CO1*) sowie Epigenetik (*Dnmt3a*, *Dnmt3b*) stehen (Abbildung 4.1). Die gemessenen Regulationen stellen jedoch einen „Mittelwert“ dar, der aus allen Zellen (zum Beispiel Neurone, Gliazellen, Epithelzellen) des Hippokampus ermittelt wurde, wobei Glia den weitaus größten Teil der Zellmasse ausmacht (Fields 2004). Letztlich können aber nur Untersuchungen an bestimmten Nervenbahnen, die in das hippokampale Lernen involviert sind (wie zum Beispiel von Moosfasern oder Schaffer-Kollateralen, Abbildung 1.1), oder bestimmter Gliazellen, denen eine zunehmende Bedeutung bei der synaptischen Plastizität zugeschrieben wird (Überblick in Fields und Burnstock 2006), detailliertere Auskünfte über die lernabhängige Transkription und Translation neuer *mRNA*'s

beziehungsweise Proteine liefern. Eine solche Studie müsste jedoch mit einer *Live Imaging*-Methode durchgeführt werden, da eine zeitraubende Präparation solcher Zellverbände die Ergebnisse verfälscht. Interessant wäre auch die Untersuchung der Gen- und Proteinexpression während der dem Lernprozess folgenden Schlafperiode, zumal eine Hypothese besagt, dass eine Konsolidierung der im Hippokampus „zwischengespeicherten“ Information in den Neokortex während des Schlafes stattfindet (Wilson und McNaughton 1994). Für solche Experimente liefert diese Doktorarbeit wichtige Erkenntnisse, die neue Hypothesen für die Erforschung der molekularen Prozesse im Hippokampus liefert.

Weiteren Einblick in die lernabhängige Regulation von Genen im Hippokampus brachte die Untersuchung von Mäusen, die beim *MWM*-Test schlecht abschnitten (schlechte Lerner). Bei diesem gestörten *Water Maze*-Lernen wurde eine zusätzliche Hochregulation der beim effizienten Lernen hochregulierten Gene festgestellt und mit (lernspezifischer?) hippokampaler Hyperaktivität in Verbindung gebracht (Abbildung 4.2). Um dieser Überexpression weiter auf den Grund zu gehen, könnte man zum Beispiel durch *Social Defeat*-Stress oder durch Schlafentzug schlechte Lerner „erzeugen“ und die hierbei detektierten Expressionsdaten weiteren Verhaltenskomponenten zuordnen. Ebenso kann die Untersuchung von genetisch oder pharmakologisch erzeugten „schlechten Lernern“ weiteren Einblick in die „*Black Box*“ des Hippokampus liefern. Wie oben erwähnt, dient selbstverständlich auch hier die Untersuchung einzelner Subareale (zum Beispiel der durch Mikrodissektion herauspräparierten *CA1*-Region), Nervenbahnen oder Zelltypen der weiteren Aufdeckung der molekularen Grundlagen von Lern- und Gedächtnisprozessen im Hippokampus.

Genkürzel	RZPD-Nr.	Tag 1			Tag 2			Tag 3			Tag 4			Tag 5		
		1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h
Tubb6	7h9															
Tubb6	7h9		↑								↓	↓				↑
Tyrobp	1g5											↓				
Tyrobp	1g5					↑	↑					↓				↑
Tyrobp	2b10															↑
Ubb	1a8															
Usp4	8f2															
Usp4	8f2															
Vglut	4d6															
Xcl1	8a7															
Xcl1	8a7															
Zdhhc5	1d12	↑														
Zdhhc5	1d12	↑														
Zfp3612	8d1	↑														

Abbildung 5: Mit dem Farbkode beurteilte Genregulationen.

Es sind die mit einem Farbkode (siehe Kapitel 2.6.4.2) bewerteten Regulationen im *Microarray*-Experiment von allen sequenzverifizierten Genen zu 15 Zeitpunkten während des räumlichen Lernprozesses (gL/SK) in der *MWM* dargestellt. Eine gleiche RZPD-Nummer zeigt die identische Gensequenz, jedoch ein unterschiedliches PCR-Produkt (technisches Replikat) an. Gelbe und Rote Farbtöne bedeuten eine Hoch-, blaue Farbtöne eine Herunterregulation. Die Farbtönung (von hell nach dunkel) sowie die zunehmende Anzahl der Pfeile symbolisiert die gesteigerte Qualität der Beurteilung der Genregulation (Abbildungen 2.7 und 2.8). Hierbei bedeuten die Pfeile eine eindeutige Bewertung der Hoch- beziehungsweise Herunterregulation. Die dargestellten Genkürzel sind offizielle Symbole der Gene (siehe <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>).

Tabelle 4: p-Werte im Alexa-Microarray.

Es sind die p-Werte zum Vergleich der jeweils 8 Signalwerte (*Spots*) der guten Lerner (gL) mit denen der Schwimmkontrollen (SK) aufgelistet. Ausschließlich sequenz-verifizierte Gene sind dargestellt. Signifikante Unterschiede sind hervorgehoben (hellgrün, $p < 0,05$; grün, $p < 0,01$; dunkelgrün, $p < 0,001$). Die dargestellten Genkürzel sind offizielle Symbole der Gene (siehe <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>).

spotID	RZPD-Nr.	Genkürzel	Tag 1			Tag 2			Tag 3			Tag 4			Tag 5		
			1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h
41406	8a8	2400001E08Rik	---	0,367	0,098	0,618	0,053	---	0,736	---	0,387	0,137	0,325	0,292	0,070	0,318	0,189
10402	4g3	2610041P16Rik	---	0,179	0,341	0,683	0,090	0,014	0,720	0,876	---	0,215	0,000	0,607	---	0,352	0,383
10910	4h3	2610041P16Rik	0,025	0,343	0,849	0,036	0,178	---	---	0,128	---	---	---	0,008	---	0,535	
30204	5d5	2610041P16Rik	---	0,099	0,270	0,431	0,087	0,719	0,975	0,661	0,857	0,141	0,002	0,707	0,457	0,308	0,028
11011	5d5	2610041P16Rik	0,687	0,197	0,224	0,947	0,869	---	0,919	0,661	0,681	0,409	0,137	0,459	0,229	0,919	0,934
30404	4g9	A930004D23Rik	---	0,191	0,182	0,982	0,375	0,071	---	---	---	---	---	---	0,317	---	---
31903	4c8	Abcb6	0,207	0,902	0,004	0,035	0,962	0,589	0,031	---	0,347	0,090	0,447	0,446	---	0,314	0,632
41009	5e9	Aco2	0,297	0,104	0,953	0,001	0,167	0,319	0,902	0,439	0,351	0,182	0,807	0,498	0,006	---	0,088
20204	5e9	Aco2	0,365	0,428	0,490	0,663	0,096	0,000	0,832	0,472	0,893	0,476	0,003	0,041	0,463	0,496	0,715
41102	4e8	Adra1d	0,651	0,090	0,686	0,687	0,012	---	---	---	---	0,002	0,289	0,021	0,032	0,013	---
40311	4e8	Adra1d	0,532	0,129	0,318	0,145	0,677	---	0,299	---	---	---	0,999	0,534	0,060	0,686	---
20708	4a6	Adra1d	0,508	0,165	0,012	0,994	0,197	0,531	---	0,678	0,511	0,444	0,249	0,447	0,396	0,062	0,658
40811	3f2	Akap2	0,004	0,092	0,416	0,159	0,395	0,877	0,424	---	0,727	---	0,000	0,496	0,813	---	0,081
31004	4b2	Arc	---	0,795	0,463	0,012	0,006	0,159	---	---	---	---	0,121	0,812	---	0,232	---
30406	3g2	Atp1a1	0,007	0,572	0,982	0,256	0,169	0,244	0,681	---	0,767	0,118	0,819	0,992	0,108	0,848	0,011
41302	1d7	Atp1a3	0,053	0,008	0,004	0,032	0,092	---	0,495	0,195	0,005	0,335	0,000	0,570	0,344	---	0,117
31404	1d7	Atp1a3	0,178	0,490	0,631	0,008	0,318	---	0,876	0,137	0,088	0,421	0,005	0,948	0,675	0,665	0,163
20106	1d7	Atp1a3	0,422	0,658	0,641	0,726	0,064	0,807	0,698	0,965	0,179	0,427	0,288	0,002	---	0,545	0,680
40907	2a6	Atp1b3	0,436	0,230	0,093	0,056	0,381	0,161	---	0,108	0,216	0,000	0,050	0,159	0,109	0,011	0,224
20310	4d12	B930076A02	0,122	0,455	0,066	0,293	0,951	0,923	0,597	---	0,724	0,168	0,018	0,793	0,156	---	0,096
21903	6c4	Baiap2	---	0,404	0,815	0,109	0,001	---	0,041	0,373	0,031	0,333	0,006	0,915	0,993	0,001	0,887
31909	6c4	Baiap2	0,293	0,001	0,713	0,807	0,091	0,017	0,025	---	0,387	---	0,056	0,977	0,048	0,167	---
41904	6c8	Baiap2	---	0,323	0,680	0,436	0,054	---	0,081	---	---	0,063	0,003	0,968	0,428	0,877	0,861
11909	6c8	Baiap2	0,278	0,946	0,215	0,718	0,458	---	---	---	---	---	0,028	0,892	0,014	0,107	---
11107	5a10	Bbc3	0,202	0,617	0,119	0,023	0,577	0,447	0,442	0,492	0,244	0,234	0,138	0,730	0,659	0,429	0,571
30312	4c5	BC021891	---	0,128	0,151	0,032	0,098	---	---	---	---	---	---	0,006	0,007	0,994	---
30612	2h9	Bcas2	---	0,017	0,380	0,422	0,149	---	---	---	---	0,734	0,557	0,011	0,046	0,508	0,182
40608	3a1	Bdnf	0,226	0,008	0,744	0,196	0,242	0,046	0,790	---	0,899	0,063	0,012	0,170	0,172	0,093	0,028
11512	6d7	Bmpr2	---	---	---	0,576	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
21103	4f8	C8b	0,741	0,926	0,678	0,936	0,140	0,004	---	0,294	0,034	0,546	0,000	0,088	0,892	0,006	0,010
41108	1b1	Camk2a	0,010	0,576	0,016	0,951	0,238	0,060	0,065	---	0,001	0,067	0,037	0,889	0,334	0,760	0,018
41906	1b12	Camk2a	0,423	0,009	0,148	0,065	0,009	---	0,577	0,951	0,868	0,029	0,859	0,684	---	0,466	0,676
41311	6a5	Camk2a	---	0,818	0,267	0,068	0,787	0,712	0,475	---	0,656	0,328	0,205	0,976	0,095	0,506	0,008
21111	1b10	Camk2b	---	---	0,177	0,516	0,208	0,001	0,581	0,506	0,072	0,020	0,000	0,614	0,511	0,000	0,008
11002	4h9	Camk2b	---	0,413	0,030	0,128	0,315	0,100	---	0,173	0,195	0,720	0,002	0,491	---	0,120	0,000
11509	4h2	Camk2g	---	0,141	0,540	0,402	0,468	0,581	0,329	0,282	0,150	0,010	0,432	0,822	0,226	0,941	0,337
11005	4h2	Camk2g	---	---	0,740	0,107	0,214	0,275	---	---	---	---	0,343	---	0,032	---	---
40801	2d11	Camk4	---	---	---	0,381	0,958	---	0,576	---	---	---	0,264	---	---	0,427	---
31001	4d2	Camkk1	---	0,573	0,396	0,762	0,990	0,192	0,001	---	---	---	---	---	---	0,211	0,981
11704	8b12	Casp4	---	0,061	0,247	0,015	0,324	0,600	0,055	0,916	0,003	---	0,002	---	---	0,013	0,024
11412	8b12	Casp4	0,059	---	0,695	0,016	0,564	---	---	0,328	---	---	---	---	0,775	0,594	---
40602	2d6	Casp6	---	---	---	0,978	0,748	---	---	---	---	---	---	---	---	0,020	---

spotID	RZPD-Nr.	Genkürzel	Tag 1			Tag 2			Tag 3			Tag 4			Tag 5		
			1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h
31010	5d2	Cd2kap1	0,661	---	0,005	0,158	0,149	---	---	---	0,903	0,568	0,406	0,585	0,036	0,612	0,002
10202	5d2	Cd2kap1	---	0,158	0,005	0,117	0,477	---	---	0,631	---	0,470	0,006	0,014	---	0,373	0,960
10409	2a12	Cdk2ap2	---	0,377	0,628	0,002	0,211	0,569	---	0,774	0,372	0,204	0,258	0,704	---	---	0,000
41402	5c11	Centb5	0,890	0,195	0,853	0,119	0,413	---	---	---	0,639	0,461	0,002	0,687	0,109	0,661	0,010
41307	5c11	Centb5	0,631	0,545	0,805	0,095	0,064	---	0,923	0,144	0,449	0,073	0,001	0,657	0,324	0,296	0,532
31607	5c11	Centb5	---	0,013	0,099	0,745	0,715	0,613	---	---	0,213	---	0,601	0,301	0,138	0,241	---
31009	5c11	Centb5	---	0,542	0,160	0,031	0,908	0,183	---	0,310	---	0,013	0,040	0,265	---	0,245	---
30702	3b7	Cib1	---	0,010	0,584	0,348	0,225	0,724	0,276	---	0,672	---	0,738	---	0,655	0,827	0,031
30610	2g12	Cks1b	---	0,440	0,821	0,309	0,064	---	0,356	---	0,650	0,344	0,186	---	---	0,939	0,002
30401	4f11	Clca1	0,440	---	---	0,560	0,596	---	0,756	---	---	---	---	---	---	0,560	---
40911	4f11	Clca1	---	---	0,022	0,483	0,373	0,831	---	---	---	---	---	0,707	---	---	---
10505	5g6	Clca2	0,640	0,193	0,470	0,778	0,180	0,646	0,831	0,071	0,529	0,035	0,339	0,792	---	---	0,119
31002	4f2	Clca3	0,487	0,017	0,003	0,318	0,005	0,002	0,339	---	0,284	0,000	0,728	0,220	0,208	0,046	0,099
20311	4f2	Clca3	0,563	0,326	0,258	0,176	0,452	0,556	---	0,108	0,144	---	---	0,811	0,602	0,004	0,502
40507	1h1	Clcn2	0,194	0,661	0,106	0,013	0,004	0,239	0,920	---	0,608	0,005	0,029	0,440	0,956	0,328	0,458
10804	2g4	Clcn2	0,230	0,916	0,384	0,734	0,363	0,009	---	0,146	0,865	0,105	0,190	0,320	0,031	0,038	0,042
11511	5h7	Clcn2	0,903	0,502	0,788	0,597	0,810	---	---	0,604	0,991	0,001	0,273	0,803	0,045	0,023	0,013
40502	5h7	Clcn2	0,541	0,219	0,116	0,784	0,001	0,051	0,119	0,035	0,827	0,005	0,163	0,559	0,396	0,003	0,228
21803	9g4	Clcn2	---	---	---	0,393	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
40903	3g11	Clcn6	0,800	0,493	0,749	0,336	0,014	---	0,087	---	---	0,798	0,025	0,341	0,008	0,358	0,001
20601	2d3	Clcnkb	0,165	0,276	0,952	0,713	0,450	---	0,399	0,340	0,818	0,148	0,651	0,424	0,751	0,041	0,000
30804	2d3	Clcnkb	---	0,769	0,938	0,022	0,310	0,657	0,867	---	0,641	0,630	0,827	0,973	0,659	0,314	0,008
40607	2d3	Clcnkb	---	0,556	---	0,026	0,052	0,012	0,496	0,180	---	---	0,740	---	---	0,141	---
30202	5d1	Clc1	0,870	---	0,503	0,449	0,105	0,628	0,661	0,067	---	---	0,001	0,465	0,218	0,051	0,146
11009	5d1	Clc1	0,075	0,290	0,039	0,321	0,676	0,808	---	0,130	0,065	0,014	0,128	0,759	0,564	0,251	0,332
40403	1g1	Clc3	0,005	0,017	0,869	0,192	0,222	---	0,902	0,081	0,009	0,043	0,090	0,990	0,871	0,419	0,790
10206	5d10	Clns1a	---	---	0,672	---	0,733	---	---	---	---	---	---	---	0,453	0,187	---
41008	5d10	Clns1a	---	0,000	0,515	0,102	0,154	0,333	0,892	0,005	---	---	0,726	0,101	---	0,468	---
40901	3d5	Cnn2	---	---	0,331	0,681	0,124	---	---	---	---	---	0,004	0,090	0,009	0,020	0,002
21811	10d8	Cnr2	---	0,599	0,417	0,004	0,423	---	0,246	0,384	0,007	0,023	0,000	0,086	0,490	0,003	---
11807	10d8	Cnr2	---	---	---	0,012	0,133	---	0,130	---	---	0,888	---	0,703	---	0,113	---
11703	8b1	Cnr2	0,861	---	0,799	0,007	0,562	0,889	0,994	0,262	0,771	0,100	0,015	0,826	0,272	0,118	0,000
10407	1h2	Cox8a	---	0,029	0,145	0,397	0,364	0,005	---	0,826	0,031	0,001	0,000	0,003	---	---	---
30805	1h4	Cox8a	---	0,406	0,030	0,113	0,542	0,001	0,470	---	---	0,040	0,060	---	---	0,855	0,064
20503	2a10	Creb3I3	0,119	0,700	0,229	0,276	0,018	0,101	---	0,644	---	0,077	0,309	0,069	0,986	0,826	0,418
40806	3b6	Creb3I3	0,962	0,009	0,019	0,429	0,074	---	0,044	---	0,112	0,019	0,000	0,164	0,003	0,000	0,002
21610	7c4	Cst3	0,003	0,675	0,315	0,042	0,007	---	0,221	0,572	0,142	0,363	0,009	0,002	0,007	0,002	0,007
11910	---	Cygb	---	---	---	0,073	0,379	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
30411	2b12	D19Ertd144e	0,285	0,273	0,169	0,026	0,135	---	---	0,356	0,073	0,030	0,088	0,589	0,453	0,715	0,001
40309	4d1	D1Wsu40e	0,508	0,737	0,338	0,045	0,013	0,584	0,373	---	0,591	0,833	0,583	0,471	0,757	0,861	0,024
20911	4d1	D1Wsu40e	---	---	0,194	0,111	0,324	0,063	0,009	0,059	0,971	---	0,521	0,877	---	0,092	0,133
41609	7b4	Dapk2	0,931	0,964	0,368	0,555	0,542	0,000	0,934	---	0,418	0,020	0,025	0,371	0,084	0,994	0,007
41507	4b4	Drd1a	---	---	---	0,733	0,739	0,020	---	0,190	---	---	---	---	---	---	---
11103	5g10	Drd2	0,910	0,925	0,983	0,325	0,834	---	0,451	0,447	0,001	0,240	0,422	0,085	0,804	0,542	0,018
41610	7b10	Dusp5	---	0,725	0,108	0,640	0,244	---	---	---	0,640	0,037	0,037	0,576	0,877	0,847	0,005
31708	7b10	Dusp5	0,160	0,001	0,017	0,013	0,198	0,011	0,280	0,333	0,000	0,054	0,036	0,028	0,081	0,001	0,234
10911	4h10	DXImx46e	0,041	0,258	0,569	0,106	0,004	0,159	---	0,986	0,762	0,007	0,000	0,380	0,220	0,481	0,183
41605	7f5	Egf	0,341	0,284	0,116	0,073	0,118	---	0,144	0,163	---	0,044	0,859	0,817	0,205	0,018	0,264
40401	7f5	Egf	---	0,014	0,455	0,801	0,009	0,018	---	---	0,268	---	0,000	0,016	0,035	0,060	---
20501	1d5	Eif1	---	0,539	0,267	0,050	0,676	0,001	0,001	0,592	0,045	0,002	0,038	0,558	0,150	0,766	0,003
31205	1d5	Eif1	---	0,495	0,037	0,424	0,570	0,362	0,613	0,080	0,075	0,051	0,086	0,302	---	0,012	0,057
20312	4f7	Emr1	---	0,911	---	0,020	0,679	0,098	0,356	0,752	---	---	---	---	0,024	---	0,058
21612	7h6	Erf	---	0,055	0,183	0,000	0,628	---	0,277	0,022	0,628	0,022	0,593	0,518	0,120	0,493	0,058
31709	9h1	Ern2	---	0,209	0,227	0,095	0,237	0,092	0,271	---	0,015	---	0,122	---	---	0,000	---

spotID	RZPD-Nr.	Genkürzel	Tag 1			Tag 2			Tag 3			Tag 4			Tag 5		
			1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h
21810	9h1	Ern2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
10809	3f3	Farsl	---	---	0,758	0,045	0,136	0,009	---	0,530	---	0,371	0,391	---	0,044	0,747	0,016
40106	3f3	Farsl	---	0,105	0,451	0,626	0,018	---	---	---	0,861	---	---	0,004	0,000	0,330	---
20808	1a7	Farslb	0,058	0,162	0,539	0,818	0,058	---	---	0,576	---	---	0,753	---	0,189	0,408	0,004
31112	1a7	Farslb	---	0,320	0,051	0,476	0,057	0,411	0,466	---	0,458	0,001	0,000	0,674	0,037	0,468	0,832
40512	2b2	Fbx15	0,890	0,384	0,621	0,524	0,004	0,806	0,739	---	0,267	0,004	0,009	0,797	---	0,006	0,105
40504	2a11	Fech	---	0,307	0,826	0,625	0,391	0,065	0,766	0,556	0,743	0,850	0,110	---	---	0,816	0,031
40410	2g7	Fgf18	---	0,148	0,956	0,127	0,021	0,947	0,426	---	0,082	---	0,000	0,444	0,278	0,069	0,007
30806	2g7	Fgf18	0,084	0,313	0,228	0,326	0,291	0,290	---	---	0,740	0,005	0,980	0,757	0,101	0,980	0,446
20506	2c12	Fnta	---	0,595	0,493	0,557	0,564	0,024	0,798	0,843	0,328	0,906	0,624	0,026	0,466	0,898	0,029
20505	2c12	Fnta	0,243	0,253	0,504	0,593	0,095	0,402	0,589	0,914	0,735	---	0,047	0,170	0,130	0,940	0,082
41106	5a6	GABABL	0,134	0,923	0,006	0,759	0,481	0,001	0,278	---	0,009	---	0,037	0,542	0,632	0,095	0,000
11302	1a6	Gabarapl1	---	0,348	0,098	0,742	0,448	0,889	0,071	0,740	0,460	0,116	0,372	0,511	0,365	0,470	0,288
10209	5h12	Gabra4	0,471	0,906	0,918	0,026	0,888	---	0,823	0,671	---	---	---	0,005	---	---	0,013
41003	6b10	Gabra6	---	---	---	0,074	0,014	---	0,000	---	---	---	0,554	---	---	0,524	---
30212	6b10	Gabra6	---	---	---	0,985	0,261	---	0,282	---	---	---	---	---	---	0,873	---
21605	6a6	Gabrb1	0,381	0,419	0,550	0,069	0,023	0,149	---	0,932	---	0,380	0,001	0,009	0,062	0,852	0,020
21202	1e5	Gabrd	0,241	0,230	0,419	0,032	0,105	0,004	0,818	0,541	0,095	0,019	0,004	0,834	0,000	0,124	0,012
31512	6d4	Gabre	---	0,361	0,215	0,778	0,119	0,798	0,085	---	0,502	0,002	0,118	0,301	0,879	0,357	0,005
31303	1a9	Gabrg2	---	0,970	0,611	0,916	0,325	0,939	---	---	0,745	0,010	0,368	---	0,433	0,908	0,912
31510	5a8	Gabrg2	---	0,849	0,807	0,410	0,944	0,755	0,060	---	0,646	0,000	0,088	0,389	---	0,260	0,000
31107	5a8	Gabrg2	---	---	---	0,546	0,811	---	---	---	---	0,980	---	---	---	---	---
30110	1f2	Gabrq	0,341	0,859	0,042	0,003	0,850	0,213	---	---	---	---	---	0,061	---	0,676	---
10912	4h12	Gabbr1	---	---	0,841	0,095	0,357	---	---	---	---	---	---	---	0,316	0,396	---
20308	4e2	Gabrr2	0,247	0,800	0,422	0,062	0,044	---	---	---	---	---	0,072	0,709	0,006	0,701	0,909
20801	2h6	Gabrr2	0,032	0,841	0,425	0,052	0,340	0,329	---	0,291	0,209	0,224	0,006	0,046	0,005	---	0,735
40506	2f2	Gars	0,045	0,071	0,857	0,143	0,031	0,747	0,079	---	0,153	0,164	0,251	0,000	0,000	0,184	0,914
21507	4d4	Gnb211	0,568	0,107	0,003	0,065	0,019	---	---	0,015	0,670	0,004	0,001	0,183	0,002	0,408	0,115
30104	3d3	Gpld1	0,932	0,037	0,846	0,686	0,168	---	0,290	0,398	0,512	0,002	0,082	0,821	0,674	0,085	0,070
20404	6a8	Gpld1	0,613	0,055	0,686	0,606	0,492	0,095	---	0,445	0,352	0,446	0,080	0,710	0,996	0,576	0,559
11006	6a8	Gpld1	0,198	0,044	0,890	0,727	0,928	0,149	---	0,858	0,877	0,013	0,404	0,439	---	0,368	---
10605	2c8	Grin2c	0,800	0,478	0,000	0,000	0,438	0,051	---	0,045	0,208	0,900	0,471	0,921	0,760	0,016	0,003
10904	2c8	Grin2c	---	0,307	0,913	0,050	0,935	0,311	0,768	0,115	---	0,046	0,020	0,992	---	0,877	0,036
30311	4b6	Grin2c	0,196	0,246	0,005	0,004	0,052	---	---	0,783	0,287	0,050	0,008	0,800	0,305	0,447	0,025
20309	4d3	Grin3b	---	0,515	0,008	0,685	0,574	0,880	0,673	---	0,008	---	0,314	0,397	0,064	0,823	0,071
40308	4c10	Grtp1	---	---	0,856	0,158	0,752	0,242	0,010	---	---	---	0,014	0,510	0,580	0,265	0,016
31710	8a3	Gtf2h3	---	0,226	0,214	0,351	0,061	0,429	0,068	---	0,036	0,139	0,370	0,626	0,082	0,571	0,546
31802		hAPP	0,164	0,382	0,110	0,110	0,055	0,861	---	---	0,444	0,304	0,003	0,399	0,685	0,005	0,015
21709		hAPP	0,109	0,089	0,390	0,704	0,413	0,162	0,300	0,223	0,611	0,955	0,000	0,993	0,030	0,000	0,071
20906	4c11	Hars2	---	---	---	0,010	0,708	---	0,132	0,602	---	---	---	---	0,547	0,167	0,045
21309	6a11	Hecw1	---	0,874	0,691	0,768	0,440	0,022	---	0,444	0,246	0,613	0,237	0,884	0,771	---	0,000
21001	6a11	Hecw1	0,978	0,011	0,997	0,185	0,752	0,885	0,684	0,571	0,824	0,005	0,365	0,702	0,764	0,092	0,000
31102	5a9	Hey1	---	0,667	0,519	0,104	0,277	0,642	---	---	---	---	---	---	---	0,623	0,463
30904	2c2	Hmgb2	---	0,235	0,291	0,232	0,845	0,720	0,086	---	0,895	0,081	0,117	0,876	---	0,307	0,014
20504	2c2	Hmgb2	0,094	0,000	0,505	0,010	0,597	0,495	---	0,799	---	0,947	0,768	0,156	0,006	0,516	0,348
31108	5f5	Hnrpa1	---	0,528	0,843	0,624	0,067	0,654	0,060	---	0,782	---	0,086	0,712	0,585	0,270	0,003
20407	2d4	Hsbp1	0,088	0,115	0,084	0,073	0,671	0,006	---	0,321	0,233	0,261	0,185	0,246	0,047	0,527	0,095
10403	4g5	Htr2b	---	---	---	0,354	0,206	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
20908	4f10	Htr5b	---	0,011	0,018	0,008	0,207	0,531	---	---	0,682	---	0,051	0,113	0,112	0,025	0,099
10907	4f10	Htr5b	0,008	0,930	0,842	0,156	0,273	0,410	---	0,124	0,540	---	0,014	0,874	0,194	0,010	0,851
31005	4f4	Icam1	---	---	---	0,620	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
11109	5h1	Ick	0,007	0,135	0,864	0,003	0,003	0,266	---	0,379	0,129	0,549	0,001	0,099	0,120	---	0,376
11501	8d4	lfna	0,297	0,760	0,999	0,486	0,004	---	0,180	0,797	0,494	---	0,016	0,546	---	0,989	0,419
31511	5h2	lfng1	---	0,910	0,150	0,158	0,081	0,412	0,310	0,708	0,582	0,001	0,700	0,822	---	0,794	0,010

spotID	RZPD-Nr.	Genkürzel	Tag 1			Tag 2			Tag 3			Tag 4			Tag 5			
			1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	
30506	5h2	lfng1	---	0,491	0,001	0,367	0,684	0,139	0,069	0,331	0,556	0,000	0,408	0,685	0,449	0,017	0,207	
31110	5h5	lfng1	0,417	0,479	0,238	0,015	0,014	0,001	0,004	0,202	0,262	0,002	0,002	0,054	0,396	0,427	0,017	
10506	5h5	lfng1	0,330	0,861	0,002	0,874	0,009	0,651	0,262	0,361	0,354	0,001	0,347	0,501	---	---	0,160	
41606	6b9	lgfbp2	---	0,064	0,051	0,801	0,032	0,013	0,270	---	0,285	0,485	0,435	0,966	---	0,248	0,000	
10601	2b5	lgtp	---	0,576	0,760	0,589	0,063	---	0,404	0,902	0,317	0,581	0,001	0,671	---	0,799	0,009	
10901	2b5	lgtp	---	0,422	0,933	0,442	0,031	---	---	0,834	0,809	0,099	0,004	0,641	---	0,780	0,107	
21104	4g6	ll15	0,541	0,173	0,824	0,672	0,574	0,724	0,604	0,715	0,791	0,111	0,064	0,582	0,909	0,701	0,051	
10602	2b8	ll15ra	---	0,968	0,859	0,080	0,236	---	---	0,413	---	---	---	---	0,356	0,988	---	
40611	3a7	ll1b	0,046	0,974	0,449	0,900	0,865	0,970	---	---	0,895	0,083	0,369	0,900	0,591	0,000	0,012	
30905	3a7	ll1b	---	0,664	0,200	0,092	0,132	0,498	0,999	---	0,330	0,207	0,117	0,851	0,095	0,002	0,226	
10806	1h5	lrs3	---	0,036	0,783	0,014	0,218	0,495	0,005	0,289	---	0,133	---	0,776	---	0,819	0,159	
40312	4f1	Kcna1	---	0,021	0,013	0,012	0,055	---	0,648	---	---	---	---	---	0,127	0,034	---	
10909	4f1	Kcna1	0,918	0,030	0,176	0,114	0,745	---	---	0,279	---	---	0,036	0,574	0,570	---	---	
30903	217	Kcna2	0,259	0,354	0,942	0,280	0,034	0,698	0,085	---	0,900	0,185	0,003	0,753	0,333	0,569	0,013	
40803	1h7	Kcna7	0,291	0,490	0,569	0,031	0,801	0,126	0,126	---	0,598	---	0,351	0,874	0,101	0,572	0,001	
40804	2c9	Kcna7	0,787	0,003	0,505	0,652	0,445	0,016	0,616	---	0,067	0,000	0,004	0,079	0,505	0,580	0,104	
30606	2c9	Kcna7	---	---	0,071	0,002	0,716	0,747	---	---	0,387	---	0,120	0,492	---	0,489	---	
21509	4h7	Kcnab1	0,183	0,345	0,095	0,114	0,044	0,074	0,376	0,326	0,754	0,512	0,038	0,080	0,000	0,079	0,000	
41202	1e4	Kcnab2	0,550	0,976	0,079	0,118	0,034	0,001	0,138	---	0,255	0,034	0,008	0,997	0,597	0,096	0,409	
41105	5a3	Kcnab2	0,509	0,241	0,210	0,892	0,516	0,408	0,188	---	0,504	0,678	0,679	0,585	0,184	0,028	0,714	
10310	4b5	Kcnb1	---	0,035	0,394	0,740	0,518	---	0,660	---	0,253	0,796	0,326	0,170	---	---	0,011	
41801	5a11	Kcnb1	0,053	0,002	0,254	0,752	0,704	---	---	---	0,779	0,059	0,485	0,150	0,173	0,018	0,367	
20307	4c9	Kcnc3	---	0,218	0,010	0,950	0,863	0,493	---	---	0,984	---	0,025	0,444	0,843	0,997	0,394	
11110	5h8	Kcnc3	0,478	0,243	0,098	0,052	0,017	0,040	---	0,020	0,091	0,083	0,008	0,010	0,012	0,054	0,005	
20810	3d12	Kcne1	---	0,515	0,713	0,150	0,436	0,074	0,813	0,580	0,232	0,581	---	0,009	---	0,442	0,066	0,052
20101	3d12	Kcne1	---	---	---	---	0,999	---	---	---	---	---	---	---	0,208	0,051	---	
40905	4b9	Kcne3	0,338	0,634	0,196	0,893	0,995	0,782	0,461	---	0,989	0,415	0,154	0,858	---	0,715	0,087	
40711	4b9	Kcne3	0,383	0,331	0,395	0,110	0,318	0,851	0,275	---	0,511	0,311	0,321	---	0,477	0,129	0,793	
30508	2h11	Kcnh2	---	0,983	0,872	0,551	0,035	0,172	0,520	---	0,727	0,404	0,389	0,607	---	0,041	0,058	
10810	3e5	Kcnj1	0,513	0,005	0,012	0,024	0,050	0,002	---	0,070	0,007	0,004	0,061	0,000	0,019	---	0,155	
21102	4e11	Kcnj1	0,000	0,011	0,048	0,294	0,066	---	0,011	0,001	0,107	0,714	0,000	0,085	---	0,000	0,045	
30810	3e4	Kcnk1	0,048	0,093	0,227	0,037	0,502	0,764	---	---	0,299	0,577	0,000	0,086	---	0,425	0,001	
20606	2g3	Kcnk4	0,228	0,340	0,886	0,050	0,005	---	---	0,835	0,131	0,000	0,000	0,558	0,010	0,917	0,724	
30812	3e8	Kcnk5	---	0,156	0,492	0,448	0,028	---	---	---	0,878	0,053	0,000	0,081	0,002	0,880	0,000	
40104	3e8	Kcnk5	0,274	0,378	0,101	0,152	0,960	---	0,054	---	0,586	0,186	0,078	0,772	---	0,122	0,059	
10110	1f3	Kcnk7	0,291	0,116	0,994	0,137	0,123	---	---	0,306	---	---	0,110	---	---	---	---	
30902	2c5	Kcnk7	0,009	0,986	0,829	0,112	0,021	0,394	0,005	---	0,000	0,520	0,002	0,926	0,033	0,016	0,048	
10508	2f3	Kcnk7	0,695	0,317	0,883	0,851	0,205	0,104	0,749	0,553	---	0,357	0,056	0,801	---	0,728	0,064	
40112	5c8	Kcnk7	---	0,775	0,327	0,530	0,714	---	0,587	0,847	---	---	0,049	0,084	0,002	0,005	---	
21204	1e9	Kcnma3	0,033	0,511	0,182	0,974	0,184	---	0,059	0,080	0,193	0,983	0,902	0,869	0,246	0,001	0,011	
10311	4c3	Kcnmb1	0,488	0,069	0,135	0,007	0,586	0,554	---	0,499	0,670	0,012	0,049	0,585	0,880	---	0,048	
40108	1g3	Kcnn1	0,150	0,196	0,297	0,709	0,071	0,341	0,928	0,717	0,814	---	0,115	0,615	0,574	0,249	0,051	
10312	4c6	Kcnn1	---	0,287	0,453	0,001	0,003	0,057	---	0,226	---	---	0,093	0,038	0,084	0,644	0,752	
30308	3f12	Kcnn4	0,257	0,744	0,646	0,042	0,014	---	0,096	0,533	0,266	0,285	0,001	0,778	0,023	0,357	0,274	
10404	4g10	Kcnn4	---	0,109	0,137	0,763	0,665	---	---	0,374	0,003	---	0,122	0,764	0,036	0,980	0,292	
30403	4g4	Kcnn4	---	0,348	0,190	0,069	0,303	---	0,060	0,246	0,184	0,292	0,003	0,434	---	0,331	0,592	
30909	4g4	Kcnn4	0,728	0,179	0,080	0,369	0,036	0,167	---	---	0,762	0,065	0,000	0,873	0,140	0,144	0,746	
10309	4a9	Kcnq1	---	0,000	0,004	0,683	0,821	0,740	---	0,775	0,671	0,005	0,093	0,768	---	---	0,010	
20507	2a2	Kcnu1	0,498	0,003	0,995	0,147	0,115	0,515	---	0,718	---	---	0,022	0,103	0,868	0,394	0,018	
40508	2a3	Kcnu1	---	0,009	0,453	0,263	0,094	---	0,147	---	0,367	---	0,476	0,377	0,405	0,366	0,091	
30112	1f6	Klhdc3	0,260	0,125	0,294	0,190	0,455	---	---	0,993	0,450	0,653	0,043	0,609	0,116	0,826	---	
21510	5f6	Limk2	0,008	0,321	0,101	0,929	0,712	---	0,698	0,204	---	0,011	0,007	0,739	---	0,994	0,164	
31906	9f7	Litaf	0,682	0,030	0,318	0,331	0,274	0,983	---	---	0,904	---	0,195	---	---	0,496	0,091	
20902	3h10	Lrrc25	0,834	0,054	0,322	0,183	0,867	---	0,955	0,505	0,067	0,100	0,076	0,486	0,429	0,026	0,024	

spotID	RZPD-Nr.	Genkürzel	Tag 1			Tag 2			Tag 3			Tag 4			Tag 5		
			1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h
30602	2b6	Lta4h	0,782	0,561	0,931	0,065	0,046	0,664	0,029	0,245	0,106	0,084	0,098	0,729	---	0,146	0,019
31103	5g8	Madd	---	0,345	0,286	0,310	0,008	0,301	0,386	---	0,041	0,145	0,066	0,398	0,927	0,009	0,112
40604	2e9	Map2k3	0,965	0,871	0,369	0,188	0,004	---	---	---	---	0,005	0,034	0,180	0,010	0,003	0,020
30807	3c10	Map2k3	---	0,418	0,880	0,030	0,216	---	0,153	---	0,530	0,029	0,000	0,837	0,003	0,948	0,002
21508	4g8	Map2k4	---	0,319	0,908	0,611	0,251	0,000	0,720	---	0,058	0,473	0,084	---	0,531	0,935	0,609
40701	3c6	Map2k5	0,534	0,872	0,384	0,917	0,042	---	---	---	---	0,528	0,995	---	0,303	0,137	---
11903	4h5	Map2k7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
21106	5a7	Map2k7	---	0,490	0,017	0,614	0,021	---	---	0,590	0,017	0,850	0,000	0,209	0,900	0,461	0,869
20408	2d9	Map3k5	---	0,519	0,578	0,554	0,989	0,032	0,125	0,074	---	---	0,001	0,231	0,381	0,109	0,028
30608	2g8	Map3k6	0,242	0,213	0,001	0,009	0,126	0,016	---	---	---	---	0,028	0,121	---	0,010	0,004
10507	2h7	Map4k4	0,923	0,144	0,806	0,523	0,835	0,812	0,263	0,930	0,415	0,018	0,304	0,638	---	0,410	0,282
10205	5d8	Map4k4	0,403	0,404	0,252	---	0,828	0,047	---	---	---	---	---	0,820	0,083	0,262	---
41007	5d8	Map4k4	---	0,538	0,488	0,339	0,409	---	0,434	---	---	---	0,044	0,420	0,042	0,391	---
40310	4d7	Map4k6	0,518	0,755	0,063	0,020	0,052	0,007	0,065	---	---	---	0,204	0,226	0,446	0,144	0,878
41510	5a2	Mapk11	---	0,156	0,000	0,122	0,015	---	0,173	---	---	0,181	0,001	0,693	0,006	0,095	0,001
30912	4h11	Mapk12	---	0,545	0,497	0,602	0,031	---	---	---	---	---	0,002	---	0,529	0,729	---
20909	4e10	Mapk13	---	0,571	0,927	0,022	0,441	---	---	---	0,758	---	0,019	---	0,190	0,023	0,063
11510	5f8	Mapk13	0,703	0,726	0,158	0,070	0,734	0,858	---	0,472	0,083	0,000	0,106	0,625	0,255	0,166	0,024
11102	5f8	Mapk13	---	---	0,159	0,001	0,308	0,860	0,535	0,853	0,211	0,040	0,092	0,571	---	0,966	0,331
40204	5e8	Mapk14	0,722	0,655	0,376	0,648	0,732	0,434	0,513	---	0,211	0,001	0,109	0,638	0,275	0,118	0,195
10401	4f12	Mapk14	---	0,677	---	0,062	0,141	0,401	0,054	0,572	0,923	---	---	---	---	0,019	0,226
30910	4f12	Mapk14	0,772	0,253	0,038	0,030	0,047	0,794	---	---	---	---	0,005	---	0,004	0,726	---
31304	1b11	Mapk3	0,019	0,774	0,001	0,294	0,161	---	0,140	0,864	0,750	0,002	0,051	0,116	0,225	0,112	0,000
21512	1b11	Mapk3	0,236	0,231	0,322	0,110	0,023	0,273	0,973	0,610	0,454	0,194	0,016	0,012	0,271	---	0,053
31402	1b11	Mapk3	0,067	0,384	0,406	0,419	0,795	0,238	0,003	0,842	0,374	0,020	0,403	0,356	0,036	0,768	0,102
10203	5d4	Mapk3	---	0,015	0,103	0,787	0,122	0,347	---	0,684	0,255	0,090	0,100	0,616	---	0,823	0,094
31011	5d4	Mapk3	---	0,139	0,630	0,964	0,709	0,638	---	0,543	0,582	0,235	0,480	0,438	0,815	0,721	---
20409	2e3	Mapk7	---	0,712	0,165	0,051	0,303	---	0,277	---	---	---	0,182	0,746	0,562	0,145	0,001
11611	7a1	Mapk8	0,237	0,341	0,637	0,043	0,115	0,006	---	0,771	0,032	0,510	0,187	0,276	0,215	0,002	0,522
11001	4e4	Mapk8ip	---	0,264	0,010	0,243	0,010	0,623	---	0,035	0,938	0,002	0,927	0,910	0,891	0,963	0,077
31401	1a2	Mapk8ip	0,376	0,214	0,045	0,825	0,981	0,077	0,000	---	0,552	0,020	0,470	0,436	0,114	0,949	0,033
30501	1a2	Mapk8ip	0,801	0,177	0,010	0,866	0,382	---	0,070	0,024	0,323	0,033	0,037	0,646	---	0,888	0,035
21511	1a2	Mapk8ip	---	0,429	0,221	0,393	0,069	---	0,406	0,061	0,451	0,000	0,001	0,896	---	0,095	0,615
31302	1a2	Mapk8ip	0,141	0,031	0,224	0,618	0,231	0,383	0,019	0,311	0,602	0,011	0,823	0,542	0,130	0,210	0,774
21905	1a3	Mapk8ip	0,461	0,013	0,072	0,027	0,072	---	---	0,496	0,420	0,496	0,001	0,086	0,303	0,580	0,053
41905	8h12	Mapk8ip3	---	---	0,790	0,229	0,078	---	0,125	---	---	---	---	0,712	---	0,599	---
31206	1d9	Mapk9	0,505	0,274	0,002	0,072	0,832	0,196	0,237	0,380	0,573	0,093	0,204	0,858	---	0,012	0,487
10410	2b7	Mapkapk5	0,660	0,095	0,550	0,005	0,355	---	0,008	0,777	0,181	---	0,015	0,010	0,018	---	0,230
30412	2f1	Mapkapk5	0,461	---	0,013	0,166	0,256	---	---	---	0,349	0,508	0,133	0,005	0,001	0,732	---
40709	4a10	Marcks	0,086	0,048	0,143	0,689	0,339	0,961	0,890	---	0,875	0,810	0,063	0,912	0,033	0,002	0,967
41511	5g9	Mast2	---	0,354	0,037	0,705	0,113	0,346	---	---	0,762	0,012	0,884	0,284	---	0,020	0,050
11806	4e6	Mclc	---	---	---	0,246	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
31201	1c3	Mrps15	0,063	0,298	0,526	0,668	0,580	0,512	0,221	---	0,000	0,559	0,039	0,824	---	0,217	0,969
30103	3c11	Mrps15	---	0,945	0,581	0,159	0,703	---	0,117	0,417	---	---	---	0,418	0,621	0,047	---
41209	10b2	Mt3	0,027	0,158	0,203	0,070	0,744	0,201	0,707	---	0,033	0,254	0,884	0,741	0,342	0,047	0,081
21101	3g3	Mtap	0,300	0,824	---	0,752	0,126	0,890	0,756	0,889	0,820	0,056	0,035	0,677	0,276	0,053	0,000
41505	8g2	Mtap1b	---	0,020	0,017	0,265	0,680	0,349	---	---	0,421	0,518	0,788	0,893	0,011	0,058	0,000
30304	8g2	Mtap1b	---	0,350	0,986	0,100	0,048	0,424	0,493	---	0,328	0,004	0,004	0,328	0,814	0,120	0,942
30309	3g4	Mtap2	0,108	0,406	0,764	0,588	0,904	---	0,015	---	0,794	0,701	0,066	0,599	0,775	0,626	0,058
30301	8f4	mt-Cox1	0,684	0,975	0,432	0,005	0,594	0,093	0,799	0,095	0,131	0,200	0,227	0,460	0,447	0,005	0,000
41502	8f4	mt-Cox1	0,366	0,329	0,538	0,030	0,499	0,437	0,743	0,414	0,244	0,017	0,527	0,482	0,232	0,038	0,502
10408	2a4	mt-Cytb	---	---	---	0,390	0,298	---	0,290	---	---	---	0,242	---	---	---	---
30409	2a5	mt-Cytb	0,574	0,366	0,800	0,021	0,681	---	0,430	0,154	0,018	0,009	0,023	0,459	0,254	0,001	0,001
21404	8a5	mt-Cytb	0,600	0,138	0,900	0,027	0,370	0,025	---	0,312	0,011	0,045	0,394	0,424	0,200	0,003	0,019

spotID	RZPD-Nr.	Genkürzel	Tag 1			Tag 2			Tag 3			Tag 4			Tag 5		
			1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h
11612	7a3	mt-Nd1	0,452	0,242	0,829	0,042	0,525	---	---	0,149	0,000	0,001	0,030	0,224	0,219	0,002	0,430
31707	7a3	mt-Nd1	0,745	0,236	0,058	0,108	0,290	0,004	0,454	---	0,000	0,004	0,021	0,295	0,182	0,001	0,009
40503	2a7	mt-Nd6	0,133	0,831	0,953	0,433	0,349	---	0,789	0,012	0,000	0,000	0,939	0,056	---	0,001	0,005
10902	2h10	Narg2	---	---	---	0,008	0,183	---	0,549	---	---	---	---	0,442	---	---	---
10107	1f11	Nck2	---	0,798	0,721	0,293	0,809	---	0,171	0,325	---	---	---	---	---	0,036	---
10511	1g10	Nck2	---	0,160	0,352	0,730	0,128	0,335	---	0,009	---	0,824	---	0,190	0,261	---	0,005
30512	1g11	Nck2	---	0,042	0,185	0,346	0,005	0,464	0,478	---	---	0,000	0,174	---	0,575	---	---
30408	1h11	Nck2	0,310	---	0,526	0,017	0,709	0,551	---	---	---	0,159	0,017	0,039	0,215	0,288	---
40909	4b3	Nfat5	0,492	0,217	0,421	0,107	0,585	0,378	0,939	0,840	0,175	0,001	0,130	0,726	0,027	0,532	0,080
30310	4b3	Nfat5	---	0,447	0,330	0,348	0,495	---	---	---	0,280	---	0,451	0,917	0,087	0,888	0,132
31910		Ngb	---	0,632	0,953	0,874	0,921	0,129	---	---	---	---	---	0,543	---	0,840	---
20306	2c1	Nnat	---	0,134	0,169	0,766	0,892	0,043	0,913	---	0,074	0,505	0,006	0,500	0,916	0,135	0,010
21606	10d2	Nos2	---	0,082	0,667	0,034	0,040	0,993	0,789	0,036	0,000	0,171	0,054	0,010	0,030	0,002	0,000
41005	10d2	Nos2	0,157	0,063	0,268	0,026	0,593	0,031	---	---	0,000	---	0,120	0,139	---	0,962	---
40402	10d2	Nos2	---	---	---	0,990	0,273	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
11105	6c10	Nos2	0,280	---	0,621	0,262	0,415	---	0,824	0,165	0,447	---	---	0,114	0,100	0,143	0,094
11205	1d6	Npc2	---	0,487	0,083	0,037	0,478	---	0,674	0,517	0,680	0,055	0,411	0,007	0,154	0,104	0,020
30206	5d9	Nr1h2	---	0,024	0,608	0,072	0,000	---	0,000	0,683	0,202	0,017	0,004	0,675	---	0,436	0,039
21007	5d9	Nr1h2	---	0,701	0,035	0,540	0,414	0,455	---	0,643	0,674	---	0,348	0,782	0,582	0,779	0,660
11306	1c11	Nrgn	0,162	0,008	0,265	0,921	0,457	---	0,436	0,971	0,562	0,004	0,693	0,882	0,785	0,239	0,000
11206	1d11	Nrgn	---	0,437	0,803	0,236	0,802	---	0,133	0,404	0,959	0,219	0,128	0,810	0,333	0,071	0,864
31203	1c8	Pacsin1	---	0,607	0,001	0,487	0,203	0,212	0,213	---	0,032	0,743	0,076	0,204	0,253	0,478	0,007
30604	2c3	Pacsin1	---	0,327	0,961	0,416	0,926	---	0,669	---	0,805	0,657	0,045	0,046	0,415	0,787	0,006
10905	2c3	Pacsin1	1,000	0,895	0,877	0,036	0,521	---	0,479	0,340	0,759	---	0,618	0,707	0,049	0,330	0,031
31202	1c5	Pak1	0,086	---	0,195	0,301	0,150	0,025	0,001	---	0,254	0,847	0,515	0,198	0,036	0,582	0,160
10512	1g12	Pak1	0,272	0,149	0,857	0,089	0,502	---	0,164	0,408	0,367	0,134	0,000	0,117	0,001	0,772	0,538
30507	2h1	Pctk1	0,313	0,455	0,240	0,039	0,204	0,542	---	---	0,043	0,126	0,186	0,295	---	0,158	0,465
41104	4f9	Pctk3	0,022	0,990	0,178	0,442	0,020	---	0,089	---	0,097	---	0,001	---	0,039	0,126	0,834
21312	10e2	Pde8b	---	---	0,446	0,022	0,083	0,078	0,741	0,507	0,053	---	0,001	---	0,458	0,004	---
31007	10e2	Pde8b	---	---	0,771	0,091	0,062	0,369	---	---	---	---	0,005	0,002	0,272	0,017	---
30907	4c12	Pick1	---	0,977	0,296	0,466	0,129	0,351	---	---	---	---	---	0,726	0,042	0,061	---
21105	5a5	Pick1	0,502	0,230	0,146	0,244	0,191	---	---	0,087	0,627	0,032	0,000	0,075	---	0,471	0,187
10811	3e7	Pitrm1	---	0,154	0,501	0,004	0,622	---	---	0,009	---	---	---	0,272	0,016	---	0,001
31003	4f3	Pkek	---	0,684	0,480	0,088	0,026	0,366	0,243	---	0,486	0,001	0,007	0,366	0,137	0,059	0,241
30906	3f6	Pkia	0,523	0,471	0,003	0,028	0,164	---	---	---	---	---	0,440	0,326	0,081	0,004	0,449
20907	3f6	Pkia	0,141	0,000	0,823	0,225	0,629	---	---	0,717	0,039	0,331	0,295	0,899	0,752	0,064	0,803
41204	1e8	Pkib	0,158	0,347	0,060	0,335	0,034	0,207	0,999	---	0,270	0,483	0,214	0,365	0,539	0,380	0,518
31501	8d3	Pla2r1	---	0,645	0,649	0,820	0,000	0,660	0,563	---	---	0,402	0,090	---	0,000	0,504	0,025
10805	2d5	Prkag1	0,946	0,111	0,638	0,826	0,259	0,145	---	0,546	---	0,174	0,025	0,988	0,003	0,543	0,037
20607	2d5	Prkag1	---	0,557	0,027	0,409	0,852	0,074	---	---	0,994	0,455	0,888	0,453	0,373	0,269	0,729
21201	1e3	Prkar1b	---	0,629	0,926	0,611	0,164	0,371	---	0,006	0,765	0,132	0,021	0,804	0,692	0,643	0,045
41201	1e2	Prkcb	0,905	0,467	0,180	0,072	0,347	0,000	---	---	---	0,010	0,093	0,001	0,419	0,255	0,678
30803	1c12	Prkcc	0,125	0,299	0,004	0,230	0,278	0,887	0,070	---	0,893	0,760	0,766	0,394	0,054	0,012	0,000
11204	1c12	Prkcc	0,660	0,035	0,024	0,137	0,010	0,039	0,025	0,168	0,250	0,373	0,210	0,974	0,482	0,002	0,197
20706	3h3	Prkcd	0,112	0,352	0,889	0,200	0,014	0,597	---	0,454	---	0,759	0,000	0,056	0,004	0,077	0,000
20410	2h3	Prkch	0,454	0,837	0,362	0,332	0,364	0,982	0,615	0,978	0,980	0,077	0,093	0,934	0,678	0,903	0,312
40109	1g8	Prkci	0,525	0,015	0,315	0,067	0,502	0,002	0,190	---	0,687	0,460	0,196	0,695	---	0,120	0,223
40407	2d2	Prkci	---	0,015	0,033	0,781	0,388	0,987	---	---	0,260	0,840	0,346	0,036	0,068	0,998	0,964
41508	4e9	Prkcm	0,173	0,162	0,252	0,395	0,148	0,602	---	---	0,702	0,766	0,518	0,755	0,929	0,570	0,263
40904	4a5	Prkcm	0,867	0,219	0,831	0,864	0,189	---	0,025	---	---	---	---	---	0,424	0,503	---
10801	4e5	Prkcg	---	0,012	0,234	0,078	0,513	0,526	0,283	0,183	0,815	---	0,069	0,476	0,633	0,370	0,139
10101	3b1	Prkcsb	---	---	0,080	0,000	0,824	---	0,777	0,876	0,698	0,088	0,543	0,736	---	0,455	0,038
40702	3d4	Prkcsb	---	---	0,034	0,049	0,001	0,002	---	---	0,003	0,557	0,122	0,289	0,001	0,207	0,001
20805	3b5	Prkcz	0,597	0,018	0,558	0,133	0,078	0,620	---	---	0,457	0,820	0,000	0,023	0,000	0,716	0,003

spotID	RZPD-Nr.	Genkürzel	Tag 1			Tag 2			Tag 3			Tag 4			Tag 5		
			1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h
30102	3b5	Prkcz	---	0,484	0,482	0,064	0,014	---	---	0,035	---	---	---	0,641	0,246	0,011	---
30307	3f4	Prkg2	---	0,178	0,012	0,486	0,214	0,069	0,816	---	---	---	---	---	0,480	0,397	---
10710	3h12	Prkra	---	0,322	0,533	0,042	0,867	0,032	---	0,317	0,694	0,207	0,376	0,613	0,493	---	0,282
20709	4a11	Prmt5	---	0,116	0,505	0,600	0,122	0,797	---	---	0,173	0,401	0,039	0,228	0,661	0,025	---
11004	4d8	Prpf1	---	---	---	0,158	0,825	---	---	---	---	---	---	---	0,012	---	---
10503	2a6	Psg29	0,116	0,001	0,385	0,019	0,112	---	---	0,309	0,005	0,564	0,006	0,237	0,065	0,000	0,174
20412	2a6	Psg29	0,296	0,189	0,379	0,055	0,215	0,101	0,871	0,267	0,000	0,007	0,002	0,269	0,238	0,000	0,493
40612	3a11	Psmb5	0,125	0,234	0,342	0,113	0,866	0,318	0,742	---	0,220	0,014	0,070	0,780	0,853	0,000	0,231
21707	7d2	Ptgis	---	0,320	0,049	0,062	0,172	0,095	0,602	0,042	0,006	0,149	0,004	0,000	---	0,001	0,017
31811	7d2	Ptgis	0,292	0,809	0,343	0,146	0,016	0,393	0,006	---	0,964	---	0,034	0,524	---	0,011	0,040
40606	2g2	Ptk6	0,269	0,029	0,626	0,805	0,029	0,865	0,006	---	0,074	0,220	0,061	0,634	0,076	0,055	0,000
30712	4a2	Ptk9	---	0,942	0,542	0,422	0,078	---	---	---	0,004	0,675	0,125	0,014	---	0,915	0,185
11111	1a5	Ptk9l	0,278	0,013	0,808	0,001	0,904	0,129	---	0,442	0,007	0,185	0,000	0,011	---	0,006	0,387
10903	2e11	Ptms	0,309	0,795	0,064	0,000	0,324	0,208	0,374	0,195	0,228	0,341	0,978	0,979	0,169	0,320	0,002
40605	2e11	Ptms	0,231	0,576	0,169	0,652	0,886	0,097	0,664	---	0,920	0,204	0,986	0,958	0,921	0,257	0,035
40205	5e10	Rbbp9	0,202	0,001	0,791	0,182	0,406	---	0,178	0,021	0,210	0,092	0,000	0,230	0,023	0,155	0,044
41509	4h6	Rbbp9	---	0,253	0,513	0,161	0,174	---	0,393	---	0,460	0,585	0,411	0,363	---	0,005	0,851
31705	8c1	Rbp1	0,144	0,729	0,102	0,223	0,350	0,131	---	0,651	0,557	0,101	0,052	0,001	0,715	0,005	0,023
41407	8c1	Rbp1	---	---	---	0,344	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
20901	3g7	Rnf44	0,295	0,145	0,511	0,722	0,119	0,000	0,772	0,482	0,487	---	0,598	0,698	0,851	0,148	0,171
20703	3g7	Rnf44	0,572	0,703	0,826	0,085	0,175	0,004	0,009	0,401	0,049	0,201	0,045	0,741	0,200	0,388	0,637
41802	5h3	RP23-374N19	0,099	0,223	0,628	0,301	0,331	0,274	---	---	---	---	0,005	0,823	0,104	0,292	0,006
40505	2f9	Rpl18	0,209	0,605	0,092	0,169	0,154	0,623	0,818	---	0,813	0,907	---	0,932	0,335	0,780	0,044
10307	3f10	Rpl5	---	---	---	0,004	0,823	---	0,082	---	---	---	---	---	---	0,000	---
20912	3f10	Rpl5	0,418	---	---	0,004	0,255	---	0,971	---	---	---	---	---	---	---	---
41010	5b4	Rps15	0,701	0,100	0,429	0,981	0,000	---	0,310	---	0,324	0,136	0,001	0,936	---	---	0,138
40406	5b4	Rps15	0,770	0,263	0,083	0,703	0,257	0,091	0,497	0,374	0,564	0,389	0,086	0,960	0,682	0,716	0,222
40408	2d7	Rps6ka1	0,842	0,440	0,306	0,272	0,063	---	0,213	---	0,843	0,273	0,085	0,982	---	0,837	0,006
20809	3a12	Sds	---	---	---	0,406	0,245	---	---	0,075	---	---	---	---	---	0,186	0,002
10104	3d6	Sema6c	---	0,012	0,694	---	0,040	---	---	0,790	0,772	---	---	0,519	---	0,908	0,070
10412	2d1	Slc18a2	---	0,049	0,253	0,023	0,010	---	---	0,001	0,115	---	0,156	0,076	0,014	0,112	---
30809	3f1	Slc1a1	---	---	0,767	0,040	0,097	0,041	---	---	0,052	---	0,001	0,001	0,002	0,036	0,040
10908	3f1	Slc1a1	0,654	0,199	0,555	0,442	0,923	---	---	0,275	0,322	0,143	0,388	0,719	---	0,570	0,268
20812	3f1	Slc1a1	---	---	0,534	0,021	0,450	0,183	0,239	0,437	0,204	---	0,001	0,609	0,006	0,009	0,452
30109	5h10	Slc1a4	0,759	---	---	0,343	0,927	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
10612	1h10	Slc25a20	---	0,976	0,180	0,099	0,073	---	---	0,000	0,570	0,050	0,278	0,836	0,248	0,388	0,029
30901	1h10	Slc25a20	0,238	---	0,326	0,143	0,126	---	0,135	---	---	0,468	---	0,668	0,020	0,083	---
41203	1e6	Slc25a5	0,730	0,337	0,072	0,035	0,139	0,009	---	---	0,522	0,246	0,025	0,146	0,108	0,759	0,952
40805	3b4	Slc4a1	---	0,060	0,189	0,998	0,834	0,948	0,535	---	0,094	0,373	---	0,123	0,127	0,339	0,249
11101	5a4	Slc6a1	---	---	0,346	0,466	0,158	0,176	0,731	0,449	0,231	---	0,458	0,727	0,006	0,302	0,438
30502	5b3	Slc6a1	---	---	---	0,007	0,713	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
40812	3e11	Slc6a13	---	---	0,348	0,790	0,094	0,185	0,276	---	0,898	---	---	---	0,002	0,091	0,022
40802	1h6	Slc6a4	0,941	0,151	0,028	0,888	0,793	0,582	---	---	0,010	0,916	0,003	0,123	---	0,595	0,092
41004	6d5	Slc6a4	0,351	0,067	0,405	0,021	0,108	---	0,430	---	---	---	---	0,094	0,081	0,051	---
21706	7a2	Smek1	0,998	0,222	0,883	0,013	0,130	0,152	0,767	0,213	0,001	0,016	0,121	0,217	0,119	0,001	0,012
31612	7a2	Smek1	0,399	0,121	0,794	0,107	0,235	0,007	0,421	---	0,000	0,000	0,122	0,228	0,624	0,000	0,253
31210	10a2	Sncb	0,034	0,375	0,968	0,928	0,552	0,937	0,019	---	0,607	0,012	0,005	0,867	0,862	0,402	0,007
10812	3e9	Sod3	0,092	0,282	0,345	0,000	0,025	0,004	---	0,945	0,138	0,007	0,006	---	0,035	0,516	0,173
10103	3d1	Sod3	---	0,157	0,763	0,207	0,044	0,002	---	0,189	---	0,223	0,135	0,795	---	0,601	0,030
41803	5h6	Speg	0,133	0,001	0,001	0,017	0,241	0,120	0,102	---	0,402	0,000	0,191	0,636	0,436	0,179	0,739
40710	4a12	Srpk2	---	0,919	0,279	0,529	0,989	---	0,823	---	0,451	0,524	---	0,742	0,041	0,002	0,299
40708	4a7	Ssbp4	0,509	0,003	0,028	0,430	0,172	0,005	0,014	0,933	0,012	0,130	0,002	0,555	0,358	0,064	0,965
41504	8f9	Stat3	---	0,746	0,587	0,066	0,797	---	0,649	---	---	0,405	0,000	0,975	0,282	0,755	0,006
30303	8f9	Stat3	0,194	0,758	0,104	0,151	0,420	---	0,262	0,879	0,843	---	0,508	0,745	0,388	0,365	0,468

spotID	RZPD-Nr.	Genkürzel	Tag 1			Tag 2			Tag 3			Tag 4			Tag 5			
			1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	
41506	8g5	Sta3	0,179	0,742	0,533	0,794	0,156	0,985	---	0,214	0,993	0,072	0,075	0,715	0,020	0,329	0,002	
30402	4g1	Stra13	---	0,339	0,510	0,471	0,223	0,788	0,028	0,813	---	---	0,001	0,407	0,643	0,367	0,806	
40906	4b12	Strap	---	0,442	0,548	0,098	0,458	0,755	0,110	---	---	---	---	0,167	0,889	0,930	0,007	
41303	1e1	Stx8	0,063	0,267	0,110	0,544	0,056	---	0,123	---	0,014	0,206	0,256	0,129	0,263	0,048	0,308	
20711	4b11	Stx8	0,482	---	0,199	0,723	0,098	0,698	0,550	0,009	0,890	0,155	0,088	0,671	0,802	0,429	0,083	
40207	6b12	Syt1	---	0,492	0,806	0,666	0,151	0,810	---	---	0,429	---	0,372	0,552	---	0,067	0,002	
11607	6b12	Syt1	0,056	0,869	0,163	0,974	0,079	0,205	0,005	0,299	0,887	0,017	0,074	0,650	---	0,002	0,010	
10308	3g1	Syt12	---	0,002	0,008	0,452	0,010	---	---	0,497	0,012	---	---	0,987	---	---	---	
10405	4g12	Syt15	---	0,286	0,268	0,513	0,404	0,412	---	0,322	0,909	0,047	0,005	0,762	0,175	0,218	0,005	
30911	4h8	Syt2	---	0,438	0,571	0,868	0,458	---	---	---	0,603	---	0,801	0,525	0,027	0,004	0,031	
31204	1c10	Syt3	0,695	0,412	0,810	0,759	0,733	0,080	0,010	---	0,001	0,826	0,239	0,060	---	0,211	0,000	
41111	1b9	Syt5	---	0,352	0,661	0,099	0,575	0,156	0,606	0,911	0,122	0,006	0,013	0,849	0,933	0,511	0,016	
11303	1b9	Syt5	0,586	0,342	0,982	0,090	0,239	0,001	0,013	0,666	0,050	0,331	0,002	0,809	0,876	0,005	0,480	
30705	3c1	Syt5	0,836	0,153	0,417	0,726	0,776	0,911	0,010	---	0,742	---	0,611	0,013	0,246	0,939	0,010	
41002	6b6	Syt6	0,791	0,578	0,948	0,988	0,094	0,214	0,282	---	0,551	---	0,116	0,172	0,046	0,209	0,430	
30211	6b6	Syt6	---	0,444	0,174	0,696	0,698	---	---	---	---	---	---	---	---	0,363	---	
31101	5h11	Syt7	---	0,112	0,068	0,301	0,161	---	0,686	---	0,610	0,001	0,000	0,349	0,188	0,590	0,117	
30209	5h11	Syt7	---	0,625	0,943	0,103	0,390	0,250	0,183	---	---	---	0,004	0,270	---	0,514	---	
11003	4b1	Syt13	0,662	0,008	0,119	0,666	0,276	0,310	0,196	0,584	0,428	0,000	0,721	0,704	0,883	0,001	0,036	
40307	4c7	Syt13	---	0,161	0,190	0,168	0,536	0,002	0,073	0,017	---	---	---	0,301	0,084	0,328	---	
30511	1g9	Tbx3	0,529	0,882	0,022	0,979	0,107	---	---	---	0,408	---	0,956	---	0,014	0,500	0,042	
10501	1g9	Tbx3	---	0,154	0,622	0,059	0,053	0,503	0,533	0,979	0,837	0,159	0,026	0,511	---	0,247	0,380	
21407	8c2	Tcf3	---	0,023	0,159	0,168	0,356	0,155	0,712	0,278	0,008	---	0,648	0,048	0,623	0,726	0,401	
10608	2g9	Terf1	0,651	0,089	0,021	0,405	0,701	0,162	---	0,683	---	---	---	---	---	0,154	0,006	
11902	3f9	Terf2ip	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
30405	4g11	Terf2ip	0,537	0,601	0,798	0,846	0,071	0,878	0,036	---	---	---	0,020	0,278	0,058	---	---	
10607	2g6	Testk1	---	0,834	0,342	0,727	0,210	0,180	---	0,287	0,860	0,958	0,006	0,344	0,594	0,216	0,197	
10906	2g6	Testk1	0,292	0,907	0,063	0,702	0,661	0,528	---	0,379	---	---	0,140	0,417	---	0,004	0,777	
20802	2h8	Testk1	---	0,135	0,644	0,188	0,915	0,001	0,038	0,523	0,450	0,002	0,097	0,081	0,181	0,768	0,022	
30611	2h4	Timm10	---	0,569	0,159	0,123	0,323	---	---	---	0,054	0,720	0,076	0,525	0,846	0,308	0,061	
30509	1a11	Timm13	---	0,818	0,564	0,013	0,579	0,328	0,076	0,432	0,627	0,000	0,348	0,961	---	0,148	0,035	
41107	1a11	Timm13	---	0,661	0,002	0,016	0,264	0,045	---	0,049	0,004	0,001	0,490	0,339	0,226	0,363	0,816	
20510	2f11	Timm17a	---	0,087	0,092	0,836	0,092	0,081	0,519	0,365	0,045	0,715	0,182	0,376	0,594	---	0,001	
20910	4e1	Timm17b	---	---	0,622	0,119	0,937	---	---	0,754	---	---	---	---	0,683	0,149	0,022	
10105	3d8	Timm17b	---	0,365	0,675	0,119	0,430	---	---	0,604	0,353	---	---	0,543	---	0,363	0,001	
30808	3d8	Timm17b	---	0,198	0,109	0,462	0,388	0,945	---	---	---	0,002	0,000	0,160	0,978	0,193	0,092	
31111	1a4	Timm22	0,453	0,242	0,961	0,485	0,843	0,279	0,617	0,115	0,030	0,956	0,000	0,004	0,559	0,553	0,201	
20803	1a4	Timm22	0,147	0,537	0,197	0,619	0,171	0,056	0,551	0,218	0,973	0,420	0,503	0,040	0,701	0,070	0,355	
20502	1f12	Timm44	---	0,910	0,664	0,848	0,755	0,003	0,084	0,372	0,862	0,645	0,502	0,162	0,078	0,098	0,792	
20402	1f12	Timm44	---	0,298	0,076	0,139	0,542	---	0,745	0,867	0,027	---	---	---	0,023	0,856	---	
10106	3d10	Timm8a1	0,309	0,283	0,149	0,032	0,314	0,017	0,228	0,230	0,001	0,714	0,010	0,431	0,077	0,001	0,001	
11012	5d7	Timm8a1	0,445	0,175	0,703	0,307	0,479	---	---	0,453	0,512	---	0,079	0,988	---	0,998	0,019	
30205	5d7	Timm8a1	0,477	0,165	0,626	0,965	0,410	---	0,739	0,816	0,690	0,029	0,032	0,943	0,854	0,361	0,103	
21203	1e7	Timm8b	0,206	0,555	0,395	0,121	0,017	0,642	---	0,747	0,005	---	0,027	0,229	0,090	0,059	0,134	
21110	1b8	Timm8b	0,432	0,198	0,053	0,050	0,209	0,217	0,244	0,288	0,883	0,378	0,673	0,533	0,282	0,732	0,734	
10411	2c7	Timp2	0,833	0,099	0,963	0,000	0,857	---	0,344	0,435	---	0,467	0,120	0,754	---	---	0,210	
31105	5g3	Timp2	---	0,158	0,628	0,669	0,020	0,097	0,575	---	0,104	---	0,107	---	0,005	0,087	0,405	
20207	6c1	Timp2	---	---	0,100	0,807	0,434	---	---	0,877	0,777	---	0,471	---	0,378	0,053	0,413	
20405	6c1	Timp2	---	0,009	---	---	0,245	---	0,507	0,338	---	---	---	---	0,990	0,066	0,816	
31106	6d1	Timp2	---	0,161	0,029	0,008	0,037	0,143	---	---	0,605	0,129	0,008	0,053	0,008	0,856	0,137	
30410	2f6	Timp2 (Ddc8)	0,871	0,030	0,052	0,028	0,316	0,015	0,239	0,225	0,000	0,115	0,085	0,159	0,059	0,001	0,024	
21802	5h4	Tmem30a	---	0,110	0,001	0,440	0,845	---	---	0,649	---	---	---	0,533	0,040	0,787	0,413	
11104	5g2	Tomm22	---	0,949	0,352	0,851	0,737	---	---	0,582	0,635	0,180	0,101	0,212	0,100	0,723	0,226	0,000
41103	4e12	Trim7	0,011	0,370	0,565	0,018	0,013	---	0,955	---	---	0,042	0,300	0,763	0,014	0,142	0,011	

spotID	RZPD-Nr.	Genkürzel	Tag 1			Tag 2			Tag 3			Tag 4			Tag 5		
			1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h	1h	6h	24h
21302	1d8	Tspyl	0,048	0,123	0,194	0,540	0,301	0,005	---	0,084	0,003	0,323	0,016	0,646	0,954	0,008	0,896
40409	2e2	Ttk	0,310	0,933	0,226	0,551	0,993	---	0,757	0,182	0,642	0,205	0,094	0,795	0,642	0,961	0,429
41112	1c1	Tubb2	0,468	0,209	0,530	0,532	0,232	---	0,396	0,911	0,629	0,259	0,029	0,747	0,492	0,001	0,176
11304	1c1	Tubb2	0,961	1,000	0,234	0,263	0,285	0,075	0,167	0,849	0,288	0,114	0,181	0,279	0,612	0,899	0,953
31701	7h9	Tubb6	0,180	0,682	0,528	0,019	0,011	0,374	0,610	---	0,551	---	0,003	0,811	0,014	0,593	0,037
11708	7h9	Tubb6	0,167	0,089	0,230	0,960	0,290	0,080	---	0,495	---	---	0,360	---	0,062	0,880	---
30503	1g5	Tyrobp	0,182	0,263	0,942	0,953	0,005	---	---	---	---	0,016	---	---	---	0,891	---
30108	1g5	Tyrobp	---	0,606	0,339	0,514	0,032	---	0,588	0,866	0,241	---	0,000	---	---	---	---
41812	2b10	Tyrobp	0,137	0,219	0,225	0,374	0,696	---	0,792	---	0,488	0,147	0,061	0,711	0,592	0,731	0,028
11112	1a8	Ubb	0,363	0,036	0,942	0,069	0,056	0,029	0,017	0,430	0,003	0,004	0,009	0,009	0,364	0,036	0,386
40212	8f2	Usp4	0,047	0,383	0,868	0,169	0,088	0,140	0,836	0,545	0,288	0,002	0,045	0,475	0,758	0,579	0,022
41501	8f2	Usp4	0,713	0,041	0,073	0,268	0,239	---	---	0,382	0,290	0,126	0,827	0,928	0,185	0,005	0,029
40808	4d6	Vglut	---	---	---	0,040	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
21405	8a7	Xcl1	0,413	0,060	0,965	0,056	0,237	0,092	---	0,402	0,204	0,043	0,696	0,283	0,201	0,006	0,200
31907	1d12	Zdhhc5	0,291	0,733	0,310	0,171	0,458	0,346	0,267	---	0,335	0,108	0,727	0,798	---	0,755	0,018
31706	8d1	Zfp3612	---	0,279	0,073	0,306	0,906	0,947	---	---	0,859	0,028	0,081	0,951	---	0,528	0,004

Tabelle 5: Gennamen der mit der Clusteranalyse identifizierten Gene.

Die mit der Clusteranalyse identifizierten Gene sind hier mit ihrem vollständigen Gennamen (nach <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) nach der RZPD-Nummer geordnet aufgelistet. Die Sequenz der kursiv dargestellten Gene wurde nicht überprüft.

RZPD-Nummer	Genkürzel	Genname
1a11	Timm13	Translokase 13-Homologon (innere Mitochondrienmembran)
1b10	Camk2b	Calcium-Calmodilin-abhängige Proteinkinase II, Untereinheit b
1e7	Timm8b	Translokase 8b-Homologon (innere Mitochondrienmembran)
1f2	Gabrq	GABA _A -Rezeptor, Untereinheit q
1g5	Tyrobp	Tyrosinkinase-bindendes Protein Tyro
1g12	Pak1	p21(Mitose-Inhibitor)-aktivierte Kinase 1
1h2	Cox8a	Cytochrome C-Oxidase, Untereinheit VIIIa
1h7	Kcna7	spannungsabhängiger Kaliumkanal 7 der Shaker-Subfamilie
2a5	mt-Cytb	mitochondriales Cytochrom B
2a6	Psg29	Schwangerschafts-spezifisches Glykoprotein 29
2a7	mt-Nd6	mitochondriale NADH-Dehydrogenase, Untereinheit 6
2a8	Atp1b3	Na ⁺ /K ⁺ -transportierende ATPase, b3-Untereinheit
2b5	Igtp	Interferon g- induzierte GTPase
2c1	Nnat	Neuronatin
2c3	Pacsin1	Neuron-spezifisches Substrat 1 der Proteinkinase C und Caseinkinase
2c7	Timp2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2
2d7	Rps6ka1	ribosomale S6-Proteinkinase 1
2f6	Timp2	Inhibitor der Metalloproteinase 2
2g12	Cks1b	CDC28 Proteinkinase 1b
2g3	Kcnk4	Kalium-Kanal 4, K-Subfamilie
2g9	Terf1	Telomer-bindendes Protein 1
3a7	Il1b	Interleukin 1b
3a11	Psmb5	Proteasom b5
3b1	Prkcsh	Proteinkinase C-Substrat 80k-h
3b5	Prkcz	Proteinkinase C, z-Isoform
3b7	Cib1	Calcium- und Integrin-bindendes Protein 1 (Calmyrin)
3c10	Map2k3	Mitogen-aktivierte Protein(II)kinase 3
3d3	Gpld1	Glykosylphosphatidylinositol-spezifische Phospholipase D1

RZPD- Nummer	Genkürzel	Genname
3d10	Timm8a1	Translokase 8a1-Homologon (innere Mitochondrienmembran)
3e3	Clcnkb	Chlorid-Kanal Kb
3e11	Slc6a13	GABA-Transporter 13, Familie 6 (GABA _A -Transporter 3)
3f6	Pkia	Proteinkinase-Inhibitor a
3g7	Rnf44	Ringfingerprotein 44
3h9	<i>Timm17a</i>	<i>Translokase 17a (innere Mitochondrienmembran)</i>
4a2	Ptk9	Tyrosinkinase 9
4a9	Kcnq1	spannungsgesteuerter Kalium-Kanal 1, Q-Subfamilie
4b11	Tomm40	Translokase 40-Homologon (äußere Mitochondrienmembran)
4c3	Kcnmb1	stark Calcium-aktivierbarer Kalium-Kanal b1, M-Subfamilie
4c6	Kcnn1	schwach/mittelstark Calcium-aktivierbarer Kalium-Kanal 1, N-Subfamilie
4d3	Grin3b	NMDA-Rezeptor 3B
4e2	Gabbr2	GABA _A -Rezeptor, Untereinheit r2
4g8	Map2k4	Mitogen-aktivierbare Protein(II)kinase 4
4g12	Syt15	Synaptotagmin 15
5a7	Map2k7	Mitogen-aktivierbare Protein(II)kinase 7
5b4	Rps15	ribosomales Protein S15
5c11	Centb5	Centaurin b5
5d5	2610041P16Rik	RIKEN cDNA 2610041P16-Gen
5e8	Mapk14	Mitogen-aktivierbare Proteinkinase 14
5h2	Ifngr1	Interferon-Rezeptor g1
5h11	Syt7	Synaptotagmin 7
6a5	Camk2a	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II, a-Untereinheit
6a11	Hecw1	HECT-, C2- und WW-Domäne enthaltende E3-Ubiquitin-Proteinligase 1, Transkriptvariante 4
6b9	Igfbp2	an Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor bindendes Protein
6c8	Baiap2	mit gehirnspezifischen Angiogenese-Inhibitor 1 assoziiertes Protein 2
6d4	Gabre	GABA _A -Rezeptor, Untereinheit e
7a2	Smek1	SMEK-Homologon 1, Mek1-Inhibitor
7a3	mt-Nd1	mitochondriale NADH-Dehydrogenase, Untereinheit 1
7b4	Dapk2	Tod-assoziierte Kinase 2
7b10	Dusp5	Dual-spezifische Phosphatase 5
7c4	Cst3	Cystatin C
7c7	Kcnj4	Einwärtsgerichteter Kaliumkanal 4, J-Subfamilie
7d1	<i>Grm8</i>	<i>metabotroper Glutamat-Rezeptor 8</i>
7d2	Ptgis	Prostaglandin I2-Synthase
7f1	<i>Apoa2</i>	<i>Apolipoprotein A2</i>
7f5	Egf	epidermaler Wachstumsfaktor
7h6	Erf	Ets2-Repressor
7h9	Tubb6	Tubulin b6
8a5	mt-Cytb	mitochondriales Cytochrom B
8a7	Xcl1	Chemokin-Ligand 1
8b1	Cnr2	Cannabinoid-Rezeptor 2
8b12	Casp4	Caspase 4
8c1	Rbp1	Retinol-bindendes Protein 1 (zellulär)
8c2	Tcf3	Transkriptionsfaktor 3
8d3	Pla2r1	Phospholipase A2-Rezeptor 1
8d4	Ifna	Interferon a
8f2	Usp4	Ubiquitin-spezifische Peptidase 4
8f4	mt-CO1	mitochondriale Cytochrom C-Oxidase, Untereinheit 1
8f11	Thra	Thyroid-Hormon-Rezeptor a1
8g2	Mtap1b	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1B
8g5	Stat3	Signaltransduktionsprotein und Transkriptionsaktivator 3, Transkriptvariante 2
8h8	<i>Met</i>	<i>Met-Proto-Onkogen</i>
10d2	Nos2	Induzible NO-Synthase 2
10d8	Cnr2	Cannabinoid-Rezeptor 2
10e2	Pde8b	Phosphodiesterase 8B

-
- Abel T, Martin KC, Bartsch D, und Kandel ER. Memory supressor genes: inhibitory constraints on the storage of long-term memory. *Science* 1998, 279: 338-341
- Aguilar-Valles A, Sánchez E, de Gortari P, García-Vazquez AI, Ramírez-Amaya V, Bermúdez-Rattoni F, und Joseph-Bravo P. The expression of TRH, its receptors and degrading enzyme is differentially modulated in the rat limbic system during training in the Morris water maze. *Neurochem Int* 2007, 50: 404-417
- Aigner L, Arber S, Kapfhammer JP, Laux T, Schneider C, Botteri F, Brenner HR, und Caroni P. Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice. *Cell* 1995, 83: 269-278
- Akers RF und Routtenberg A. Protein kinase C phosphorylates a 47 Mr protein (F1) directly related to synaptic plasticity. *Brain Res* 1985, 334: 147-151
- Alarcon JM, Malleret G, Touzani K, Vronskaya S, Ishii S, Kandel ER, und Barco A. Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/- mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron* 2004, 42: 947-959
- Albensi BC und Mattson MP. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse* 2000, 76: 1099-1114
- Alder J, Thakker-Varia S, Crozier RA, Shaheen A, Plummer MR, und Black IB. Early presynaptic and late postsynaptic components contribute independently to brain-derived neurotrophic factor-induced synaptic plasticity. *J Neurosci* 2005, 25: 3080-3085
- Allen PB, Ouimet CC, und Greengard P. Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 9956-9961
- Almeida OP, Schwab SG, Lautenschlager NT, Morar B, Greenop KR, Flicker L, Wildenauer D. KIBRA Genetic Polymorphism Influences Episodic Memory in Later Life, but Does Not Increase the Risk of Mild Cognitive Impairment. *J Cell Mol Med* 2008, Jan 11 [Epub ahead of print]

-
- Alsina B, Vu T, und Cohen-Cory S. Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: dynamics and modulation by BDNF. *Nat Neurosci* 2001, 4: 1093-1101
- Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, Gotthardt M, Spoelgen R, Behlke J, von Arnim CA, Breiderhoff T, Jansen P, Wu X, Bales KR, Cappai R, Masters CL, Gliemann J, Mufson EJ, Hyman BT, Paul SM, Nykjaer A, und Willnow TE. Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102: 13461-13466
- Andersen P, Morris RGM, Amaral D, Bliss T, und O'Keefe J. *The Hippocampus Book*. New York, Oxford University Press 2007.
- Andreadis A, Brown WM, und Kosik KS. Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 1992, 31: 10626-10633
- Ashley CT, Sutcliffe JS, Kunst CB, Leiner HA, Eichler EE, Nelson DL, und Warren ST. Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nat Genet* 1993, 4: 244-251
- Bacskai BJ, Hochner B, Mahaut-Smith M, Adams SR, Kaang BK, Kandel ER, und Tsien RY. Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science* 260: 222-226
- Ballard JL, Peeva VK, de Silva CJ, Lynch JL, und Swanson NR. Comparison of Alexa Fluor and CyDye for practical DNA microarray use. *Mol Biotechnol* 2007, 36: 175-183
- Barco A, Patterson S, Alarcon JM, Gromova P, Mata-Roig M, Morozov A, und Kandel ER. Gene expression profiling of facilitated L-LTP in VP16-CREB mice reveals that BDNF is critical for the maintenance of LTP and its synaptic capture. *Neuron* 2005, 48: 123-137
- Barco A, Bailey CH, und Kandel ER. Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *J Neurochem* 2006, 97: 1520-1533

Barr AM, MacLaurin SA, Semenova S, Fish KN, und Markou A. Altered performance of reelin-receptor ApoER2 deficient mice on spatial tasks using the Barnes maze. *Behav Neurosci* 2007, 121: 1101-1105

Bartosiewicz M, Trounstein M, Barker D, Johnston R, und Buckpitt A. Development of a toxicological gene array and quantitative assessment of this technology. *Arch Biochem Biophys* 2000, 376: 66-73

Beffert U, Weeber EJ, Durudas A, Qiu S, Masiulis I, Sweatt JD, Li WP, Adelman G, Frotscher M, Hammer RE, und Herz J. Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2. *Neuron* 2005, 47: 567-579

Beiko J, Lander R, Hampson E, Boon F, und Cain DP. Contribution of sex differences in the acute stress response to sex differences in water maze performance in the rat. *Behav Brain Res* 2004, 151: 239-253

Bennett MC, Mlady GW, Fleshner M, und Rose GM. Synergy between chronic corticosterone and sodium azide treatments in producing a spatial learning deficit and inhibiting cytochrome oxidase activity. *Proc Natl Sci USA* 1996, 93: 1330-1334

Berninger B und Poo M. Fast actions of neurotrophic factors. *Curr Opin Neurobiol* 1996, 6: 324-330

Bindokas VP, Lee CC, Colmers WF, und Miller RJ. Changes in mitochondrial function resulting from synaptic activity in the rat hippocampal slice. *J Neurosci* 1998, 18: 4570-4587

Block F. Global ischemia and behavioural deficits. *Prog. Neurobiol* 1999, 58: 279-295

Bloodgood BL und Sabatini BL. Neuronal activity regulates diffusion across the neck of dendritic spines. *Science* 2005, 310: 866-869

Bogenhagen D und Clayton DA. The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells. *J Biol Chem* 1974, 249: 7991-7995

-
- Bonhoeffer T. Neurotrophins and activity-dependent development of the neocortex. *Curr Opin Neurobiol* 1996, 6: 119-126
- Bonsignore LT, Chiarotti F, Allewa E, und Cirulli F. Assessing the interplay between fear and learning in mice exposed to a live rat in a spatial memory task (MWM). *Anim Cogn* 2008, 11: 557-562
- Boulanger LM und Poo MM. Presynaptic depolarization facilitates neurotrophin-induced synaptic potentiation. *Nat Neurosci* 1999, 2: 346-351
- Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, und Silva AJ. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 1994, 79: 59-68
- Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FC, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Schulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J, und Vingron M. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 2001, 29: 365-71
- Brooks PJ, Marietta C, und Goldman D. DNA mismatch repair and DNA methylation in adult brain neurons. *J Neurosci* 1996, 16: 939-945
- Brown MW und Aggleton JP. Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat Rev Neurosci* 2001, 2: 51-61
- Brun VH, Otnaess MK, Golden S, Steffenach HA, Witter MP, Moser MB, und Moser EI. Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry. *Science* 2002, 296: 2243-2246
- Bubner B, Gase K, und Baldwin IT. Two-fold differences are the detection limit for determining transgene copy numbers in plants by real-time PCR. *BMC Biotechnol* 2004, 4: 14-24
- Bunsey M und Eichenbaum H. Conservation of hippocampal memory function in rats and humans. *Nature* 1996, 379: 255-257

Burgin KE, Waxham MN, Rickling S, Westgate SA, Mobley WC, und Kelly PT. In situ hybridization histochemistry of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *J Neurosci* 1990, 289: 1788-1798

Büther K, Plaas C, Barnekow A, und Kremerskothen J. KIBRA is a novel substrate for protein kinase C ζ . *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 317: 703-707

Cain DP. LTP, NMDA, genes and learning. *Curr Opin Neurobiol* 1997, 7: 235-242

Casadio A, Martin KC, Giustetto M, Zhu H, Chen M, Bartsch D, Bailey CH, und Kandel ER. A transient, neuron-wide form of CREB-mediated long-term facilitation can be stabilized at specific synapses by local protein synthesis. *Cell* 1999, 99: 221-237

Castellucci VF, Carew TJ, und Kandel ER. Cellular analysis of long-term habituation of the gill-withdrawal reflex of *Aplysia californica*. *Science* 1978, 202: 1306-1308

Cavallaro S, D'Agata V, Manickam P, Dufour F, und Alkon DL. Memory-specific temporal profiles of gene expression in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99: 16279-16284

Cerbone A und Sadile AG. Behavioral habituation to spatial novelty: interference and noninterference studies. *Neurosci Biobehav Rev* 1994, 18: 497-518

Chen G, Chen KS, Knox J, Inglis J, Bernard A, Martin SJ, Justice A, McConlogue L, Games D, Freedman SB, und Morris RG. A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 2000, 408: 975-979

Chen Y, Beffert U, Ertunc M, Tang TS, Kavalali ET, Bezprozvanny I, und Herz J. Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons. *J Neurosci* 2005, 25: 8209-8216

Chen Y, Sharma RP, Costa RH, Costa E, und Grayson DR. On the epigenetic regulation of the human reelin promoter. *Nucleic Acids Res* 2002, 30: 2930-2939

Chrobak JJ, Hinman JR, und Sabolek HR. Revealing past memories: proactive interference and ketamine-induced memory deficits. *J Neurosci* 2008, 28: 4512-4520

-
- Churchill GA. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat genet supplement* 2002, 32: 490.doi:10.1038/ng1031
- Chwang WB, O'Riordan KJ, Levenson JM, und Sweatt JD. ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning. *Learn Mem* 2006, 13: 322-328
- Conejo NM, González-Pardo H, Vallejo G, und Arias JL. Involvement of the mammillary bodies in spatial working memory revealed by cytochrome oxidase activity. *Brain Res* 2004, 1011: 107-114
- Conejo NM, González-Pardo H, Vallejo G, und Arias JL. Changes in brain oxidative metabolism induced by water maze training. *Neuroscience* 2007, 145: 403-412
- Costa E, Chen Y, Davis J, Dong E, Noh JS, Tremolizzo L, Veldic M, Grayson DR, und Guidotti A. REELIN and schizophrenia: a disease at the interface of the genome and the epigenome. *Mol Interv* 2002, 2: 47-57
- Cox WG, Beaudet MP, Agnew JY, und Ruth JL. Possible sources of dye-related signal correlation bias in two-color DNA microarray assays. *Anal Biochem* 2004, 331: 243-254
- D'Agata V und Cavallaro S. Gene expression Profiles – a new dynamic and functional dimension to the exploration of learning and memory. *Rev of Neurosci* 2002, 13: 209-219
- Datta S und Datta S. Evaluation of clustering algorithms for gene expression data. *BMC Bioinformatics* 2006, 7: S17
- Datta S, Li G, und Auerbach S. Activation of phasic pontine-wave generator in the rat: a mechanism for expression of plasticity-related genes and proteins in the dorsal hippocampus and amygdala. *Eur J Neurosci* 2008, 27: 1876-1892
- Dean N und Raftery AE. Normal uniform mixture differential gene expression detection for cDNA microarrays. *BMC Bioinformatics* 2005, 6: 173.

-
- Del Río JA, Heimrich B, Borrell V, Förster E, Drakew A, Alcántara S, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Derer P, Frotscher M, und Soriano E. A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature* 1997, 385: 70-74
- DeRisi JL, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, und Trent JM. Use of a cDNA microarray to analyze gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 1996, 14: 457-460
- DeRisi JL, Iyer VR, und Brown PO. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 1997, 278: 680-686
- D'Hooge R und De Deyn PP. Applications of the Morris-Water-Maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev* 2001, 36: 60-90
- Dixit R, Ross JL, Goldman YE, und Holzbaur EL. Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* 2008, 319: 1086-1089
- Do JH und Choi DK. Normalization of microarray data: single-labeled and dual-labeled arrays. *Mol Cells* 2006, 22: 254-261
- Dragunow M. A role for immediate-early transcription factors in learning and memory. *Behav Genet* 1996, 26: 293-299
- Drapeau E, Montaron MF, Aguerre S, und Abrous DN. Learning-induced survival of new neurons depends on the cognitive status of aged rats. *J Neurosci* 2007, 27: 6037-6044
- Drubin DG und Kirschner MW. Tau protein function in living cells. *J Cell Biol* 1986, 103: 2739-2746
- Dudoit S, Yang YH, Callow M, und Speed TP. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. *Stat Sinica* 2002, 12: 111-139

-
- Eisen MB und Brown PO. DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods Enzymol* 1999, 303: 179-205
- Falkenberg T, Metsis M, Timmusk T, und Lindefors N. Entorhinal cortex regulation of multiple brain-derived neurotrophic factor promoters in the rat hippocampus. *Neuroscience* 1993, 57: 891-896
- Feng J, Fouse S, und Fan G. Epigenetic regulation of neural gene expression and neuronal function. *Pediatr Res* 2007, 61: 58R-63R
- Fernández G und Tendolkar I. The rhinal cortex: 'gatekeeper' of the declarative memory system. *Trends Cogn Sci* 2006 10: 358-362
- Fields RD. Hirnforschung: Die unbekannte Seite des Gehirns. In: *Spektrum der Wissenschaft*, September 2004: 46-56
- Fields RD und Burnstock G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 2006, 7: 423-436
- Frey U und Morris RGM. Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 1997, 385: 533-536
- Galsworthy MJ, Paya-Cano JL, Monleón S, und Plomin R. Evidence for general cognitive ability (g) in heterogeneous stock mice and an analysis of potential confounds. *Genes Brain Behav* 2002, 1: 88-95
- Gamerding M, Manthey D, und Behl C. Oestrogen receptor subtype-specific repression of calpain expression and calpain enzymatic activity in neuronal cells--implications for neuroprotection against Ca-mediated excitotoxicity. *J Neurochem* 2006, 97: 57-68
- Gez J, Gedeon AK, Sutherland GR, und Mulley JC. Identification of the gene FMR2, associated with FRAXE mental retardation. *Nat Genet* 1996, 13: 105-108

Genoux D, Haditsch U, Knobloch M, Michalon A, Storm D, und Mansuy IM. Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature* 2002, 418: 970-975

Gerard CJ, Andrejka LM, und Macina RA. Mitochondrial ATP synthase 6 as an endogenous control in the quantitative RT-PCR analysis of clinical cancer samples. *Mol Diagn* 2000, 5: 39-46

Giménez E und Montoliu L. A simple polymerase chain reaction assay for genotyping the retinal degeneration mutation (Pdeb(rd1)) in FVB/N-derived transgenic mice. *Lab Anim* 2001, 35: 153-156

Givalois L, Arancibia S, und Tapia-Arancibia L. Concomitant changes in CRH mRNA levels in rat hippocampus and hypothalamus following immobilization stress. *Brain Res Mol Brain Res* 2000, 75: 166-171

Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, und Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 1989, 3: 519-526

Gold PE. Modulation of emotional and nonemotional memories: Same pharmacological systems, different neuroanatomical systems. In: McGaugh JL, Weinberger NM, Lynch GS (Hrsg.). *Brain and memory: Modulation and Mediation of Neuroplasticity*. New York, Oxford University Press 1995, Seite 41-47

Gorski JA, Balogh SA, Wehner JM, und Jones KR. Learning deficits in forebrain-restricted brain-derived neurotrophic factor mutant mice. *Neuroscience* 2003, 121: 341-354

Goto K, Numata M, Komura JI, Ono T, Bestor TH, und Kondo H. Expression of DNA methyltransferase gene in mature and immature neurons as well as proliferating cells in mice. *Differentiation* 1994, 56: 39-44.

Gray JA. *The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system*. Oxford, UK: Oxford University Press 1982

Grayson DR, Chen Y, Costa E, Dong E, Guidotti A, Kundakovic M, und Sharma RP. The human reelin gene: transcription factors (+), repressors (-) and the methylation switch (+/-) in schizoprenia. *Pharmacol Ther* 2006, 111: 272-286

Gu Y, Shen Y, Gibbs RA, und Nelson DL. Identification of FMR2, a novel gene associated with the FRAXE CCG repeat and CpG island. *Nat Genet* 1996, 13: 109-113

Guan Z, Giustetto M, Lomvardas S, Kim JH, Miniaci MC, Schwartz JH, Thanos D, und Kandel ER. Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. *Cell* 2002, 111: 483-493

Gunter TE, Gunter KK, Sheu SS, und Gavin CE. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am J Physiol* 1994, 267: C313-339

Gusnanto A, Calza S, und Pawitan Y. Identification of differentially expressed genes and false discovery rate in microarray studies. *Curr Opin Lipidol* 2007, 18: 187-193

Gutala RV und Reddy PH. The use of real-time PCR analysis in a gene expression study of Alzheimer's disease post-mortem brains. *J Neurosci Methods* 2004, 132: 101-107

Gutsaeva DR, Suliman HB, Carraway MS, Demchenko IT, und Piantadosi CA. Oxygen-induced mitochondrial biogenesis in the rat hippocampus. *Neuroscience* 2006, 137: 493-504

Guzman-Marin R, Ying Z, Suntsova N, Methippara M, Bashir T, Szymusiak R, Gomez-Pinilla F, und McGinty D. Suppression of hippocampal plasticity-related gene expression by sleep deprivation in rats. *J Physiol* 2006, 575: 807-819

Hagiwara M, Alberts A, Brindle P, Meinkoth J, Feramisco J, Deng T, Karin M, Shenolikar S, und Montminy M. Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* 1992, 70: 105-113

Hanser H. (Hrsg.). *Lexikon der Neurowissenschaft*, 2001. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg · Berlin

Haruta T, Takami N, Ohmura M, Misumi Y, und Ikehara Y. Ca²⁺-dependent interaction of the growth-associated protein GAP-43 with the synaptic core complex. *Biochem J* 1997, 325: 455-463

Hasselmo ME und Stern CE. Mechanisms underlying working memory for novel information. *Trends Cogn Sci* 2006, 10: 487-493

He Q, Dent EW, und Meiri KF. Modulation of actin filament behavior by GAP-43 (neuromodulin) is dependent on the phosphorylation status of serine 41, the protein kinase C site. *J Neurosci* 1997, 17: 3515-3524

Heemskerk FM, Schrama LH, Gianotti C, Spierenburg H, Versteeg DH, De Graan PN, und Gispen WH. 4-Aminopyridine stimulates B-50 (GAP43) phosphorylation and [³H] noradrenaline release in rat hippocampal slices. *J Neurochem* 1990, 54: 863-869

Hegde P, Qi R, Abernathy K, Gay C, Dharap S, Gaspard R, Hughes JE, Snesrud E, Lee N, und Quackenbush J. A concise guide to cDNA microarray analysis. *Biotechniques* 2000, 29: 548-562

Herrero AI, Sandi C, und Venero C. Individual differences in anxiety trait are related to spatial learning abilities and hippocampal expression of mineralcorticoid receptors. *Neurobiol Learn Mem* 2006, 86: 150-159

Herman JP, Adams D, und Prewitt C. Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology* 1995, 61: 180-190

Hevner RF and Wong-Riley MT. Neuronal expression of nuclear and mitochondrial genes for cytochrome oxidase (CO) subunits analyzed by in situ hybridization: comparison with CO activity and protein. *J Neurosci* 1991, 11: 1942-1958

Hevner RF und Wong-Riley MT. Mitochondrial and nuclear gene expression for cytochrome oxidase subunits are disproportionately regulated by functional activity in neurons. *J Neurosci* 1993, 13: 1805-1819

Hilton HN, Stanford PM, Harris J, Oakes SR, Kaplan W, Daly RJ, und Ormandy CJ. KIBRA interacts with discoidin domain receptor 1 to modulate collagen-induced signalling. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1783: 383-393

Holmes NP, Sanabria D, Calvert GA, und Spence C. Multisensory interactions follow the hands across the midline, evidence from a non-spatial visual-tactile congruency task. *Brain Res* 2006, 1077: 108-115

Hölscher C. Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks. *Behav Brain Res* 1999, 100: 225-235

Hongpaisan J, Winters CA, und Andrews SB. Strong calcium entry activates mitochondrial superoxide generation, upregulating kinase signalling in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2004, 24: 10878-10887

Huang YS, Jung MY, Sarkissian M, und Richter JD. N-Methyl-D-aspartate receptor signalling results in Aurora kinase-catalyzed CPEB phosphorylation and alpha CaMKII mRNA polyadenylation at synapses. *EMBO J* 2002, 21: 2139-2148

Igaz LM, Vianna MRM, Medina JH, und Izquierdo I. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J Neurosci* 2002, 22: 6781-6789

Jacobsen L, Madsen P, Jacobsen C, Nielsen MS, Gliemann J, und Petersen CM. Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11. *J Biol Chem* 2001, 276: 22788-22796

Jin W, Riley RM, Wolfinger R, White KD, Passador-Gurgel G, und Gibson G. The contributions of sex, genotype, and age to transcription variance in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* 2001, 29: 389-395

Johansson S, Fuchs A, Okvist A, Karimi M, Harper C, Garrick T, Sheedy D, Hurd Y, Bakalkin G, und Ekström TJ. Validation of endogenous controls for quantitative gene expression analysis: application on brain cortices of human chronic alcoholics. *Brain Res* 2007, 1132: 20-28

Jung M, Ramankulov A, Roigas J, Johannsen M, Ringsdorf M, Kristiansen G, und Jung K. In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR. *BMC Mol Biol* 2007, 8: 47-60

Kafitz KW, Rose CR, Thoenen H, und Konnerth A. Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature* 1999, 401: 918-921

Kamal A, Stokin GB, Yang Z, Xia CH, und Goldstein LS. Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron* 2000, 28: 449-459

Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, und Malinow R. APP processing and synaptic function. *Neuron* 2003, 37: 925-937

Kamsler A und Segal M. Paradoxical actions of hydrogen peroxide on long-term potentiation in transgenic superoxide dismutase-1 mice. *J Neurosci* 2003, 23: 10359-10367

Kandel ER. Zelluläre Grundlagen von Lernen und Gedächtnis (Kapitel 36). in: Kandel E., Schwartz J.H., Jessell T.M. (Hrsg.). *Neurowissenschaften* 1995. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg-Berlin

Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 2001, 294: 1030-1038

Kang H und Schuman EM. Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science* 1995, 267: 1658-1662

Kann O und Kovács R. Mitochondria and neuronal activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007, 292: C641-C657

Katz LC und Shatz CJ. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 1996, 274: 1133-1138

-
- Knight R. Contribution of human hippocampal region to novelty detection. *Nature* 1996, 383: 256-259
- Knippers R. *Molekulare Genetik*. Thieme Verlag 1997
- Köhler S, Danckert S, Gati JS, und Menon RS. Novelty responses to relational and non-relational information in the hippocampus and the parahippocampal region: a comparison based on event-related fMRI. *Hippocampus* 2005, 15: 763-774
- Kokaia Z, Metsis M, Kokaia M, Bengzon J, Elmér E, Smith ML, Timmusk T, Siesjö BK, Persson H, und Lindvall O. Brain insults in rats induce increased expression of the BDNF gene through differential use of multiple promoters. *Eur J Neurosci* 1994, 6: 587-596
- Kolata S, Light K, Townsend DA, Hale G, Grossman HC, und Matzel LD. Variations in working memory capacity predict individual differences in general learning abilities among genetically diverse mice. *Neurobiol Learn Mem* 2005, 84: 241-246
- Korzus E, Rosenfeld MG, und Mayford M. CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron* 2004, 42, 961-972
- Kremerskothen J, Plaas C, Büther K, Finger I, Veltel S, Matanis T, Liedtke T, und Barnekow A. Characterization of KIBRA, a novel WW domain-containing protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 300: 862-867
- Kulesh DA, Clive DR, Zarlenga DS, und Greene JJ. Identification of interferon-modulated proliferation-related cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84: 8453-8457
- Kumaran D und Maguire EA. Match-mismatch processes underlie human hippocampal responses to associative novelty. *J Neurosci* 2007, 27: 8517-8524
- Kupfernagel I und Kandel E. Lernen und Gedächtnis (Kap. 35). in: Kandel E, Schwartz JH, Jessell TM (Hrsg.). *Neurowissenschaften*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg-Berlin 1995

-
- Kutik S, Guiard B, Meyer HE, Wiedemann N, und Pfanner N. Cooperation of translocase complexes in mitochondrial protein import. *J Cell Biol* 2007, 179: 585-591
- Lalonde R. Cerebellar contributions to instrumental learning. *Neurosci Biobehav Rev* 1994, 18: 161-170
- Lalonde R und Strazielle C. The effects of cerebellar damage on maze learning in animals. *Cerebellum* 2003, 2: 300-309
- Lang C, Barco A, Zablow L, Kandel ER, Siegelbaum SA, und Zakharenko SS. Transient expansion of synaptically connected dendritic spines upon induction of hippocampal long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101: 16665-16670
- Laroche S. Gedächtnismechanismen: Vom flüchtigen Signal zur stabilen Erinnerung. in: *Spektrum der Wissenschaft – Spezial, Gedächtnis*, 1/2002
- Lauterborn JC, Lynch G, Vanderklish P, Arai A, und Gall CM. Positive modulation of AMPA receptors increases neurotrophin expression by hippocampal and cortical neurons. *J Neurosci* 2000, 20: 8-21
- Ledesma MD, Bonay P, Colaço C, und Avila J. Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *J Biol Chem* 1994, 269: 21614-21619
- Leil TA, Ossadtchi A, Cortes JS, Leahy RM, und Smith DJ. Finding new candidate genes for learning and memory. *J Neurosci Res* 2002, 68: 127-137
- Leil TA, Ossadtchi A, Nichols TA, Leahy RM, und Smith DJ. Genes regulated by learning in the hippocampus. *J Neurosci Res* 2003, 71: 763-768
- Levenson JM, O’Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, und Sweatt JD. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem* 2004, 279: 40545-40559
- Levenson JM und Sweatt JD. Epigenetic mechanisms in memory formation, *Nat Rev Neurosci* 2005, 6: 108-118

Levenson JM, Roth TL, Lubin FD, Miller CA, Huang IC, Desai P, Malone LM, und Sweatt JD. Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem* 2006, 281: 15763-15773

Levy M, Faas GC, Saggau P, Craigen WJ, und Sweatt JD. Mitochondrial Regulation of Synaptic Plasticity in the Hippocampus. *J Biol Chem* 2003, 278: 17727-17734

Liang HL, Ongwjitwat S, und Wong-Riley MT. Bigenomic functional regulation of all 13 cytochrome c oxidase subunit transcripts in rat neurons in vitro and in vivo. *Neuroscience* 2006, 140: 177-190

Liao H, Li Y, Brautigam DL, und Gundersen GG. Protein phosphatase 1 is targeted to microtubules by the microtubule-associated protein Tau. *J Biol Chem* 1998, 273: 21901-21908

Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F, und Landgraf R. Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively breed for high or low anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res* 1998, 94: 301-310

Liu QR, Lu L, Zhu XG, Gong JP, Shaham Y, und Uhl GR. Rodent BDNF genes, novel promoters, novel splice variants, and regulation by cocaine. *Brain Res* 2006, 1067: 1-12

Lohof AM, Ip NY, und Poo MM. Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature* 1993, 363: 350-353

Lom B und Cohen-Cory S. Brain-derived neurotrophic factor differentially regulates retinal ganglion cell dendritic and axonal arborization in vivo. *J Neurosci* 1999, 19: 9928-9938.

Lonze BE und Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 2002, 35: 605-623

Lottspeich F und Zorbas H (Hrsg.). *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg-Berlin 1998

-
- Lu B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem* 2003, 10: 86-98
- Lu B und Figurov A. Role of neurotrophins in synapse development and plasticity. *Rev Neurosci* 1997, 8: 1-12
- Lu PJ, Wulf G, Zhou XZ, Davies P, und Lu KP. The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* 1999, 399: 784-788
- Malenka RC und Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 2004, 44: 5-21
- Malinow R und Malenka RC. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 2002, 25: 103-126
- Martin KC, Michael D, Rose JC, Barad M, Casadio A, Zhu H, und Kandel ER. MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in *Aplysia*. *Neuron* 1997a, 18: 899-912
- Martin KC, Casadio A, Zhu H, Rose JC, Chen M, Bailey CH, und Kandel ER. Synapse-specific, long-term facilitation of *aplysia* sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell* 1997b, 91: 927-938
- Martin LA, Goldowitz D, und Mittleman G. The cerebellum and spatial ability: dissection of motor and cognitive components with a mouse model system. *Eur J Neurosci* 2003, 18: 2002-2010
- Martin SJ, Grimwood PD, und Morris RGM. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 2000, 23: 649-711
- Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, Fan G, und Sun YE. DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* 2003, 302: 890-893
- Mattson MP. Mitochondrial regulation of neuronal plasticity. *Neurochem Res* 2007, 32: 707-715

Matzel LD, Han YR, Grossman H, Karnik MS, Patel D, Scott N, Specht SM, und Gandhi CC. Individual differences in the expression of a "general" learning ability in mice. *J Neurosci* 2003, 23: 6423-6433

Mayr B und Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, 2: 599-609

McAllister AK, Katz LC, und Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 1999, 22: 295-318

McEwen BS und Pfaff DW. Factors influencing sex hormone uptake by rat brain regions. *Brain Res* 1970, 21: 1-1

McNaughton N. Cognitive dysfunction resulting from hippocampal hyperactivity--a possible cause of anxiety disorder? *Pharmacol Biochem Behav* 1997, 56: 603-611

Meiri N und Rosenblum K. Lateral ventricle injection of the protein synthesis inhibitor anisomycin impairs long-term memory in a spatial memory task. *Brain Res*, 1998, 789: 48-55

Metsis M, Timmusk T, Arenas E, und Persson H. Differential usage of multiple brain-derived neurotrophic factor promoters in the rat brain following neuronal activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90: 8802-8806

Miller CA und Sweatt JD. Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* 2007, 53: 857-869

Milner B. Memory and the human brain. in: Shaffo M (Hrsg.). *How we know*. Harper and Row-San Fransisco 1985

Mineur YS und Crusio WE. Behavioral and neuroanatomical characterization of FVB/N inbred mice. *Brain Res Bull* 2002, 57: 41-47

Miyamoto E. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *J Pharmacol Sci* 2006, 100: 433-442

Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH, und Tabira T. Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction. *J Neurosci* 2000, 20: 1568-1574

Montoya J, López-Pérez MJ, und Luis-Pesini E. Mitochondrial DNA transcription and diseases: Past, present and future. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1757: 1179-1189

Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, und Arendash GW. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 2000, 408: 982-985.

Morishita W, Connor JH, Xia H, Quinlan EM, Shenolikar S, und Malenka RC. Regulation of synaptic strength by protein phosphatase 1. *Neuron* 2001, 32: 1133-1148

Morley KC, Gallate JE, Hunt GE, Mallet PE, und McGregor IS. Increased anxiety and impaired memory in rats 3 months after administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Eur J Pharmacol* 2001, 433: 91-99

Morris RG, Garrud P, Rawlins JNP, und O'Keefe JO. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982, 297: 681-668

Morris RGM, Halliwell RF, und Bowery N. Synaptic plasticity and learning. II: Do different kinds of plasticity underlie different kinds of learning? *Neuropsychologia* 1989, 27: 41-59

Moser E, Moser MB, und Andersen P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci* 1993, 13: 3916-3925

Moser EI, Krobot KA, Moser MB, und Morris RG. Impaired spatial learning after saturation of long-term potentiation. *Science* 1998, 281: 2038-2042

Mowla SJ, Pareek S, Farhadi HF, Petrecca K, Fawcett JP, Seidah NG, Morris SJ, Sossin WS, und Murphy RA. Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *J Neurosci* 1999, 19: 2069-2080

Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, und Malenka RC. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature* 1994, 369: 486-488

Munton RP, Vizi S, und Mansuy IM. The role of protein phosphatase-1 in the modulation of synaptic and structural plasticity. *FEBS Lett* 2004, 567: 121-128

Nacmias B, Bessi V, Bagnoli S, Tedde A, Cellini E, Piccini C, Sorbi S, und Bracco L. KIBRA gene variants are associated with episodic memory performance in subjective memory complaints. *Neurosci Lett* 2008, 436: 145-147

Need AC, Attix DK, McEvoy JM, Cirulli ET, Linney KN, Wagoner AP, Gumbs CE, Giegling I, Möller HJ, Francks C, Muglia P, Roses A, Gibson G, Weale ME, Rujescu D, und Goldstein DB. Failure to replicate effect of Kibra on human memory in two large cohorts of European origin. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008, 147B: 667-668

Nguyen PV, Abel T, und Kandel ER. Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* 1994, 265: 1104-1107

Niu S, Renfro A, Quattrocchi CC, Sheldon M, und D'Arcangelo G. Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 pathway. *Neuron* 2004, 41: 71-84

Nyberg L. Any novelty in hippocampal formation and memory? *Curr Opin Neurol* 2005, 18: 424-428

Osthoff LE, Fiala JC, Allwandt B, und Harris KM. Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. *J Neurosci* 2002, 19: 7823-7833

Ouyang Y, Rosenstein A, Kreiman G, Schuman EM, und Kennedy MB. Tetanic stimulation leads to increased accumulation of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II via dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J Neurosci* 1999, 19: 7823-7833

Owen EH, Logue SF, Rasmussen DL, und Wehner JM. Assessment of learning by the Morris water task and fear conditioning in inbred mouse strains and F1 hybrids: implications of genetic background for single gene mutations and quantitative trait loci analyses. *Neuroscience* 1997, 80: 1087-1099

Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, und Lu B. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 2004, 306: 487-491

Papassotiropoulos A, Stephan DA, Huentelman MJ, Hoerndli FJ, Craig DW, Pearson JV, Huynh KD, Brunner F, Corneveaux J, Osborne D, Wollmer MA, Aerni A, Coluccia D, Hänggi J, Mondadori CR, Buchmann A, Reiman EM, Caselli RJ, Henke K, und de Quervain DJ. Common Kibra alleles are associated with human memory performance. *Science* 2006, 314: 475-478

Parent AT, Barnes NY, Taniguchi Y, Thinakaran G, und Sisodia SS. Presenilin attenuates receptor-mediated signaling and synaptic function. *J Neurosci* 2005, 25: 1540-1549

Park T, Yi SG, Kang SH, Lee S, Lee YS, und Simon R. Evaluation of normalization methods for microarray data. *BMC Bioinformatics* 2003, 4: 33

Paxinos G und Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego 2007

Perry AJ, Rimmer KA, Mertens HD, Waller RF, Mulhern TD, Lithgow T, und Gooley PR. Structure, topology and function of the translocase of the outer membrane of mitochondria. *Plant Physiol Biochem* 2008, 46: 265-274

Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG, Saris JJ, Hennekam RC, Masuno M, Tommerup N, van Ommen GJ, Goodman RH, Peters DJ, et al. Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature* 1995, 376: 348-351

Petrosini L, Molinari M, und Dell'Anna ME. Cerebellar contribution to spatial event processing: Morris water maze and T-maze. *Eur J Neurosci* 1996, 8: 1882-1896

Petrosini L. "Do what I do" and "do how I do": different components of imitative learning are mediated by different neural structures. *Neuroscientist* 2007, 13: 335-348

Pham XH, Farge G, Shi Y, Gaspari M, Gustafsson CM, und Falkenberg M. Conserved sequence box II directs transcription termination and primer formation in mitochondria. *J Biol Chem* 2006, 281: 24647-24652

Petrosini L, Molinari M, und Dell'Anna ME. Cerebellar contribution to spatial event processing: Morris water maze and T-maze. *Eur J Neurosci* 1996, 8: 1882-1896

Pollak DD, Scharl T, Leisch F, Herkner K, Villar SR, Hoeger H, und Lubec G. Strain-dependent regulation of plasticity-related proteins in the mouse hippocampus. *Behav Brain Res* 2005, 165: 240-246

Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Hiemke C, Blessing M, Flamez P, Dequenne A, Godaux E, van Leuven F, und Fahrenholz F. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 2004, 113: 1456-1464

Poucet B, Save E, und Lenck-Santini PP. Sensory and memory properties of hippocampal place cells. *Rev Neurosci* 2000, 11: 95-111

Powell CM. Gene targeting of presynaptic proteins in synaptic plasticity and memory: across the great divide. *Neurobiol Learn Mem* 2006, 85: 2-15

Price SA, Held B, und Pearson HA. Amyloid beta protein increases Ca²⁺ currents in rat cerebellar granule neurones. *Neuroreport* 1998, 9: 539-545

Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, und Herms J. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 2006, 26: 7212-7221

Purcell AL, Sharma SK, Bagnall MW, Sutton MA, und Carew TJ. Activation of a tyrosine kinase-MAPK cascade enhances the induction of long-term synaptic facilitation and long-term memory in *Aplysia*. *Neuron* 2003 37: 473-484

Qiu S, Korwek KM, Pratt-Davis AR, Peters M, Bergman MY, und Weeber EJ. Cognitive disruption and altered hippocampus synaptic function in Reelin haploinsufficient mice. *Neurobiol Learn Mem* 2006, 85: 228-242

Ramanan N, Shen Y, Sarsfield S, Lemberger T, Schutz G, Linden DJ, und Ginty DD. SRF mediated activity-induced gene expression and synaptic plasticity but not neuronal viability. *Nat Neurosci* 2005, 8: 759-767

Ramdas L, Coombes KR, Baggerly K, Abruzzo L, Highsmith WE, Krogmann T, Hamilton SR, und Zhang W. Sources of nonlinearity in cDNA microarray expression measurements. *Genome Biol* 2001, 2: 0047.1-0047.7

Ramos A, Correia EC, Izidio GS, und Bruske GR. Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviours. *Behav Genet* 2003, 33: 657-668

Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyin M, und Tsien JZ. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* 2000, 3: 238-244

Ramsden M, Plant LD, Webster NJ, Vaughan PF, Henderson Z, und Pearson HA. Differential effects of unaggregated and aggregated amyloid beta protein (1-40) on K(+) channel currents in primary cultures of rat cerebellar granule and cortical neurones. *J Neurochem* 2001, 79: 699-712

Ramsden M, Henderson Z, und Pearson HA. Modulation of Ca²⁺ channel currents in primary cultures of rat cortical neurones by amyloid beta protein (1-40) is dependent on solubility status. *Brain Res* 2002, 956: 254-261

Ramsden M, Kotilinek L, Forster C, Paulson J, McGowan E, SantaCruz K, Guimaraes A, Yue M, Lewis J, Carlson G, Hutton M, und Ashe KH. Age-dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, and memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L). *J Neurosci* 2005, 25: 10637-10647

Rao Y, Lee Y, Jarjoura D, Ruppert AS, Liu CG, Hsu JC, und Hagan JP. A comparison of normalization techniques for microRNA microarray data. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2008, 7: Article22 [Epub Jul 21]

Ranganath C und Rainer G. Neural mechanisms for detecting and remembering novel events. *Nat Rev Neurosci* 2003, 4: 193-202

Rayala SK, den Hollander P, Manavathi B, Talukder AH, Song C, Peng S, Barnekow A, Kremerskothen J, und Kumar R. Essential role of KIBRA in co-activator function of dynein light chain 1 in mammalian cells. *J Biol Chem* 2006, 281: 19092-19099

Redish AD und Touretzky DS. The role of the hippocampus in solving the Morris water maze. *Neural Comput.* 1998, 10: 73-111

Rekart JL, Meiri K, und Routtenberg A. Hippocampal-dependent memory is impaired in heterozygous GAP-43 knockout mice. *Hippocampus* 2005, 15: 1-7

Renthal W, Maze I, Krishnan V, Covington HE 3rd, Xiao G, Kumar A, Russo SJ, Graham A, Tsankova N, Kippin TE, Kerstetter KA, Neve RL, Haggarty SJ, McKinsey TA, Bassel-Duby R, Olson EN, und Nestler EJ. Histone deacetylase 5 epigenetically controls behavioral adaptations to chronic emotional stimuli. *Neuron* 2007, 56: 517-529.

Rizo J und Südhof TC. C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem* 1998, 273: 15879-15882

Rodríguez-Rodríguez E, Infante J, Llorca J, Mateo I, Sánchez-Quintana C, García-Gorostiaga I, Sánchez-Juan P, Berciano J, und Combarros O. Age-dependent association of KIBRA genetic variation and Alzheimer's disease risk. *Neurobiol Aging* 2007, Aug 16 [Epub ahead of print]

Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, Zou F, Katayama T, Baldwin CT, Cheng R, Hasegawa H, Chen F, Shibata N, Lunetta KL, Pardossi-Piquard R, Bohm C, Wakutani Y, Cupples LA, Cuenco KT, Green RC, Pinessi L, Rainero I, Sorbi S, Bruni A, Duara R, Friedland RP, Inzelberg R, Hampe W, Bujo H, Song YQ, Andersen OM, Willnow TE, Graff-Radford N, Petersen RC, Dickson D, Der SD, Fraser PE, Schmitt-Ulms G, Younkin S, Mayeux R, Farrer LA, und St George-Hyslop P. The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 2007, 39: 168-177

Roosendaal B. Systems mediating acute glucocorticoid effects in memory consolidation and retrieval. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003, 27: 1213-1223

Ros J, Pellerin L, Magara F, Dauguet J, Schenk F, und Magistretti PJ. Metabolic activation pattern of distinct hippocampal subregions during spatial learning and memory retrieval. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006, 26: 468-477

Routtenberg A, Cantalops I, Zaffuto S, Serrano P, und Namgung U. Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97: 7657-7662

Royle SJ, Collins FC, Rupniak HAT, Barnes JC, und Anderson R. Behavioral analysis and susceptibility to CNS injury of four inbred strains of mice. *Brain Res* 1999, 816: 337-349

Rutherford LC, Nelson SB, und Turrigiano GG. BDNF has opposite effects on the quantal amplitude of pyramidal neuron and interneuron excitatory synapses. *Neuron* 1998, 21: 521-530

Sager KL, Wu J, Leurgans SE, Rees HD, Gearing M, Mufson EJ, Levey AI, und Lah JJ. Neuronal LR11/sorLA expression is reduced in mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 2007, 62:640-647

Sakimura K, Kutsuwada T, Ito I, Manabe T, Takayama C, Kushiya E, Yagi T, Aizawa S, Inoue Y, Sugiyama H, und Mishina M. Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor ϵ 1 subunit. *Nature* 1995, 373: 151-155

Samaco RC, Hogart A, und LaSalle JM. Epigenetic overlap in autism-spectrum neurodevelopmental disorders: MECP2 deficiency causes reduced expression of UBE3A and GABRB3. *Hum Mol Genet* 2005, 14: 483-492

Schägger H. Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* 2001, 52:119-128

Schaper K, Kolsch H, Popp J, Wagner M, und Jessen F. KIBRA gene variants are associated with episodic memory in healthy elderly. *Neurobiol Aging* 2008, 29: 1123-1125

Schena M, Shalon D, Davis RW, und Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995, 270: 467-470

Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, und Davis RW. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 10614-10619

Scherzer CR, Offe K, Gearing M, Rees HD, Fang G, Heilman CJ, Schaller C, Bujo H, Levey AI, und Lah JJ. Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2004, 61: 1200-1205

Schmidt-Hieber C, Jonas P, und Bischofberger J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 2004, 429: 184-187

Schmitt U, Hiemke C, Fahrenholz F, und Schroeder A. Over-expression of two different forms of the alpha-secretase ADAM10 affects learning and memory in mice. *Behav Brain Res* 2006, 175: 278-284

Schulz D, Huston JP, Jezek K, Haas HL, Roth-Härer A, Selbach O, und Luhmann HJ. Water maze performance, exploratory activity, inhibitory avoidance and hippocampal plasticity in aged superior and inferior learners. *Eur J Neurosci* 2002, 16: 2175-2185

Schultz PG, Jiang CH, Tsien JZ, und Hu Y. The effects of aging on gene expression in the hypothalamus and cortex of mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98: 1930-1934

-
- Seil FJ und Drake-Baumann R. TrkB receptor ligands promote activity-dependent inhibitory synaptogenesis. *J Neurosci* 2000, 20: 5367-5373
- Shalon D, Smith SJ, und Brown PO. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* 1996, 6: 639-645
- Shimada A, Mason CA, und Morrison ME. TrkB signaling modulates spine density and morphology independent of dendrite structure in cultured neonatal Purkinje cells. *J Neurosci* 1998, 18: 8559-8570
- Si K, Giustetto M, Etkin A, Hsu R, Janisiewicz AM, Miniaci MC, Kim JH, Zhu H, und Kandel ER. A neuronal isoform of CPEB regulates local protein synthesis and stabilizes synapse-specific long-term facilitation in aplysia. *Cell* 2003, 115: 893-904
- Sillaber I, Rammes G, Zimmermann S, Mahal B, Zieglgänsberger W, Wurst W, Holsboer F, und Spanagel R. Enhanced and delayed stress-induced alcohol drinking in mice lacking functional CRH1 receptors. *Science* 2002, 296: 931-933
- Silva AJ, Paylor R, Wehner JM, und Tonegawa S. Impaired spatial learning in alpha-calmodulin-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 1992, 257: 206-211
- Simpson PB. The local control of cytosolic Ca²⁺ as a propagator of CNS communication – integration of mitochondrial transport mechanisms and cellular responses. *J Bioenerg Biomembr* 2000, 32: 5-13
- Smith C und Rose GM. Posttraining paradoxical sleep in rats is increased after spatial learning in the Morris water maze. *Behav Neurosci* 1997, 111: 1197-1204
- Sokolov EN. Higher nervous functions; the orienting reflex. *Annu Rev Physiol* 1963, 25: 545-580
- Sossin WS. Isoform specificity of protein kinase Cs in synaptic plasticity. *Learn Mem* 2007, 14: 236-246

Steward O und Schuman EM. Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci* 2001, 24: 299-325

Steward O und Schuman EM. Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. *Neuron* 2003, 40: 347-359

Sun L, Liu SY, Zhou XW, Wang XC, Liu R, Wang Q, und Wang JZ. Inhibition of protein phosphatase 2A- and protein phosphatase 1-induced tau hyperphosphorylation and impairment of spatial memory retention in rats. *Neuroscience* 2003, 118: 1175-1182

Suzuki WA. The long and the short of it: memory signals in the medial temporal lobe. *Neuron* 1999, 24: 295-298

Suzuki YJ, Forman HJ, und Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* 1997, 22: 269-285

Taniguchi M, Miura K, Iwao H, und Yamanaka S. Quantitative assessment of cDNA microarrays: comparison with Northern blot analyses. *Genomics* 2001, 71: 34-39

Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, und Hempstead BL. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* 2005, 25: 5455-5463

Thiels E, Norman ED, Barrionuevo G, und Klann E. Transient and persistent increases in protein phosphatase activity during long-term depression in the adult hippocampus in vivo. *Neuroscience* 1998, 86: 1023-1029

Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 1995, 270: 593-598

Timmusk T, Palm K, Metsis M, Reintam T, Paalme V, Saarma M, und Persson H. Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* 1993, 10: 475-489

Timmusk T, Persson H, und Metsis M. Analysis of transcriptional initiation and translatability of brain-derived neurotrophic factor mRNAs in the rat brain. *Neurosci Lett* 1994, 177: 27-31

Tischmeyer W und Grimm R. Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell Mol Life Sci* 1999, 55: 564-574

Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, und Nestler EJ. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci* 2006, 9: 519-525

Tseng GC, Oh MK, Rohlin L, Liao JC, und Wong WH. Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations, and assessment of gene effects. *Nucleic Acids Res* 2001, 29: 2549-2557

Tulving E, Markowitsch HJ, Craik FE, Habib R, und Houle S. Novelty and familiarity activations in PET studies of memory encoding and retrieval. *Cereb Cortex* 1996, 6: 71-79

Turner G, Webb T, Wake S, und Robinson H. Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1996, 64: 196-197

Ubach J, Zhang X, Shao X, Südhof TC, und Rizo J. Ca²⁺ binding to synaptotagmin: how many Ca²⁺ ions bind to the tip of a C2-domain? *EMBO J* 1998, 17: 3921-3930

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, und Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002, 3: research0034.1-0034.11

Vaynman S, Ying Z, und Gomez-Pinilla F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci* 2004, 20: 2580-2590

Veldic M, Caruncho HJ, Liu WS, Davis J, Satta R, Grayson DR, Guidotti A, und Costa E. DNA-methyltransferase 1 mRNA is selectively overexpressed in telencephalic GABAergic interneurons of schizophrenia brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101: 348-353

Veldic M, Kadriu B, Maloku E, Agis-Balboa RC, Guidotti A, Davis JM, und Costa E. Epigenetic mechanisms expressed in basal ganglia GABAergic neurons differentiate schizophrenia from bipolar disorder. *Schizophr Res* 2007, 91: 51-61

Vellucci SV und Parrott RF. Hippocampal gene expression in the pig: upregulation of corticotrophin releasing hormone mRNA following central administration of the peptide. *Neuropeptides* 2000, 34: 221-228

Venero C, Tilling T, Hermans-Borgmeyer I, Herrero AI, Schachner M, und Sandi C. Water maze learning and forebrain mRNA expression of the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurosci Res* 2004, 75: 172-181

Vicario-Abejón C, Collin C, McKay RD, und Segal M. Neurotrophins induce formation of functional excitatory and inhibitory synapses between cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 1998, 18: 7256-7271

Voikar V, Koks S, Vasar E, und Rauvala H. Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiol Behav* 2001, 72: 271-281

Wang H, Hu Y, und Tsien JZ. Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Prog Neurobiol* 2006, 79: 123-135.

Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, und Meaney MJ. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 2004, 7: 847-854

Weaver IC, Champagne FA, Brown SE, Dymov S, Sharma S, Meaney MJ, und Szyf M. Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life. *J Neurosci* 2005, 25: 11045-11054.

Weaver IC, Meaney MJ, und Szyf M. Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103: 3480-3485

Weeber EJ, Beffert U, Jones C, Christian JM, Forster E, Sweatt JD, und Herz J. Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J Biol Chem* 2002, 277: 39944-39952

West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, Takasu MA, Tao X, und Greenberg ME. Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98: 11024-11031

Westphal RS, Tavalin SJ, Lin JW, Alto NM, Fraser ID, Langeberg LK, Sheng M, und Scott JD. Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex. *Science* 1999, 285: 93-96

Williams JM, Thompson VL, Mason-Parker SE, Abraham WC, und Tate WP. Synaptic activity-dependent modulation of mitochondrial gene expression in the rat hippocampus. *Mol Brain Res* 1998, 60: 50-56

Wilson MA und McNaughton BL. Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science* 1994, 265: 676-679

Wilson MA und Tonegawa S. Synaptic plasticity, place cells and spatial memory: study with second generation knockouts. *Trends Neurosci* 1997, 20: 102-106

Winograd M und Viola H. Detection of novelty, but not memory of spatial habituation, is associated with an increase in phosphorylated cAMP response element-binding protein levels in the hippocampus. *Hippocampus* 2004, 14: 117-123

Wisden W, Errington ML, Williams S, Dunnett SB, Waters C, Hitchcock D, Evan G, Bliss TV, und Hunt SP. Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord. *Neuron* 1990, 4: 603-614

Wittenberg GM, Sullivan MR, und Tsien JZ. Synaptic reentry reinforced network model for long-term memory consolidation. *Hippocampus* 2002, 12: 637-647

Wittstock S und Menzel R. Color learning and memory in honey bees are not affected by protein synthesis inhibition. *Behav Neural Biol* 1994, 62: 224-229

- Wong-Riley MT. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci* 1989, 12: 94-101
- Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL, und Lu B. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci* 2005, 8: 1069-1077
- Wood MA, Kaplan MP, Park A, Blanchard EJ, Oliveira AM, Lombardi TL, und Abel T. Transgenic mice expressing a truncated form of CREB-binding protein (CBP) exhibit deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory storage. *Learn Mem* 2005, 12: 111-119
- Workman C, Jensen LJ, Jarmer H, Berka R, Gautier L, Nielser HB, Saxild HH, Nielsen C, Brunak S, und Knudsen S. A new non-linear normalization method for reducing variability in DNA microarray experiments. *Genome Biol* 2002 , 3: research0048.
- Yacoubian TA und Lo DC. Truncated and full-length TrkB receptors regulate distinct modes of dendritic growth. *Nat Neurosci* 2000, 3: 342-349
- Yamaguchi S, Hale LA, D'Esposito M, und Knight RT. Rapid prefrontal-hippocampal habituation to novel events. *J Neurosci* 2004, 24: 5356-5363
- Yan Z, Hsieh-Wilson L, Feng J, Tomizawa K, Allen PB, Fienberg AA, Nairn AC, und Greengard P. Protein phosphatase 1 modulation of neostriatal AMPA channels: regulation by DARPP-32 and spinophilin. *Nat Neurosci* 1999, 2: 13-17
- Yang IV, Chen JP, Hasseman JP, Liang W, Frank BC, Shuibang W, Sharov V, Saeed AI, White J, Li J, Lee NH, Yeatman TJ, und Quackenbush J. Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome Biol* 2002, 3: 0062.1-0062.12
- Yang SJ, Liang HL, und Wong-Riley MT. Activity-dependent transcriptional regulation of nuclear respiratory factor-1 in cultured rat visual cortical neurons. *Neuroscience* 2006, 141: 1181-1192

Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, und Speed TP. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* 2002, 30:e15

Yin JC, Wallach JS, Del Vecchio M, Wilder EL, Zhou H, Quinn WG, und Tully T. Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell* 1994. 79: 49-58

Yoshioka K, Miki T, Katsuya T, Ogihara T, und Sakaki Y. The 717Val-Ile substitution in amyloid precursor protein is associated with familial Alzheimer's disease regardless of ethnic groups. *Biochem Biophys Res Commun* 1991, 178: 1141-1146

Young TL und Selkoe DJ. Molecular rescue studies on role of APP family members in neuronal development. *Soc Neurosci Abstr* 2005, 31: 712.2

Yu J, Othman MI, Farjo R, Zareparsis S, MacNee SP, Yoshida S, und Swaroop A. Evaluation and optimization of procedures for target labelling and hybridization of cDNA microarrays. *Mol Vis* 2002, 8: 130-137

Zagreda L, Goodman J, Druin DP, McDonald D, und Diamond A. Cognitive deficits in a genetic mouse model of the most common biochemical cause of human mental retardation. *J Neurosci* 1999, 19: 6175-6182

Zhao W, Meiri N, Xu H, Cavallaro S, Quattrone A, Zhang L, und Alkon DL. Spatial learning induced changes in expression of the ryanodine type II receptor in the rat hippocampus. *FASEB J* 2000, 14: 290-300

Zuo Y, Lin A, Chang P, und Gan WB. Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron* 2005, 46: 181-189

7. Nachwort und Dank

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sammy Haege
Anschrift: Liebigstr. 12
39104 Magdeburg
Email: sammyhaege7@aol.com
geboren am: 15.05.1972 in Ludwigshafen/Rhein
Familienstand: ledig



Hochschulstudium / Berufsausbildung

01.12.2004 - 10.10.2008 Promotion in Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz (Psychiatrische Klinik und Institut für Humangenetik; Ziel: Dr. rer. nat.)
01.04.1997 - 09.09.2004 Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz (Abschluss: **Diplom**)
01.08.1997 - 31.01.1999 Ausbildung zum Realschullehrer (Referendarzeit) am Staatlichen Studienseminar in Kaiserslautern sowie an der Schiller-Realschule in Frankenthal (Abschluss: **Zweites Staatsexamen**)
01.04.1992 - 30.09.1996 Studium für das Lehramt an Realschulen (Erdkunde, Wirtschaftskunde) an der Universität Koblenz-Landau (Abschluss: **Erstes Staatsexamen**)
30.09.1991 - 31.03.1992 Studium für das Lehramt an Gymnasien (Erdkunde, Mathematik) an der Universität in Karlsruhe (TH)

Stipendien / Drittmittel

01.01.2006 - 30.06.2008 Stipendiat der FAZIT-Stiftung Gemeinnützige Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt am Main
01.01.2005 - 31.12.2005 Forschungsförderung aus dem MAIFOR-Programm des Fachbereichs Medizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
01.11.2003 - 30.04.2004 Förderungsstipendium für Diplomarbeiten an der Johannes Gutenberg Universität-Mainz

Berufstätigkeit

- 14.08.2000 - 31.10.2003 selbständige Tätigkeit als Lehrer am Lehrinstitut für Orthographie und Schreibtechnik (LOS) in Speyer
- 01.09.1999 - 31.12.1999 Stütz- und Förderlehrer (Deutsch, EDV) beim CJD Neustadt bzw. BBL Neustadt
- 10.09.1998- 01.07.1999 selbständige Tätigkeit als Nachhilfelehrer (Mathematik) beim Studienkreis Nachhilfe in Ludwigshafen-Mundenheim

Praktika

- 15.08.1994 – 09.09.1994 vierwöchiges studienbegleitendes Schulpraktikum an der Staatl. Realschule Eisenberg
- 13.09.1993 – 24.09.1993 zweiwöchiges studienbegleitendes Schulpraktikum an der Staatl. Realschule Eisenberg

Schulbildung

- 1990 - 01.06.1991 Trifelsgymnasium Annweiler (13. Klasse + **Abitur**)
- 1988 - 1990 Gymnasium Weiherhof (11. / 12. Klasse)
- 1982 - 1988 Staatl. Leininger Gymnasium Grünstadt (5. - 10. Klasse)
- 1978 - 1982 Pestalozzi-Grundschule in Hettenleidelheim (1. - 4. Klasse)

Fremdsprachen

- Niederländisch (zweite Muttersprache)
- Englisch (fließend)
- Französisch (Grundkenntnisse)

10. Veröffentlichungen

