

Deutsches Institut für Ernährungsforschung
Abteilung Molekulare Genetik

**Über die *Arc*-catFISH-Methode als neues Werkzeug
zur Charakterisierung der Geschmacksverarbeitung
im Hirnstamm der Maus**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin „Molekularbiologie“

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
JONAS CLAUDIUS TÖLE

Potsdam, den 26. September 2013

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung 3.0 Deutschland
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/de/>

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2014/7049/>
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-70491>
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-70491>

Der größte Narr kann mehr fragen, als der
Weiseste beantworten kann.

Georg Christoph Lichtenberg

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Funktionelle und anatomische Grundlagen des Geschmackssinns	1
1.1.1 Detektion von Geschmacksstoffen in der Peripherie	2
1.1.2 Weiterleitung und zentrale Verarbeitung der Geschmacksinformation	4
1.1.3 Anatomischer und funktioneller Aufbau des <i>Nucleus tractus solitarii</i>	5
1.1.4 Neuronentypen im <i>Nucleus tractus solitarii</i>	6
1.2 Verarbeitung der Geschmacksinformation	7
1.2.1 Diskriminierung von Bitterstoffen	9
1.3 <i>Immediate-early</i> -Gene als Werkzeuge in der Neurowissenschaft	11
1.3.1 Das <i>Immediate-early</i> -Gen <i>Arc</i>	12
1.3.2 Die <i>Arc</i> -catFISH-Methode	13
1.4 Zielstellung	14
2 Material	17
2.1 Geräte	17
2.2 Software	17
2.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	18
2.4 Enzyme	19
2.5 Antikörper	20
2.6 Oligonukleotide	20
2.7 Geschmacksstimuli	20
2.8 Lösungen und Puffer	20
2.8.1 Lösungen für die Agarosegelelektrophorese	21
2.8.2 Lösungen für die Vorbehandlung	21
2.8.3 Lösungen für die <i>In-situ</i> -Hybridisierung	21
2.9 Versuchstiere	22
3 Methoden	23
3.1 Generierung der RNA-Sonde	23
3.1.1 RNA-Extraktion	23
3.1.2 cDNA-Synthese	24
3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion	24
3.1.4 <i>In-vitro</i> -Transkription	26
3.2 Stimulation und Gewebeentnahme	27
3.3 Anfertigung von Gewebeschnitten	28
3.4 <i>In-situ</i> -Hybridisierung	29
3.4.1 Vorbehandlung der Gewebeschnitte	29

3.4.2	Durchführung der <i>In-situ</i> -Hybridisierung	29
3.5	Auswertung	31
3.5.1	Auswertung mithilfe des Konfokalmikroskops	31
3.5.2	Digitalisierung der Gewebeschnitte	32
3.5.3	Auszählung der <i>Arc</i> exprimierenden Zellen	32
3.5.4	Statistische Auswertung	33
4	Ergebnisse	35
4.1	Etablierung des <i>In-situ</i> -Hybridisierungs-Protokolls	35
4.1.1	Anpassung des Protokolls für Fluoreszenzdetektion	35
4.1.2	Optimierung der Fixierschritte und der Proteinase-K-Konzentration	36
4.1.3	Optimierung des TSA-Schritts	40
4.1.4	Dithiothreitolzugabe zum Hybridisierungspuffer	41
4.1.5	Optimierung der Konzentration der RNA-Sonde	43
4.1.6	Zusammenfassung der Protokolloptimierung	43
4.2	<i>Arc</i> -Expression nach einmaliger Stimulation	44
4.2.1	Verteilung der <i>Arc</i> exprimierenden Zellen im NTS	45
4.3	<i>Arc</i> -Expression nach zweimaliger Stimulation mit Saccharose und Citronensäure	52
4.4	<i>Arc</i> -Expression nach zweimaliger Stimulation mit Bitterstoffen	54
4.4.1	Verteilung der <i>Arc</i> exprimierenden Zellen im NTS	55
4.4.2	Vergleich der Stärke des ersten und zweiten Stimulus	58
5	Diskussion	63
5.1	Stimulation und Geschmacksstimuli	63
5.1.1	Wahl der Geschmacksstimuli	63
5.1.2	Stimulation	64
5.2	Evaluierung der Sechsfelder Methode zur NTS-Unterteilung	66
5.3	Die <i>Arc</i> -catFISH-Methode zur Untersuchung der Geschmacksverarbeitung	69
5.3.1	Identität der <i>Arc</i> exprimierenden Zellen	69
5.3.2	Warum führen nur Bittersubstanzen zu erhöhter <i>Arc</i> -Expression?	69
5.3.3	Aktivierung von Bitterzellen durch hochkonzentrierte Salzstimuli	71
5.3.4	Warum reagiert nur ein Teil der Zellen auf beide Stimuli?	72
5.3.5	Funktion der <i>Arc</i> exprimierenden Neurone im nichtgustatorischen NTS	73
5.3.6	Funktion der <i>Arc</i> exprimierenden Neurone im gustatorischen NTS	74
5.3.7	Vergleich der Anzahl <i>Arc</i> und <i>Fos</i> exprimierender Zellen im NTS	74
5.3.8	Vergleich der Anzahl <i>Arc</i> exprimierender Zellen im NTS und der Anzahl bitter- verarbeitender Zellen in der Peripherie	75
5.3.9	Die <i>Arc</i> -catFISH-Methode zur Untersuchung weiterer Stationen der Geschmacks- verarbeitung	76
5.4	Implikationen der Ergebnisse für die Bitterverarbeitung	77
	Zusammenfassung	80
	Abstract	81
	Literatur	83
A	Anhang	95
A.1	Programm der Fixierung und Acetylierung mittels Färbeautomat	95
A.2	Anordnung auf der Arbeitsfläche des Pipettierautomaten	95
A.3	Programm der automatischen <i>In-situ</i> -Hybridisierung	96

A.4 Rohdaten	97
Danksagung	99
Selbständigkeitserklärung	100

Abbildungsverzeichnis

1.1	Transport der Geschmacksinformation in der Maus	3
1.2	Schematische Darstellung des <i>Nucleus tractus solitarii</i> der Ratte	5
1.3	Zeitliches Muster der <i>Arc</i> -RNA-Verteilung	12
1.4	Die <i>Arc</i> -catFISH-Methode	13
3.1	DNA-Fragment als Matrize für die <i>In-vitro</i> -Transkription	23
3.2	Kontrolle der extrahierten RNA aus Mausgehirn	24
3.3	PCR zur Optimierung der <i>Annealing</i> -Temperatur	25
3.4	Kontrolle und Konzentrationsabschätzung des aufgereinigten PCR-Produkts	26
3.5	Qualitätskontrolle und Konzentrationsabschätzung der RNA-Sonde	27
3.6	UV-spektrometrische Untersuchung der RNA-Sonde	27
3.7	Stimulationsprotokoll	28
3.8	Reihenfolge der Bestückung der Objektträger	28
3.9	Die Komponenten einer Durchflusskammer	30
3.10	Zusammengesetzte Durchflusskammer	30
3.11	Unterteilung des <i>Nucleus tractus solitarii</i>	33
3.12	Quantifizierung der <i>Arc</i> -Expression	34
4.1	Ausgangspunkt der Optimierung der Fixierzeit und des Proteinase-K-Verdau.	36
4.2	Erste Runde der Optimierung von Fixierzeit und Proteinase-K-Verdau	37
4.3	Zweite Runde der Optimierung von Fixierzeit und Proteinase-K-Verdau, Fixierzeit: 25 min	38
4.4	Zweite Runde der Optimierung von Fixierzeit und Proteinase-K-Verdau, Fixierzeit: 10 min	39
4.5	Optimierung der Tyramid-Biotin-Konzentration	40
4.6	Auswirkung von DTT-Zugabe zum Hybridisierungspuffer	41
4.7	Optimierung der Konzentration der RNA-Sonde	42
4.8	Ergebnis der Protokolloptimierung	44
4.9	<i>Arc</i> -Expression im NTS nach einmaliger Stimulation, Beispiele für FISH-Ergebnisse und Auswertung	47
4.10	<i>Arc</i> -Expression im NTS nach einmaliger Stimulation	48
4.11	Verteilung der <i>Arc</i> exprimierenden Zellen im NTS nach einmaliger Stimulation mit Cycloheximid	49
4.12	Verteilung der <i>Arc</i> exprimierenden Zellen in den Unterteilungen des NTS nach einmaliger Stimulation	50
4.13	Prozentuale Verteilung der Signale auf die NTS-Unterteilungen	52
4.14	<i>Arc</i> -Expression im NTS nach zweimaliger Stimulation mit Saccharose und Citronensäure, Rohdaten	53
4.15	<i>Arc</i> -Expression nach zweimaliger Stimulation mit Saccharose und Citronensäure	53
4.16	<i>Arc</i> -Expression nach zweimaliger Stimulation mit Bitterstoffen, gesamt	54
4.17	<i>Arc</i> -Expression nach zweimaliger Stimulation mit Bitterstoffen, intrazelluläre Verteilung	55
4.18	Verteilung der zweimal aktivierten Zellen auf die Subregionen des NTS	56
4.19	Vergleich der klassischen und neuen Unterteilung des NTS nach zweimaliger Stimulation mit Bitterstoffen	57
4.20	Prozentuale Verteilung der Signale auf die NTS-Unterteilungen	58

4.21	Populationen bitterverarbeitender Zellen im gustatorischen NTS.	59
4.22	Vergleich der Stärke des ersten und zweiten Stimulus	60
4.23	Vergleich der <i>Arc</i> -Expression nach Applikation von einem bzw. dem Gemisch aus zwei Bitterstoffen	61
5.1	Schematische Darstellung eines coronalen Schnitts durch den rostralen <i>Nucleus tractus solitarius</i> der Ratte.	66
5.2	Vergleich der rostral/caudal-Unterteilung des NTS zwischen Ratte und Maus	67
5.3	Alternative Darstellung der Daten aus Abbildung 4.18	68
5.4	Vergleich der Verteilung <i>Arc</i> exprimierender Zellen nach ein- oder zweimaliger Stimulation	74
A.1	Anordnung auf der Arbeitsfläche des Pipettierautomaten	95

Tabellenverzeichnis

2.1	Geräte	17
2.2	Software	17
2.3	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	18
2.4	Enzyme	19
2.5	Antikörper	20
2.6	Oligonukleotide, die für die Generierung der RNA-Sonden genutzt wurden.	20
2.7	Geschmacksstimuli	20
4.1	Zusammenfassung der Optimierung des Detektionsprotokolls	43
4.2	Anzahl der <i>Arc</i> exprimierenden Zellen pro Tier	51
A.1	Ablauf der Fixierung und Acetylierung	95
A.2	Ablauf der <i>In-situ</i> -Hybridisierung	96
A.3	Rohdaten der einmal stimulierten Tiere	97
A.4	Rohdaten der zweimal stimulierten Tiere	97

Abkürzungsverzeichnis

VII	<i>Nervus facialis</i> , siebter Hirnnerv	Egr	<i>early growth response protein</i> (engl.)
IX	<i>Nervus glossopharyngeus</i> , neunter Hirnnerv	ENaC	Epithelialer Natriumkanal
X	<i>Nervus vagus</i> , zehnter Hirnnerv	engl.	englisch
ABA	Allen Brain Atlas (engl.)	EPSC	exzitatorischer postsynaptischer Strom (von engl. <i>excitatory postsynaptic current</i>)
Abb.	Abbildung	<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat. ‚und andere‘)
ANOVA	Varianzanalyse (von engl. <i>analysis of variance</i>)	etc.	<i>et cetera</i> (lat. ‚und so weiter‘)
AP	Alkalische Phosphatase	EtOH	Ethanol
Arc	<i>activity-regulated cytoskeleton-associated protein</i> (engl.)	FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
as	<i>antisense</i> (komplementär zur entsprechenden mRNA)	FLI	<i>Fos-like immunoreactivity</i> (engl.)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat	GABA	γ -Aminobuttersäure (von engl. <i>γ-aminobutyric acid</i>)
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i> (engl.)	GC	gustatorischer Cortex
b	Basen	GG	<i>Ganglion geniculi</i> (lat.)
bp	Basenpaar	Ggl.	<i>Ganglion</i> (lat.)
BR	Blockierreagens	GN	<i>Ganglion nodosum</i> (lat.)
bzw.	beziehungsweise	GP	<i>Ganglion petrosum</i> (lat.)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	GS	Größenstandard
catFISH	<i>cellular compartment analysis of temporal activity by fluorescent in situ hybridization</i> (engl.)	HCl	Chlorwasserstoff
cDNA	komplementäre DNA (von engl. <i>complementary DNA</i>)	IEG	<i>Immediate-early-Gen</i> (engl. ‚unmittelbares frühes Gen‘)
cNTS	caudaler <i>Nucleus tractus solitarii</i> (lat.)	IHC	Immunhistochemie
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i> (engl.)	IMP	Inosinmonophosphat
CT	<i>Chorda tympani</i> (lat.)	ISH	<i>In-situ</i> -Hybridisierung
Cuc	Cucurbitacin I	kb	Kilobasenpaar (1000 Basenpaare)
Cyx	Cycloheximid	lat.	lateinisch
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	LTD	Langzeitdepression (von engl. <i>long-term depression</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat	LTP	Langzeitpotenzierung (von engl. <i>long-term potentiation</i>)
Dig	Digoxigenin	M	molar, Mol pro Liter
DMSO	Dimethylsulfoxid	MEF2	<i>myocyte enhancer factor 2</i> (engl.)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (von engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)	MeOH	Methanol
DNase	Desoxyribonuklease	mM	millimolar, Millimol pro Liter
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	μ M	mikromolar, Mikromol pro Liter
DTT	Dithiothreitol	MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (von engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)	mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (von engl. <i>messenger RNA</i>)
		MWB	Maleinsäure-Waschpuffer (von engl. <i>maleate wash buffer</i>)
		N.	<i>Nervus</i> (lat. ‚Nerv‘)

Abkürzungsverzeichnis

Nn.	<i>Nervi</i> (lat. ‚Nerven‘)	rNTS	rostraler <i>Nucleus tractus solitarii</i> (lat.)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	rRNA	ribosomale RNA
Ncl.	<i>Nucleus</i> (lat. ‚Kern‘)	RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
NIH	<i>National Institutes of Health</i> (engl.)	s	<i>sense</i> (der mRNA-Sequenz entsprechend)
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat	s.	siehe
NPM	<i>Nervus petrosus major</i> (lat.)	S.	Seite
NTE	Natriumchlorid-Tris-EDTA-Puffer	SCC	<i>solitary chemosensory cell</i> (engl. ‚vereinzelte chemosensorische Zelle‘)
NTP	Nukleosidtriphosphat	SRF	<i>serum response factor</i> (engl.)
NTS	<i>Nucleus tractus solitarii</i> (lat.)	SSC	<i>saline-sodium citrate</i> (engl. ‚Kochsalzlösung mit Natriumcitrat‘)
o. Ä.	oder Ähnliches	Tab.	Tabelle
OD	optische Dichte	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
OT	Objektträger	Tas1r	<i>taste receptor type 1</i> (engl. ‚Geschmacksrezeptor, Typ 1‘)
p. a.	<i>pro analysi</i> (lat. ‚für die Analyse‘)	Tas2r	<i>taste receptor type 2</i> (engl. ‚Geschmacksrezeptor, Typ 2‘)
PbN	<i>Nucleus parabrachialis</i> (lat.)	TEA	Triethanolamin
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (engl. ‚phosphatgepufferte Kochsalzlösung‘)	Th	Thalamus
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (von engl. <i>polymerase chain reaction</i>)	TN	Tris-Natriumchlorid-Puffer
PFA	Paraformaldehyd	TNB	Tris-Natriumchlorid-Puffer mit Blockierreagens
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>	TSA	<i>tyramide signal amplification</i> (engl.)
PK	Proteinase K	U	Enzymeinheit
Pkd2l1	<i>Polycystic kidney disease 2-like 1</i> (engl.)	UV	Ultraviolettstrahlung
PNNL	Pacific Northwest National Laboratory	vgl.	vergleiche
POD	Meerrettich-Peroxidase	vs.	<i>versus</i> (lat. ‚gegenüber, im Vergleich zu‘)
Qui	Chininhydrochlorid (von engl. <i>quinine hydrochloride</i>)		
RNA	Ribonukleinsäure (von engl. <i>ribonucleic acid</i>)		
RNase	Ribonuklease		

1 Einleitung

Dieser Abschnitt soll eine Einführung in das Thema dieser Dissertation bieten. Hierzu wird zunächst der aktuelle Wissensstand über die Verarbeitung von Geschmacksinformation dargestellt. Anschließend folgen Betrachtungen über den Aufbau des *Nucleus tractus solitarius* und das *Immediate-early-Gen Arc*, die Hauptgegenstand dieser Arbeit sind. Schließlich werden die Fragestellung und der wissenschaftliche Ansatz erläutert und die Zielstellung formuliert.

1.1 Funktionelle und anatomische Grundlagen des Geschmackssinns

Der Geschmackssinn oder die gustatorische Wahrnehmung ist ein chemischer Nahrungssinn. Seine Aufgabe ist es, potentielle Nahrungsmittel zu bewerten. Zum einen muss Nahrung erkannt werden, die reich an Energie oder benötigten Nährstoffen ist, und zum anderen muss der Organismus vor der Aufnahme schädlicher Substanzen geschützt werden. Obwohl mehrere Sinne an der Beurteilung der Nahrung beteiligt sind, kommt dem Geschmackssinn eine besondere Rolle zu, da er die letzte Kontrollstation vor der Aufnahme darstellt und über „Schlucken oder Spucken“ entscheidet. Diese Entscheidung ist besonders wichtig bei Tieren, die einmal aufgenommene Nahrung nicht erbrechen können, wie etwa Nager.¹

Man geht heute im Allgemeinen von fünf Geschmacksqualitäten oder Grundgeschmacksarten aus. Süß und umami kennzeichnen energiereiche Nahrungsmittel, die Kohlenhydrate bzw. Aminosäuren enthalten. Saurer und bitterer Geschmack warnen vor unreifer, verdorbener oder giftiger Nahrung. Beim Salzgeschmack entscheiden Art und Konzentration des Salzes über die Attraktivität. Unter den Mineral-salzen schmeckt Natriumchlorid am stärksten salzig.² Während es in geringen Konzentrationen präferiert wird, wird es in hohen Konzentrationen vermieden.³ Die Vorstellung von Grundgeschmacksqualitäten ist mindestens 2000 Jahre alt und aus mehreren Kulturen bekannt.⁴ Süß, sauer, bitter und salzig wurden bereits im China der frühen Han-Dynastie und von Aristoteles als grundlegende Kategorien verwendet.^{3,4} Umami hingegen wurde erst Anfang des 20. Jahrhunderts von dem japanischen Forscher Kikunae Ikeda beschrieben.⁵ In der westlichen Welt gelangte es erst gegen Ende des vergangenen Jahrhunderts zu breiter Bekanntheit. Ebenfalls zu den Geschmacksqualitäten zählte Aristoteles außerdem scharf, herb, stechend und fettig. Wir wissen heute, dass für diese Wahrnehmungen zum Teil Schmerz- und Tastsinn verantwortlich sind und die Information über andere Wege ins Gehirn gelangt als die Geschmacksinformation. Capsaicin und Piperin etwa, die Inhaltsstoffe, die für die Schärfe von Chili bzw. Pfeffer verantwortlich sind, wirken auf Schmerzrezeptoren.⁶ Es ist bemerkenswert, dass auch fettig als Geschmacksqualität in Aristoteles Aufzählung enthalten ist. Fette haben von den Makronährstoffen den größten Energiegehalt und es gibt essentielle Fettsäuren, die der Mensch mit der Nahrung aufnehmen muss. Dennoch war man lange der Meinung, dass die Information über den Fettgehalt einer Speise vornehmlich über taktile oder olfaktorische Eigenschaften vermittelt wird. Erst in den letzten Jahren hat eine Reihe von Experimenten Hinweise für die Existenz einer spezifischen Geschmackswahrnehmung für Fette bzw. Fettsäuren bei

¹K. Yamamoto u. a., *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 24 (2002), Nr. 3, S. 135–138.

²G. M. Feldman u. a., *J Neurophysiol* 90 (2003), Nr. 3, S. 2060–2064.

³K. Scott, *Neuron* 48 (2005), Nr. 3, S. 455–464.

⁴R. P. Erickson, *Behav Brain Sci* 31 (2008), Nr. 1, S. 59–75, 59–75.

⁵K. Kurihara, *Am J Clin Nutr* 90 (2009), Nr. 3, 719S–722S.

⁶F. N. McNamara, A. Randall und M. J. Gunthorpe, *Br J Pharmacol* 144 (2005), Nr. 6, S. 781–790.

Nagern und im Menschen geliefert.⁷⁻⁹ Auch die Existenz weiterer Geschmacksqualitäten wird diskutiert. Kandidaten dafür sind metallisch, adstringierend sowie ein Geschmackssinn für Calciumionen oder Wasser.^{3,10-12}

Dass bereits vor Jahrtausenden trigeminale Empfindungen, wie scharf oder stechend, zu den Grundgeschmacksqualitäten gezählt wurden,^{3,4} und dass in der deutschen Sprache Geschmack und Aroma teils synonym gebraucht werden, zeigt, wie schwer der Geschmackssinn von anderen Sinnessystemen zu trennen ist. Häufig hört man, dass Nahrungsmittel fade schmecken, wenn man erkältet ist, obwohl in erster Linie der Geruchssinn beeinträchtigt ist.

Die Einteilung in Grundgeschmacksqualitäten ist jedoch mit Vorsicht zu betrachten, da diese Kategorien in der Regel vom Menschen abgeleitet wurden.¹³ Man weiß heute, dass es bereits innerhalb einer Spezies große Unterschiede in der Geschmackswahrnehmung gibt. Je nach genetischer Ausstattung nehmen Menschen beispielsweise Bitterstoffe unterschiedlich stark wahr oder können sie gar nicht schmecken.^{14,15} Noch größer werden die Unterschiede, wenn man verschiedene Spezies betrachtet. Katzen beispielsweise besitzen keinen funktionellen Süßrezeptor.¹⁶ Nagetiere und Rinder besitzen eine spezielle Wahrnehmung für Natriumsalze, die bei Menschen nicht bekannt ist.^{13,17} Außerdem reagiert der Umamirezeptor der Nager auf ein größeres Spektrum an Aminosäuren als der des Menschen.^{18,19} Künstliche Süßstoffe rufen in Nagetieren nur geringe Präferenz hervor, während sie beim Menschen eine teils vielfach stärkere Süßkraft als Zucker besitzen.²⁰ Stattdessen können Nager das für Menschen geschmacksneutrale Maltodextrin wahrnehmen, das für sie noch stärker attraktiv ist als Mono- und Disaccharide und in Verhaltensexperimenten von jenen unterschieden wird.²¹ Diese Unterschiede in der Geschmackswahrnehmung zwischen verschiedenen Spezies sind insbesondere bedeutend, da ein großer Teil der Geschmacksforschung am Tiermodell durchgeführt wird.

1.1.1 Detektion von Geschmacksstoffen in der Peripherie

Die Geschmackssinneszellen sind in Geschmacksknospen angeordnet. Dies sind zwiebelartige Strukturen, die aus etwa 50–100 Zellen bestehen und in die Epithelien von Zunge, weichem Gaumen, Rachen, Kehlkopf und Ösophagus eingelagert sind.²² Bei den Nagetieren finden sich Geschmacksknospen zusätzlich an der *Papilla incisiva*, die sich hinter den Schneidezähnen am gaumenseitigen Austritt des *Ductus nasopalatinus* befindet.²³ Während die übrigen Geschmacksknospen im Gewebe verteilt liegen, befinden sie sich auf der Zunge in spezialisierten Strukturen, den Geschmackspapillen (s. Abb. 1.1). Auf den vorderen zwei Dritteln des Zungenrückens finden sich die Pilzpapillen (*papillae fungiformes*), die bei den Nagetieren jeweils nur eine und beim Menschen etwa drei bis vier Geschmacksknospen tragen.²⁴⁻²⁶

⁷D. Gaillard u. a., *FASEB J* 22 (2008), Nr. 5, S. 1458–1468.

⁸C. Cartoni u. a., *J Neurosci* 30 (2010), Nr. 25, S. 8376–8382.

⁹M. M. Galindo u. a., *Chem Senses* 37 (2012), Nr. 2, S. 123–139.

¹⁰Y. Maruyama u. a., *PLoS One* 7 (2012), Nr. 4, e34489.

¹¹N. Chaudhari und S. D. Roper, *J Cell Biol* 190 (2010), Nr. 3, S. 285–296.

¹²A. M. Rosen, A. T. Roussin und P. M. Di Lorenzo, *Front Neurosci* 4 (2010), S. 175.

¹³A. C. Spector und S. P. Travers, *Behav Cogn Neurosci Rev* 4 (2005), Nr. 3, S. 143–191.

¹⁴B. Bufe u. a., *Curr Biol* 15 (2005), Nr. 4, S. 322–327.

¹⁵N. Roudnitzky u. a., *Hum Mol Genet* 20 (2011), Nr. 17, S. 3437–3449.

¹⁶X. Li u. a., *PLoS Genet* 1 (2005), Nr. 1, S. 27–35.

¹⁷F. R. Bell, *J Anim Sci* 59 (1984), Nr. 5, S. 1369–1372.

¹⁸G. Nelson u. a., *Nature* 416 (2002), Nr. 6877, S. 199–202.

¹⁹X. Li u. a., *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), Nr. 7, S. 4692–4696.

²⁰J. D. Fernstrom u. a., *J Nutr* 142 (2012), Nr. 6, 1134S–1141S.

²¹A. Scalfani, *Appetite* 43 (2004), Nr. 1, S. 1–3.

²²P. A. Breslin und A. C. Spector, *Curr Biol* 18 (2008), Nr. 4, R148–155.

²³S. P. Travers, C. Pfaffmann und R. Norgren, *Brain Res* 365 (1986), Nr. 2, S. 305–320.

²⁴J. Miller I. J., *J Gen Physiol* 57 (1971), Nr. 1, S. 1–25.

²⁵L. H. Cheng und P. P. Robinson, *Arch Oral Biol* 36 (1991), Nr. 8, S. 583–589.

²⁶C. M. Mistretta u. a., *J Comp Neurol* 409 (1999), Nr. 1, S. 13–24.

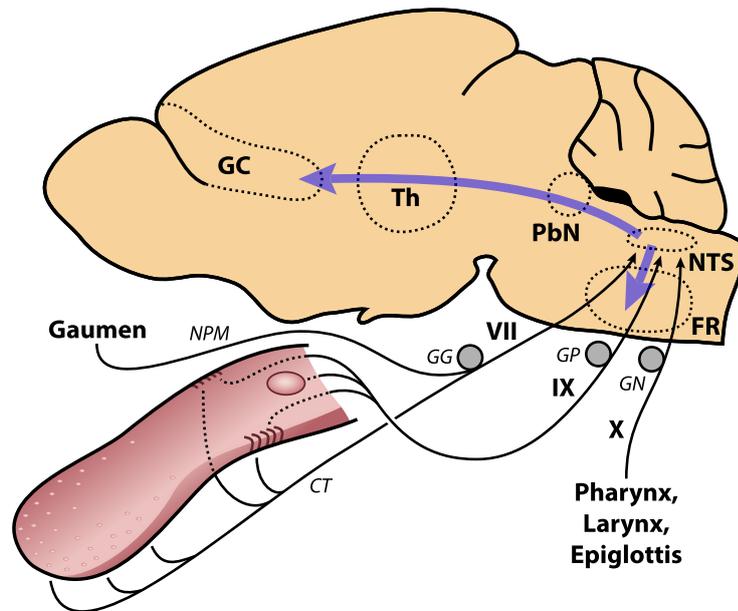


Abbildung 1.1: Transport der Geschmacksinformation in der Maus. Die Geschmacksknospen des Gaumens und der vorderen Zunge werden von zwei Ästen des Nervus facialis (VII) versorgt, dem Nervus petrosus major (NPM) und der Chorda tympani (CT). Die Zellkörper befinden sich im Ganglion geniculi (GG). Die hintere Zunge wird vom Nervus glossopharyngeus (IX) innerviert, dessen Zellkörper im Ganglion petrosus (GP) liegen. Die Geschmacksknospen von Pharynx, Larynx und Epiglottis schließlich werden von einem Ast des Nervus vagus (X) innerviert, dessen Zellkörper sich im Ganglion nodosum (GN) befinden. Die erste Station der Geschmacksverarbeitung im Gehirn ist der Nucleus tractus solitarii (NTS) im Hirnstamm. Von hier entspringt die aufsteigende Geschmacksbahn über den Nucleus parabrachialis (PbN) und den Thalamus (Th) in den gustatorischen Cortex (GC). NTS-Neurone projizieren zudem in die Formatio reticularis des Hirnstamms (FR), wo sie an der Ausprägung von oromotorischen Reflexen beteiligt sind.

Am hinteren Zungenrand befinden sich die Blätterpapillen (*papillae foliatae*), die in der Maus Dutzende und beim Menschen Hunderte Geschmacksknospen beherbergen.²⁷ Die Wallpapillen (*papillae vallatae*) schließlich befinden sich am Zungengrund, kurz vor dem *Sulcus terminalis linguae*. Der Mensch besitzt etwa ein Dutzend von ihnen, Maus und Ratte hingegen jeweils nur eine Wallpapille.^{28,29}

Zusätzlich finden sich in den Epithelien der Atemwege und des Verdauungstrakts sogenannte *solitary chemosensory cells* (SCCs, vereinzelte chemosensorische Zellen), die ebenfalls Geschmacksrezeptoren exprimieren. Im Gegensatz zu den Geschmackssinneszellen, werden SCCs nicht speziell-viszerosensibel durch Geschmacksfasern (vgl. Abschnitt 1.1.2), sondern allgemein-somatosensibel durch Fasern des *N. trigeminus* innerviert. Man nimmt an, dass sie nicht an der Geschmackswahrnehmung beteiligt sind, sondern protektive Funktionen ausüben, indem sie etwa schädliche Substanzen in der Atemluft detektieren oder das Eindringen von Nahrungsbestandteilen in die Atemwege verhindern.^{30,31}

Um die Jahrtausendwende wurden zwei Familien von G-Protein gekoppelten Rezeptoren in Geschmacksknospen entdeckt und als Geschmacksrezeptoren identifiziert.^{18,32–34} Die Tas1r-Familie (*taste receptor type 1*) umfasst drei Mitglieder, von denen je zwei als Heterodimer einen funktionellen Rezeptor formen. Das Dimer aus Tas1r1 und Tas1r3 bildet den Umamirezeptor, Tas1r2 und Tas1r3 hingegen fungieren gemeinsam als Süßrezeptor. Die Tas2r-Familie (*taste receptor type 2*) ist in den Säugetieren

²⁷M. A. Hoon u. a., *Cell* 96 (1999), Nr. 4, S. 541–551.

²⁸B. Whiteside, *J Comp Neurol* 44 (1927), Nr. 2, S. 363–377.

²⁹M. E. Frank, *J Neurophysiol* 65 (1991), Nr. 6, S. 1452–1463.

³⁰T. E. Finger u. a., *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003), Nr. 15, S. 8981–8986.

³¹W. Lin u. a., *J Neurophysiol* 99 (2008), Nr. 3, S. 1451–1460.

³²E. Adler u. a., *Cell* 100 (2000), Nr. 6, S. 693–702.

³³H. Matsunami, J. P. Montmayeur und L. B. Buck, *Nature* 404 (2000), Nr. 6778, S. 601–604.

³⁴G. Nelson u. a., *Cell* 106 (2001), Nr. 3, S. 381–390.

mit einer variablen Anzahl vertreten. Die bislang untersuchten Säuger weisen zwischen 15 und 36 funktionelle Gene auf.³⁵ Sie stellen die Rezeptoren des Bittergeschmacks dar.³⁶ Wie die Tas1-Rezeptoren können auch sie sich zusammenlagern, jedoch hat diese Oligomerisierung anscheinend keinen Einfluss auf ihre Funktion.³⁷ Im Gegensatz zum Umami-, Süß- und Bittergeschmack ist über die Mechanismen der Sauer- und Salzig-Detektion weit weniger bekannt. Der epitheliale Natriumkanal (ENaC) vermittelt über den Einstrom von Natriumionen in die Zelle eine attraktive Komponente des Salzgeschmacks, die insbesondere bei Nagetieren gut charakterisiert ist.³⁸ In vielen Spezies aber, so auch im Mensch, existiert eine zusätzliche, von ENaC unabhängige Wahrnehmung von natriumhaltigen und anderen Salzen.^{38–40} Noch weniger ist über den Rezeptor des Sauergeschmacks bekannt. Als ein möglicher Kandidat wurde der Ionenkanal *Pkd2l1* (*Polycystic kidney disease 2-like 1*) vorgeschlagen. Genetisch modifizierte Mäuse, bei denen die *Pkd2l1* exprimierenden Zellen absterben, zeigen keine Aktivierung der Geschmacksnerven durch Säuren. Die übrigen Geschmacksqualitäten sind davon unberührt.⁴¹ In Mäusen, in denen jedoch nur das *Pkd2l1*-Gen ausgeschaltet wurde, ohne dass die Zellen absterben, ist die Nervenaktivierung durch Säuren nur reduziert. Es müssen also weitere noch unbekannte Rezeptoren beteiligt sein.⁴² Es ist bemerkenswert, dass die bislang bekannten Geschmacksrezeptoren auf der Zunge in nach Geschmacksqualität getrennten Zellpopulationen auftreten.⁴³

1.1.2 Weiterleitung und zentrale Verarbeitung der Geschmacksinformation

Geschmacksrezeptorzellen sind sekundäre Sinneszellen, besitzen also keine Axone. Stattdessen werden sie von afferenten sensorischen Nervenfasern innerviert. Je nach Lage der Geschmacksknospe übernehmen drei Hirnnerven den Transport der Geschmacksinformation ins Gehirn (vgl. Abb. 1.1). Der *Nervus facialis* (VII) ist mit zwei Ästen beteiligt. Dies ist zum einen der *Nervus petrosus major*, der die Geschmacksknospen des weichen Gaumens sowie, bei Nagern, der *Papilla incisiva* innerviert. Zum anderen innerviert die *Chorda tympani* die Pilzpapillen sowie den vordersten Teil der Blätterpapillen.^{28,44–46} Die übrigen Geschmacksknospen der Blätterpapillen sowie die Wallpapillen werden durch den Zungenast des *Nervus glossopharyngeus* (IX) versorgt.^{44,47} Der *Nervus vagus* (X) schließlich innerviert die Geschmacksknospen von Pharynx, Larynx und Epiglottis.^{44,48}

Die Zellkörper der Geschmacksfasern von *N. petrosus major* und *Chorda tympani* befinden sich im *Ganglion geniculi*. Das *Ganglion petrosum* enthält die Zellkörper der Geschmacksfasern des *N. glossopharyngeus* und das *Ganglion nodosum* die des *N. vagus*.

Die Geschmacksfasern projizieren in den *Nucleus tractus solitarii* (NTS) im Hirnstamm, die erste Station der Geschmacksverarbeitung im Gehirn. Er weist bei Nagetieren die Form eines horizontal liegenden V auf, dessen Schenkel sich nach rostral öffnen (s. Abb. 1.2). Die Projektion der drei Nerven weist eine gewisse Orotopie auf. Fasern des *N. facialis* – von der vorderen Zunge und dem Gaumen – enden am weitesten rostral, gefolgt von den Fasern des *N. glossopharyngeus* von der hinteren Zunge. Die Geschmacksfasern des *N. vagus* schließlich terminieren am weitesten caudal. Die Projektionsgebiete der

³⁵D. Dong, G. Jones und S. Zhang, *BMC Evol Biol* 9 (2009), S. 12.

³⁶M. Behrens und W. Meyerhof, *Results Probl Cell Differ* 47 (2009), S. 203–220.

³⁷C. Kuhn u. a., *Chem Senses* 35 (2010), Nr. 5, S. 395–406.

³⁸J. Chandrashekar u. a., *Nature* 464 (2010), Nr. 7286, S. 297–301.

³⁹D. V. Smith und C. A. Ossebaard, *Physiol Behav* 57 (1995), Nr. 4, S. 773–777.

⁴⁰B. P. Halpern, *Neurosci Biobehav Rev* 23 (1998), Nr. 1, S. 5–47.

⁴¹A. L. Huang u. a., *Nature* 442 (2006), Nr. 7105, S. 934–938.

⁴²N. Horio u. a., *PLoS One* 6 (2011), Nr. 5, e20007.

⁴³J. Chandrashekar u. a., *Nature* 444 (2006), Nr. 7117, S. 288–294.

⁴⁴C. M. Mistretta, *Gerodontology* 3 (1984), Nr. 2, S. 131–136.

⁴⁵T. Yamamoto und Y. Kawamura, *Chem Senses* 1 (1975), Nr. 3, S. 241–244.

⁴⁶K. Yamamoto u. a., *J Neurochem* 119 (2011), Nr. 3, S. 497–506.

⁴⁷S. J. Hendricks, S. I. Sollars und D. L. Hill, *J Neurosci* 22 (2002), Nr. 19, S. 8607–8613.

⁴⁸E. R. Lalonde und J. A. Eglitis, *Anat Rec* 140 (1961), S. 91–95.

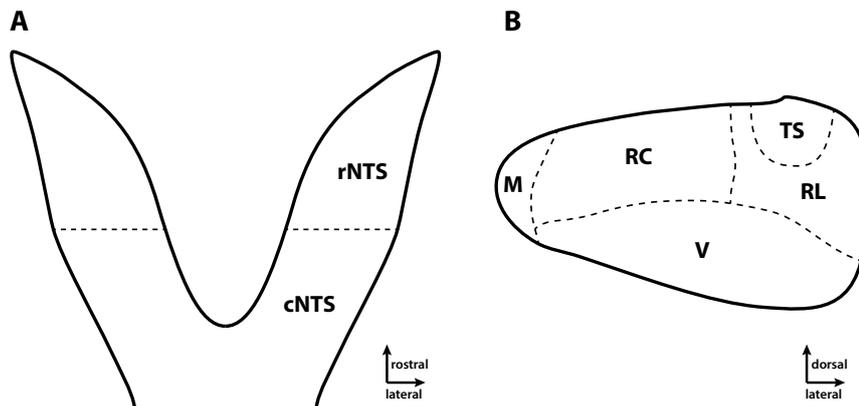


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des *Nucleus tractus solitarii* (NTS) der Ratte. **A:** Ein Horizontalschnitt zeigt die traditionelle Unterteilung des NTS in einen rostralen (rNTS) und einen caudalen Teil (cNTS). Umriss des Ratten-NTS adaptiert von Travers [57]. **B:** Anhand eines Coronalchnitts sind die Subregionen des rostralen NTS dargestellt. M: mediale, RC: rostro-centrale, RL: rostro-laterale, V: ventrale Subregion, TS: *Tractus solitarius*. Adaptiert von Bradley u. a. [54].

drei Nerven überlappen dabei stark.^{49–51} Diese grobe Orotopie bleibt auch in den höheren Arealen der Geschmacksverarbeitung erhalten.^{52,53}

Ausgehend vom NTS teilt sich die Verarbeitung der Geschmacksinformation. Ein Teil der gustatorischen Zellen des NTS projiziert innerhalb des Hirnstamms. Diese Zellen sind vornehmlich an der Ausprägung von angeborenem Geschmacksverhalten beteiligt.⁵⁴ Eine weitere Gruppe gustatorischer Zellen im NTS ist an der aufsteigenden Geschmacksbahn beteiligt. Diese verläuft über den *Nucleus ventralis posteromedialis* des Thalamus (Th) in die gustatorischen Areale der Großhirnrinde (GC), wo die Geschmacksinformation mit Temperatur- und Tastinformation der Mundhöhle sowie mit olfaktorischen Reizen integriert wird.⁵⁵ Bei den Nagetieren existiert wie bei den meisten Säugern mit dem *Nucleus parabrachialis* (PbN) eine weitere Schaltstation zwischen NTS und Thalamus.⁵⁴ In einigen Primaten, darunter der Mensch, ist der PbN hingegen nicht an der Verarbeitung gustatorischer Information beteiligt. Lediglich Neurone des nichtgustatorischen, caudalen NTS projizieren hier in den PbN.⁵⁶

1.1.3 Anatomischer und funktioneller Aufbau des *Nucleus tractus solitarii*

Der NTS ist ein vielseitiger Hirnnervenkern. Anhand der Afferenzen unterscheidet man einen rostralen und einen caudalen Teil. Der caudale Teil erhält allgemein-viszerosensible Information der Hirnnerven IX und X. Dabei handelt es sich um mechano- und chemosensorische Information über Blutdruck und Blutgaskonzentrationen sowie weitere Information aus den Atemwegen und dem Gastrointestinaltrakt.⁵⁸ Der rostrale Teil hingegen erhält speziell-viszerosensible Afferenzen, die die Geschmacksinformation transportieren, er wird daher auch als Geschmackskern bezeichnet. Diese klare funktionelle Teilung in einen orosensorischen und einen viszerosensorischen Teil ist jedoch nicht auf anatomischer Ebene ersichtlich. Vielmehr gehen beide Unterkerne ohne klare Trennlinie ineinander über.⁵⁴ Um eine Unterscheidung zwischen dem rostralen und caudalen Teil zu treffen, nimmt man traditionell eine sehr einfache

⁴⁹R. B. Hamilton und R. Norgren, *J Comp Neurol* 222 (1984), Nr. 4, S. 560–577.

⁵⁰R. J. Contreras, R. M. Beckstead und R. Norgren, *J Auton Nerv Syst* 6 (1982), Nr. 3, S. 303–322.

⁵¹T. Hanamori und D. V. Smith, *J Comp Neurol* 282 (1989), Nr. 1, S. 1–14.

⁵²M. McPheeters u. a., *Neuroscience* 34 (1990), Nr. 3, S. 745–758.

⁵³H. Yoshimura u. a., *Chem Senses* 30 Suppl 1 (2005), S. i164–165.

⁵⁴R. M. Bradley u. a. *The Role of the Nucleus of the Solitary Tract in Gustatory Processing*. Frontiers in Neuroscience. Boca Raton (FL), 2007. ISBN: 978-0-8493-4200-4

⁵⁵T. V. Sowards und M. A. Sowards, *Neurosci Biobehav Rev* 25 (2001), Nr. 5, S. 395–407.

⁵⁶D. M. Small und T. R. Scott, *Ann N Y Acad Sci* 1170 (2009), S. 343–346.

⁵⁸M. Trepel. *Neuroanatomie. Struktur und Funktion*. 3. Aufl. München: Elsevier, 2006. ISBN: 978-3-437-41297-4

Unterteilung vor. Ausgehend von dem Punkt, an dem die mediale Kante des NTS auf den vierten Ventrikel trifft, wird senkrecht zur Mittellinie eine Grenze nach medial gezogen (vgl. Abb. 1.2 A). Alles rostral davon wird als rostraler NTS und der Rest als caudaler NTS bezeichnet. Diese Unterteilung spiegelt die tatsächliche funktionelle Trennung jedoch nur bedingt wider.⁵⁴

Im rostralen NTS wurden weitere Unterteilungen anhand histologischer und funktioneller Unterschiede identifiziert (s. Abb. 1.2 B). Die mediale Region (M) erhält keine direkten Afferenzen von Hirnnerven, steht jedoch in Verbindung mit dem caudalen NTS. Man vermutet eine Rolle als Bindeglied zwischen rostralem und caudalem NTS. Die rostro-centrale Region (RC) erhält den Großteil der gustatorischen Afferenzen der Hirnnerven und enthält den Großteil der Neurone, die in die aufsteigende Geschmacksbahn projizieren. Weitere Efferenzen ziehen in die oromotorischen Zentren des Hirnstamms. RC erhält außerdem Afferenzen von PbN und caudalem NTS. Die rostro-laterale Region (RL) erhält ebenfalls Information der Hirnnerven, jedoch vornehmlich orotaktile. Auch von hier entspringen einige Efferenzen in den PbN. Die ventrale Region (V) schließlich enthält den Großteil der Neurone, die in die oromotorischen Zentren des Hirnstamms projizieren. Zudem gibt es wenige reziproke Verbindungen zum PbN.⁵⁴

1.1.4 Neuronentypen im *Nucleus tractus solitarii*

Neben den gustatorischen Afferenzen treffen im rostralen NTS auch Information von thermischen und taktilen Rezeptoren der Mundhöhle ein.^{59,60} Diese werden teils in getrennten Zellen verarbeitet, ein bedeutender Teil der NTS-Neurone ist jedoch multimodal, reagiert also auf Reize mehrerer Sinnessysteme.^{61,62} Eine Vielzahl von Neuronentypen wurde im NTS identifiziert und anhand ihrer Form, Reizbarkeit, Antwortverhalten, Neurochemie oder Projektionen in Gruppen eingeteilt.^{62–66} Einige dieser Neuronentypen sollen im folgenden beleuchtet werden.

Anhand der Projektionen lassen sich drei Gruppen von NTS-Neuronen unterscheiden.^{64,67,68} Die erste Gruppe projiziert in die aufsteigende Geschmacksbahn, im Falle der Nager also in den PbN. Eine zweite Gruppe projiziert in die motorischen Kerne der *Formatio reticularis* des Hirnstamms. Die Zielareale dieser Neurone sind in der Ausprägung von Reflexen beteiligt, die eine Rolle im angeborenen Geschmacksverhalten spielen. Diese beiden Gruppen scheinen bereits durch unterschiedliche Populationen von Ganglienzellen innerviert zu werden.⁶⁴ Die dritte Gruppe schließlich sendet Axone innerhalb des NTS. Man nimmt an, dass diese Neurone eine Rolle bei der Integration von viszeraler und oraler Information spielen.^{67,69,70}

Weiterhin lassen sich NTS-Neurone mit Alles-oder-Nichts- oder mit gestaffeltem Antwortverhalten unterscheiden. Alles-oder-Nichts-Neurone sind vornehmlich an der aufsteigenden Geschmacksbahn beteiligt und haben ein kleines rezeptives Feld, vor allem durch Innervierung von *Chorda-tympani*-Fasern. Dadurch dass sie relativ wenig Information integrieren, sind sie vermutlich wenig an der Geschmacksverarbeitung beteiligt. Neurone mit gestaffeltem Antwortverhalten hingegen werden überwiegend vom *N. glossopharyngeus* innerviert, haben ein großes rezeptives Feld und spielen eine Rolle bei der Steuerung von oromotorischen Reflexen.^{66,71}

⁵⁹H. Ogawa, T. Imoto und T. Hayama, *Exp Brain Res* 54 (1984), Nr. 2, S. 349–358.

⁶⁰H. Ogawa, T. Hayama und Y. Yamashita, *Brain Res* 454 (1988), Nr. 1-2, S. 321–331.

⁶¹S. P. Travers und R. Norgren, *J Neurophysiol* 73 (1995), Nr. 6, S. 2144–2162.

⁶²A. T. Roussin u. a., *J Neurosci* 32 (2012), Nr. 31, S. 10494–10506.

⁶³M. S. King und R. M. Bradley, *J Comp Neurol* 344 (1994), Nr. 1, S. 50–64.

⁶⁴F. N. Zaidi u. a., *J Comp Neurol* 511 (2008), Nr. 6, S. 753–772.

⁶⁵S. P. Travers und L. C. Geran, *Physiol Behav* 97 (2009), Nr. 5, S. 592–603.

⁶⁶M. Wang und R. M. Bradley, *Brain Res* 1328 (2010), S. 71–78.

⁶⁷C. B. Halsell, S. P. Travers und J. B. Travers, *Neuroscience* 72 (1996), Nr. 1, S. 185–197.

⁶⁸S. P. Travers und H. Hu, *J Comp Neurol* 427 (2000), Nr. 1, S. 124–138.

⁶⁹P. S. Lasiter und D. L. Kachele, *Brain Res Bull* 21 (1988), Nr. 4, S. 623–636.

⁷⁰B. J. Davis und T. Jang, *Chem Senses* 11 (1986), Nr. 2, S. 213–228.

⁷¹T. Suwabe und R. M. Bradley, *J Neurophysiol* 102 (2009), Nr. 1, S. 546–555.

1.2 Verarbeitung der Geschmacksinformation

Die Kodierung und Verarbeitung von Geschmacksinformation beschäftigt Geschmacksforscher spätestens seit den ersten elektrophysiologischen Experimenten im Geschmackssystem vor etwa 80 Jahren.⁷² Schon in den frühen Berichten über durch Geschmacksstimuli hervorgerufene Potentiale wird diskutiert, wie die beobachteten Nervenimpulse zur Entstehung von Sinneseindrücken im Gehirn führen können.⁷³ Rasch etablierten sich zwei konkurrierende Theorien der Verschlüsselung von Geschmacksinformation. Die *Labeled-Line*-Theorie postuliert Typen von Zellen entlang der Geschmacksbahn, deren Aktivierung notwendig und hinreichend für die Verarbeitung einer bestimmten Geschmacksqualität ist. Die *Across-Fiber-Pattern*-Theorie hingegen geht davon aus, dass die Information einer Geschmacksqualität als Erregungsmuster über eine große Population von Zellen transportiert wird.^{74,75} Obwohl die Zellen entlang der Geschmacksbahn mittlerweile sehr gut charakterisiert sind, gibt es keinen Konsens darüber, wie die Geschmacksinformation auf dem Weg von den Rezeptoren auf der Zunge in den gustatorischen Cortex verschlüsselt und übertragen wird.

Eine Reihe von Faktoren erschwert die Aufklärung der Geschmacksverarbeitung. Das wohl größte Hindernis ist, dass der Stimulusraum, also die Eigenschaften und Begrenzungen dessen, was als Geschmacksstimulus anzusehen ist, nicht klar definiert ist.¹³ Beim Sehsinn etwa lassen sich die Reize eindeutig anhand von physikalischen Parametern wie Wellenlänge und Lichtstärke ausmachen. Jede Photorezeptorzelle reagiert spezifisch auf einen Wellenlängenbereich. Der Geschmacksforschung aber fehlt es an physikalischen oder chemischen Attributen, anhand derer sich die Reize identifizieren und kategorisieren ließen. So herrscht etwa Uneinigkeit über die Anzahl der Grundgeschmacksqualitäten. Während fünf Qualitäten allgemein akzeptiert werden, tauchen regelmäßig neue Kandidaten auf (s. Abschnitt 1.1.1). Von manchen wird die Existenz solcher Kategorien überhaupt angezweifelt.⁴ Ein weiterer Faktor ist, dass es zwischen verschiedenen Spezies teils gravierende Unterschiede gibt, was über den Geschmackssinn wahrgenommen werden kann (s. Abschnitt 1.1.1). Hinzu kommt, dass bereits im Rezeptororgan, der Geschmacksknospe, ein beträchtlicher Anteil von Zellen auf Stimuli mehrerer Kategorien reagiert.⁷⁶ Außerdem sind erst für drei der fünf Geschmacksqualitäten hinreichend verifizierte Rezeptoren identifiziert worden.

Der Großteil der Studien über die neuronale Verarbeitung der Geschmacksinformation hat sich zweier Methoden bedient. Zum einen wurden elektrophysiologische Ableitungen an den Elementen der Geschmacksverarbeitung durchgeführt. Orte der Ableitungen waren dabei sowohl ganze Nervenstränge, aber auch einzelne Fasern oder Nervenzellkörper in den Ganglien und den zentralen Stationen der gustatorischen Verarbeitung. Diese Ableitungen sind sehr aufwendig, erlauben aber eine sehr genaue Charakterisierung der untersuchten Elemente. Das Antwortverhalten bei einer Vielzahl von Stimuli kann mit hoher zeitlicher Auflösung untersucht werden. Jedoch ist, im Falle von Einzelzelleitungen, die Anzahl der untersuchten Elemente pro Versuchstier gering^{62,77,78} bzw. geht bei Ableitungen einer Zellpopulation die Information über das einzelne Element verloren.

Elektrophysiologische Ableitungen haben in den vergangenen Jahrzehnten zu einem recht detaillierten Bild der Geschmacksneurone geführt, das im folgenden kurz umrissen werden soll. Entlang der gesamten Geschmacksbahn werden Zellen beobachtet, die eine geringe Stimulusselektivität aufweisen, also auf mehr als eine Geschmacksqualität reagieren. Die Stimulusselektivität nimmt mit jeder Ebene der

⁷²Y. Zotterman, *Skand Arch Physiol* 72 (1935), Nr. 2, S. 73–77.

⁷³C. Pfaffmann, *J Cell Comp Physiol* 17 (1941), Nr. 2, S. 243–258.

⁷⁴R. P. Erickson, *Physiol Behav* 69 (2000), Nr. 1–2, S. 3–13.

⁷⁵L. C. Geran und S. P. Travers, *J Neurophysiol* 101 (2009), Nr. 3, S. 1598–1612.

¹³A. C. Spector und S. P. Travers, *Behav Cogn Neurosci Rev* 4 (2005), Nr. 3, S. 143–191.

⁴R. P. Erickson, *Behav Brain Sci* 31 (2008), Nr. 1, S. 59–75, 59–75.

⁷⁶S. M. Tomchik u. a., *J Neurosci* 27 (2007), Nr. 40, S. 10840–10848.

⁶²A. T. Roussin u. a., *J Neurosci* 32 (2012), Nr. 31, S. 10494–10506.

⁷⁷M. E. Frank, R. J. Contreras und T. P. Hettinger, *J Neurophysiol* 50 (1983), Nr. 4, S. 941–960.

⁷⁸H. Ogawa und T. Hayama, *Exp Brain Res* 54 (1984), Nr. 2, S. 359–366.

Verarbeitung ab.^{13,54,79} Anhand des Stimulus, auf den die Neurone am stärksten reagieren werden sie in Klassen eingeteilt. Mindestens vier dieser Klassen wurden identifiziert, die entsprechend ihrer präferierten Stimuli als N- (Natriumsalze), S- (Saccharose), A- (Säuren) oder Q-Neurone (Chinin) bezeichnet werden.^{13,54,80} Eine wachsende Anzahl von Experimenten weist zudem darauf hin, dass nicht allein die Stärke der Aktivierung, also die Summe der Nervenimpulse, entscheidend für die Informationsübertragung ist. Vielmehr scheint ein signifikanter Teil der Information durch die zeitliche Abfolge dieser Impulse transportiert zu werden.^{62,81,82} Diese zeitliche Kodierung steht nicht im Gegensatz zu den oben beschriebenen räumlichen Formen der Kodierung über *Labeled-Lines* oder ein *Across-Fiber-Pattern*, vielmehr könnte eine zusätzliche zeitliche Komponente die Informationsdichte pro Zelle steigern.⁸³

Bei kritischer Betrachtung der Ergebnisse aus elektrophysiologischen Studien des Geschmackssinns fallen jedoch einige Punkte auf, die es zu beachten gilt. Aufgrund der leichten anatomischen Zugänglichkeit und der relativ unkomplizierten Stimulation der vorderen Zunge, wurde der überwiegende Teil der elektrophysiologischen Untersuchungen an der *Chorda tympani* vorgenommen.^{54,64,84} Das gilt auch für viele Studien, die die Bitterverarbeitung untersucht haben, obwohl der Großteil der Bitterrezeptoren in der hinteren Zunge vorkommt, die vom *N. glossopharyngeus* innerviert wird.⁷⁵ In einer der wenigen Studien, die spezifisch dem *N. glossopharyngeus* gewidmet ist, kommt ein komplizierter Versuchsaufbau zum Einsatz, um die Stimulationslösungen bei anästhesierten Ratten direkt in die Gräben der Blätter- und Wallpapille zu applizieren.²⁹ Weiterhin ist zu bedenken, dass nur wenige elektrophysiologische Experimente an wachen Tieren vorgenommen wurden.^{62,85,86} Der weitaus überwiegende Teil wurde unter Anästhesie durchgeführt. Da aber Anästhetika selbst auf Neurone wirken, muss in Betracht gezogen werden, dass die Betäubung die beobachteten Zellantworten beeinflusst.¹³ Bei NTS-Neuronen, die unter tonischer GABA-Inhibition stehen,¹³ könnten etwa Barbiturate, wie das häufig verwendete Pentobarbital, das Antwortverhalten der NTS-Neurone verändern. In der Tat scheint die Anästhesie einen Einfluss auf die Stimulusselektivität der NTS-Neurone zu haben.⁸⁶

Die zweite Methode beruht auf der Expression von *Fos* als neuronalem Aktivitätsmarker. Die mittels Immunhistochemie nachgewiesene *Fos*-Expression wird üblicherweise als *Fos-like immunoreactivity* (FLI) bezeichnet, daher wird diese Bezeichnung hier übernommen. Im Gegensatz zu elektrophysiologischen Ableitungen kann die Antwort der Gesamtheit der Zellen auf einen Stimulus untersucht werden. Das macht FLI-Experimente zu einem machtvollen Werkzeug, um rasch und mit wenig Aufwand die exzitatorischen Antworten ganzer Neuronenpopulationen in mehreren Gehirngebieten auf bestimmte Reize zu untersuchen. FLI-Experimente haben gezeigt, dass die Neurone, die auf verschiedene Geschmackstimuli reagieren, sich in unterschiedlichen Subregionen des NTS befinden.^{57,87} Die Kombination mit histologischen Färbungen oder der Injektion von neuronalen *Tracern* ermöglicht zudem die Charakterisierung von Funktion und Verschaltung dieser Neuronenpopulationen.^{68,88,89} Die rasche Untersuchung großer Gruppen von Neuronen geht jedoch mit geringer zeitlicher Auflösung einher. Während bei Ner-

⁵⁴R. M. Bradley u. a. *The Role of the Nucleus of the Solitary Tract in Gustatory Processing*. Frontiers in Neuroscience. Boca Raton (FL), 2007. ISBN: 978-0-8493-4200-4

⁷⁹S. Herness, *Physiol Behav* 69 (2000), Nr. 1-2, S. 17–27.

⁸⁰M. E. Frank, R. F. Lundy Jr. und R. J. Contreras, *Prog Neurobiol* 86 (2008), Nr. 3, S. 245–263.

⁸¹P. M. Di Lorenzo, R. M. Hallock und D. P. Kennedy, *Behav Neurosci* 117 (2003), Nr. 6, S. 1423–1433.

⁸²V. Lawhern u. a., *Front Integr Neurosci* 5 (2011), S. 18.

⁸³P. M. Di Lorenzo und J. D. Victor, *J Neurophysiol* 90 (2003), Nr. 3, S. 1418–1431.

⁶⁴F. N. Zaidi u. a., *J Comp Neurol* 511 (2008), Nr. 6, S. 753–772.

⁸⁴L. C. Geran und S. P. Travers, *J Neurophysiol* 96 (2006), Nr. 5, S. 2513–2527.

²⁹M. E. Frank, *J Neurophysiol* 65 (1991), Nr. 6, S. 1452–1463.

⁸⁵K. Nakamura und R. Norgren, *J Neurophysiol* 66 (1991), Nr. 4, S. 1232–1248.

⁸⁶K. Nakamura und R. Norgren, *J Neurophysiol* 70 (1993), Nr. 3, S. 879–891.

⁵⁷S. P. Travers, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282 (2002), Nr. 6, R1798–1810.

⁸⁷M. I. Harrer und S. P. Travers, *Brain Res* 711 (1996), Nr. 1-2, S. 125–137.

⁶⁸S. P. Travers und H. Hu, *J Comp Neurol* 427 (2000), Nr. 1, S. 124–138.

⁸⁸S. P. Travers und J. B. Travers, *J Comp Neurol* 500 (2007), Nr. 4, S. 746–760.

⁸⁹J. B. Travers u. a., *Chem Senses* 32 (2007), Nr. 2, S. 129–137.

venableitungen die Auflösung im Mikrosekundenbereich liegt,⁶² zeigt die FLI-Methode die gesammelte Aktivierung der Zellen innerhalb etwa einer Stunde an. Dabei kann keine Aussage über den genauen Zeitpunkt der Aktivierung getroffen werden. Auch über die Stärke der Aktivierung gibt die FLI-Methode nur bedingt Auskunft. Dies hat zur Folge, dass man mit der FLI-Methode in der Praxis auf einen Stimulus pro Tier beschränkt ist, da man die *Fos*-Induktion durch mehrere Stimuli nicht unterscheiden könnte. Ein weiterer Nachteil ist, dass inhibitorische postsynaptische Potentiale vernachlässigt werden, da nur neuronale Aktivierung zu einer *Fos*-Expression führt.⁶⁸

Der Geschmacksforschung steht somit bereits eine Reihe etablierter Methoden zur Verfügung, deren Möglichkeiten für einige Fragestellungen jedoch bereits ausgereizt sind. Neue Methoden, die die Nachteile der bisher genutzten ausgleichen, könnten die Forschung auf dem Gebiet der Geschmacksverarbeitung vorantreiben.

1.2.1 Diskriminierung von Bitterstoffen

Unter den Geschmacksqualitäten nimmt bitter eine Sonderstellung ein. Obwohl auch sauer und salzig zu Ablehnungsverhalten führen können, werden diese Qualitäten in geringen Konzentrationen gegenüber Wasser präferiert.⁹⁰ Auch für gering konzentrierte Bitterstoffe wurde eine Präferenz gegenüber Wasser bei einigen Spezies beschrieben, jedoch traten hier starke individuelle Unterschiede auf.⁹¹ Zudem liegen die aversiven Konzentrationen von sauren und salzigen Stimuli mindestens eine Größenordnung über den aversiven Konzentrationen von Bittersubstanzen.⁷⁵ In den meisten Säugetieren stellen die Bitterrezeptoren ferner die weitaus größte Anzahl der bekannten Geschmacksrezeptoren. Dies unterstreicht die Bedeutung der Bitterwahrnehmung für den Organismus, die Vielzahl der strukturell diversen Bitterstoffe zu identifizieren, die Aufnahme in den Körper und damit eine mögliche Vergiftung zu verhindern. Doch nicht alle Stoffe, die bitter schmecken, sind schädlich. Im Gegenteil enthält unsere Nahrung eine Vielzahl von Bitterstoffen, die wir bereitwillig zu uns nehmen und deren Beitrag zum Gesamtgeschmackseindruck einer Speise oder eines Getränks wir erwünschen. Unter diesen Bitterstoffen finden sich auch Nährstoffe wie Di- und Tripeptide, die in fermentierten Milch- und Sojaprodukten vorkommen,^{92,93} oder Vitamine wie Thiamin und Riboflavin.⁹⁴ Auch viele Arzneistoffe haben einen bitteren Geschmack, dennoch nehmen wir unsere Medizin ein und sind damit nicht allein im Tierreich. Anscheinend therapieren sich auch andere Säugetiere durch freiwillige Aufnahme von pharmakologisch aktiven Bittersubstanzen.^{95,96} Omnivoren und Pflanzenfresser, die ein breites Nahrungsspektrum besitzen, begegnen auf der Suche nach Nahrung einer Vielzahl verschiedener Bitterstoffe mit stark unterschiedlicher Toxizität.⁹⁷ Sie müssen entscheiden, welche der bitter schmeckenden potentiellen Nahrung sie zu sich nehmen und welche sie meiden.

Dies legt die Frage nach einem Mechanismus zur Unterscheidung von Bitterstoffen nahe. Die Fähigkeit, schädliche von harmlosen oder gar nützlichen Bittersubstanzen zu unterscheiden und mit angemessenem Verhalten zu reagieren, könnte einen evolutionären Vorteil darstellen.⁹⁸ Ein klarer Zusammenhang zwischen Toxizität und Wahrnehmungsschwelle oder neuronaler Antwort ist bei Bitterstoffen jedoch noch nicht bekannt.^{99,100} Bisher gibt es nur wenige Publikationen, die sich der Frage nach der Unterscheidung von Bittersubstanzen widmen. John Glendinning und Kollegen haben dies an Tabakswärmer-Rau-

⁹⁰M. G. Tordoff, L. K. Alarcon und M. P. Lawler, *Physiol Behav* 95 (2008), Nr. 3, S. 308–332.

⁹¹J. I. Glendinning, *Physiol Behav* 54 (1993), Nr. 1, S. 141–150.

⁹²K. Maehashi u. a., *Biochem Biophys Res Commun* 365 (2008), Nr. 4, S. 851–855.

⁹³J. Upadhyaya u. a., *Biochem Biophys Res Commun* 398 (2010), Nr. 2, S. 331–335.

⁹⁴W. Meyerhof u. a., *Chem Senses* 35 (2010), Nr. 2, S. 157–170.

⁹⁵S. K. Vitazkova u. a., *Anim Behav* 61 (2001), Nr. 5, S. 887–894.

⁹⁶M. A. Huffman, *Proc Nutr Soc* 62 (2003), Nr. 2, S. 371–381.

⁹⁷D. M. Wilson, J. Boughter J. D. und C. H. Lemon, *PLoS One* 7 (2012), Nr. 7, e41597.

⁹⁸J. I. Glendinning, A. Davis und S. Ramaswamy, *J Neurosci* 22 (2002), Nr. 16, S. 7281–7287.

⁹⁹T. R. Scott und G. P. Mark, *Brain Res* 414 (1987), Nr. 1, S. 197–203.

¹⁰⁰J. I. Glendinning, *Physiol Behav* 56 (1994), Nr. 6, S. 1217–1227.

pen untersucht, die ein sehr einfaches Geschmackssystem besitzen. Acht Paare bittersensitiver Zellen verteilen sich auf wenige Sinnesorgane, die Sensillen, die jeweils nur eine Bitterrezeptorzelle enthalten. Diese Raupen können Bitterstoffe unterscheiden, die unterschiedliche Populationen von bittersensitiven Zellen ansprechen oder einen unterschiedlichen Signalweg innerhalb derselben Rezeptorzelle anstoßen.⁹⁸ Glendinning und Kollegen haben zudem gezeigt, dass dabei die zeitliche Folge der Nervenimpulse eine entscheidende Rolle spielt. Selbst Bitterstoffe, die dieselbe Rezeptorzelle aktivieren, können so unterschieden werden. Trotz ihres sehr einfachen Geschmacksapparates sind die Raupen so in der Lage, viele verschiedene Bitterstoffe wahrzunehmen und unterschiedlich auf giftige oder relativ harmlose Bitterstoffe zu reagieren.¹⁰¹

Ist etwas vergleichbares auch bei Säugetieren bekannt? Wie bereits dargestellt, ist das Geschmackssystem der Säuger weitaus komplexer als das der Raupen, nicht zuletzt was die Anzahl der Sinneszellen pro Sinnesorgan, die Geschmacksknospen, und die Gesamtzahl an Sinnesorganen betrifft. Es ist weiterhin bekannt, dass bei den Säugern eine Sinneszelle mehrere Bitterrezeptoren enthält.^{32,36} Dabei werden die Rezeptoren nicht zufällig exprimiert, sondern die Expression scheint im Gegenteil Mustern zu folgen, die dazu führen, dass einzelne Sinneszellen spezifisch auf bestimmte Bitterstoffe reagieren und auf andere nicht.^{36,102}

Ebenso wurden in den Geschmacksnerven Fasern identifiziert, die sehr unterschiedlich auf verschiedene Bitterstimuli reagieren.^{29,103} Manche Bitterstoffe führen überdies nur im *N. glossopharyngeus* zu einer wesentlichen Aktivierung, wohingegen andere auch den *N. facialis* aktivieren.^{104,105} Auch für die erste Station der Geschmacksverarbeitung im Gehirn gibt es Hinweise, dass Neurone unterschiedlich stark auf verschiedene Bitterstimuli ansprechen.^{84,99} Wilson und Kollegen berichten, dass sich die zeitliche Abfolge der Nervenimpulse in NTS-Neuronen unterscheidet, je nachdem welcher Bitterstimulus appliziert wurde. Entscheidend sind dabei die ersten anderthalb Sekunden nach Stimulusbeginn.⁹⁷ Eine Studie, die Fos-Expression als Marker für neuronale Aktivierung im NTS nutzte, konnte jedoch keinen Unterschied nach Gabe verschiedener Bitterstimuli feststellen.¹⁰⁶ *In-vivo-Calcium-Imaging*-Experimente in der Insula der Maus haben gezeigt, dass Geschmacksstimuli verschiedener Qualitäten unterschiedliche Areale des gustatorischen Cortex aktivieren. Innerhalb des „Bitterareals“ überlappte die durch zwei verschiedene Bitterstoffe hervorgerufene Aktivierung zu etwa 70 %.¹⁰⁷

Betrachtet man das Verhalten der Tiere, ergibt sich ein uneinheitliches Bild. Im Hamster scheinen zumindest zwei Klassen von Bittersubstanzen zu existieren. Eine erlernte Aversion gegenüber einer Substanz aus der Klasse der „nichtionischen“ Bitterstoffe (Saccharoseoctaacetat, Koffein) führt zu Aversionen gegenüber anderen Substanzen dieser Klasse, aber nicht zu einer Aversion gegenüber den „ionischen“ Bitterstoffen Chinin, Denatonium oder Magnesiumsulfat.^{105,108} Vergleichbares wurde für andere Spezies allerdings nicht berichtet. Spector und Kopka zeigen, dass Chinin und Denatonium von Ratten nicht unterschieden werden können, und weisen auf Schwierigkeiten hin, denen man bei der Aufklärung der Bitterdiskriminierung mithilfe von Verhaltensexperimenten begegnet. Die Aktivierung von Rezeptoren anderer Qualitäten sowie Unterschiede in der Intensität, im zeitlichen Verlauf oder dem Ort der Wahrnehmung können im Verhaltensexperiment eine Diskriminierung zweier Stimuli erlauben.¹⁰⁹ Um zweifelsfrei zu klären, dass es der Bittergeschmack ist, der die Tiere zur Unterscheidung befähigt, müssen auch nichtgustatorische Einflüsse wie Geruch und trigeminale Wahrnehmung ausgeschlossen werden.

¹⁰¹J. I. Glendinning, A. Davis und M. Rai, *J Neurosci* 26 (2006), Nr. 35, S. 8900–8908.

³²E. Adler u. a., *Cell* 100 (2000), Nr. 6, S. 693–702.

³⁶M. Behrens und W. Meyerhof, *Results Probl Cell Differ* 47 (2009), S. 203–220.

¹⁰²A. Caicedo und S. D. Roper, *Science* 291 (2001), Nr. 5508, S. 1557–1560.

¹⁰³M. Dahl, R. P. Erickson und S. A. Simon, *Brain Res* 756 (1997), Nr. 1–2, S. 22–34.

¹⁰⁴V. Danilova und G. Hellekant, *BMC Neurosci* 4 (2003), S. 5.

¹⁰⁵T. P. Hettinger, B. K. Formaker und M. E. Frank, *Behav Brain Res* 180 (2007), Nr. 1, S. 4–17.

¹⁰⁶C. Y. Chan, J. E. Yoo und S. P. Travers, *Chem Senses* 29 (2004), Nr. 7, S. 573–581.

¹⁰⁷X. Chen u. a., *Science* 333 (2011), Nr. 6047, S. 1262–1266.

¹⁰⁸M. E. Frank u. a., *Physiol Behav* 80 (2004), Nr. 4, S. 421–431.

¹⁰⁹A. C. Spector und S. L. Kopka, *J Neurosci* 22 (2002), Nr. 5, S. 1937–1941.

Dies ist besonders wichtig, da viele Bitterstoffe pharmakologisch aktiv sind und in die Signalwege von Zellen eingreifen, ohne dass Bitterrezeptoren daran beteiligt sind.¹¹⁰ So kann Koffein beispielsweise über Hemmung der Phosphodiesterase oder Aktivierung von Adenosinrezeptoren vom A₂-Typ zu einem erhöhten Spiegel von zyklischem Adenosinmonophosphat, einem *Second messenger* führen.

Bislang gibt es also nur einzelne Hinweise für unterschiedliche Reaktivität zentraler Neurone gegenüber Bitterstimuli. Klare Populationen von bitterresponsiven Zellen, die die Grundlage für ein differenziertes Verhalten gegenüber Bittersubstanzen sein könnten, sind nicht bekannt. Da jedoch sowohl die Rezeptorzellen als auch die Fasern, die die Information ins Gehirn weiterleiten, auf verschiedene Bitterstimuli unterschiedlich stark reagieren, scheint die Voraussetzung für die Diskriminierung von Bitterstoffen im Gehirn gegeben zu sein.

1.3 Immediate-early-Gene als Werkzeuge in der Neurowissenschaft

Immediate-early-Gene (IEGs, zu deutsch etwa unmittelbare, frühe Gene) werden als Reaktion auf einen extra- oder intrazellulären Stimulus innerhalb kurzer Zeit, in der Regel binnen weniger Minuten, und nur vorübergehend exprimiert.^{111–113} Bei diesen Stimuli kann es sich beispielsweise um Bindung von Signalmolekülen an ihre Rezeptoren oder um elektrische Erregung der Zelle handeln. Die Expression der IEGs wird dann über *Second messenger*, bspw. Ca²⁺, Proteinkinasen und konstitutive regulatorische Transkriptionsfaktoren, wie etwa das *cAMP response element-binding protein* (CREB), angestoßen.¹¹⁴ Die Expression von IEGs ist unabhängig von *De-novo*-Proteinsynthese, sie stellen somit die erste Welle der signalgesteuerten Gene dar.^{111–113} Im Nervensystem vermitteln IEGs unter anderem eine schnelle Komponente der neuronalen Plastizität und sind so an Lernprozessen und der Gedächtnisbildung beteiligt.¹¹³

Die ersten *Immediate-early*-Gene, darunter *Fos*, *Jun* und *Myc*, wurden in den 1980er-Jahren entdeckt und gehören zur Gruppe der Protoonkogene. Sie fungieren ihrerseits als Transkriptionsfaktoren und stoßen eine zweite Welle spezifischer Genexpression an, die es der Zelle erlaubt, auf den Stimulus zu reagieren.^{111,113} Mit der Zeit wurden weitere Transkriptionsfaktoren identifiziert, die ebenfalls durch IEGs kodiert werden. Ein bekanntes Beispiel ist die *Early-growth-response*-Genfamilie, die aus *Egr1* (auch bekannt als *Zif268*) bis *Egr4* besteht. Die *Egr*-Gene werden häufig in denselben Neuronen induziert wie *Fos*.^{113,115} Heute sind mehrere hundert *Immediate-early*-Gene bekannt, aber nur ein geringer Teil ist gut charakterisiert.^{113,116}

Erst in den 1990er-Jahren wurden IEGs identifiziert, die selbst als Effektorproteine ihre Wirkung entfalten.¹¹⁴ Diese sogenannten Effektor-IEGs kodieren beispielsweise für Wachstumsfaktoren, wie der *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), Enzyme, wie Cyclooxygenase-2, oder Proteine, die an der synaptischen Übertragung beteiligt sind, wie Homer1a und das *activity-regulated cytoskeleton-associated protein* (Arc).

Bald nach der Entdeckung begann man, Fos als Marker für neuronale Aktivierung einzusetzen.¹¹⁷ Heute gehören zusätzlich Egr-1, Homer1a und Arc zum Repertoire der neuronalen Aktivitätsmarker, die unter anderem in der Lern- und Gedächtnisforschung und in verschiedenen Sinnessystemen eingesetzt werden.^{114,118–120}

¹¹⁰B. Lindemann, *Nature* 413 (2001), Nr. 6852, S. 219–225.

¹¹¹M. Sheng und M. E. Greenberg, *Neuron* 4 (1990), Nr. 4, S. 477–485.

¹¹²T. Fowler, R. Sen und A. L. Roy, *Mol Cell* 44 (2011), Nr. 3, S. 348–360.

¹¹³B. Perez-Cadahia, B. Drobic und J. R. Davie, *Biochem Cell Biol* 89 (2011), Nr. 1, S. 61–73.

¹¹⁴J. F. Guzowski, *Hippocampus* 12 (2002), Nr. 1, S. 86–104.

¹¹⁵A. M. Beckmann und P. A. Wilce, *Neurochem Int* 31 (1997), Nr. 4, S. 477–510, 477–510.

¹¹⁶E. Nedivi u. a., *Nature* 363 (1993), Nr. 6431, S. 718–722.

¹¹⁷S. P. Hunt, A. Pini und G. Evan, *Nature* 328 (1987), Nr. 6131, S. 632–634.

¹¹⁸J. F. Guzowski u. a., *Curr Opin Neurobiol* 15 (2005), Nr. 5, S. 599–606.

¹¹⁹K. J. Kovacs, *J Neuroendocrinol* 20 (2008), Nr. 6, S. 665–672.

¹²⁰J. D. Shepherd und M. F. Bear, *Nat Neurosci* 14 (2011), Nr. 3, S. 279–284.

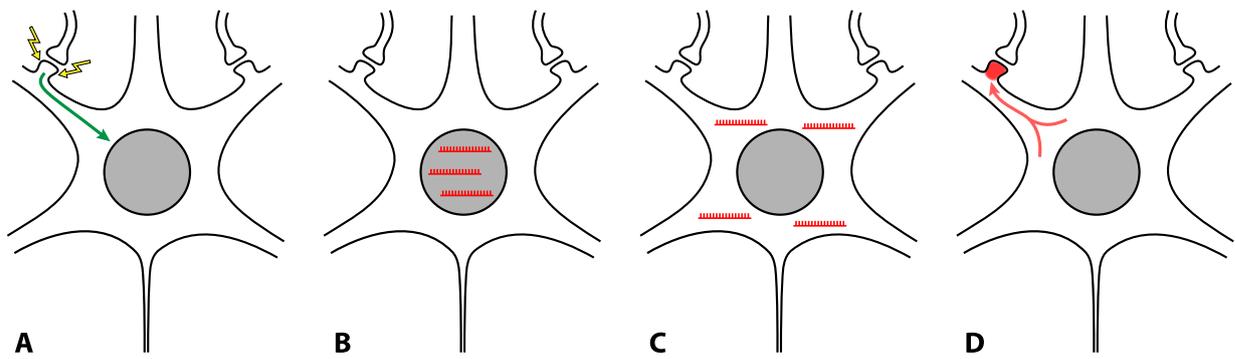


Abbildung 1.3: Zeitliches Muster der Arc-RNA-Verteilung. **A:** Hochfrequente Aktivierung eines Neurons löst Arc-Expression im Zellkern aus. **B:** Innerhalb weniger Minuten ist die Arc-RNA (rot) im Zellkern nachweisbar. **C:** Etwa 30 Minuten nach der Aktivierung ist die Arc-RNA ausschließlich im Zytoplasma um den Zellkern nachweisbar. **D:** Die Arc-RNA wird zu den Synapsen transportiert, die zuvor aktiv waren, und lokal translatiert.

1.3.1 Das *Immediate-early-Gen* Arc

Das *activity-regulated cytoskeleton-associated protein* (Arc) ist das Produkt des gleichnamigen *Immediate-early-Gen*s Arc. Es wurde 1995 parallel in den Laboren von Dietmar Kuhl und Paul Worley nach hochfrequenter Stimulation des Hippocampus entdeckt.^{121,122} Link *et al.* taufte das Gen *activity-regulated gene 3.1* (Arg3.1). Beide Bezeichnungen sind gebräuchlich, in dieser Arbeit wird jedoch ausschließlich der von Lyford *et al.* gewählte Name Arc verwendet.

In Mausembryonen wird Arc ubiquitär exprimiert und ist in der Embryogenese involviert.¹²³ Im adulten Tier hingegen beschränkt sich die Arc-Expression auf den Hoden und das Gehirn.^{120,a} Die Arc-Expression in Neuronen wird durch hochfrequente Stimulation hervorgerufen (vgl. Abb. 1.3). Der genaue Mechanismus der Arc-Induktion ist noch nicht bekannt. Es scheinen jedoch mehrere Signalwege möglich, bei denen Proteinkinasen, Ca²⁺ und die Transkriptionsfaktoren *serum response factor* (SRF), *myocyte enhancer factor 2* (MEF2) und CREB beteiligt sind.¹²⁰ Innerhalb weniger Minuten nach dem Stimulus ist Arc-RNA im Nukleus nachweisbar. Typischerweise tritt die RNA punktförmig an ein oder zwei Stellen im Nukleus auf, die die Orte der Transkription darstellen.¹¹⁴ Nach einigen Minuten kommt es zum Transport der Arc-RNA aus dem Nukleus ins Zytoplasma. 30 Minuten nach dem Stimulus ist die Arc-RNA ausschließlich im Zytoplasma nachweisbar. Nach 60 Minuten ist auch die Arc-RNA im Zytoplasma des Perikaryons wieder auf das Ursprungsniveau abgesunken.¹²⁴ Die Arc-RNA wird in die Dendriten transportiert und reichert sich an jenen Synapsen an, die kürzlich aktiv waren.^{125,126} Dort kommt es zur lokalen Translation. Das Arc-Protein ist in der postsynaptischen Dichte mit dem NMDA-Rezeptorkomplex assoziiert.¹²⁰

Arc ist an verschiedenen Prozessen der synaptischen Plastizität beteiligt, die die zelluläre Grundlage für Lernprozesse darstellen. Der Großteil der Literatur beschäftigt sich mit der Rolle von Arc bei der Ausbildung von Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD) im Hippocampus, die essentielle Bestandteile von Lernen und Gedächtnisbildung sind.¹²⁰ Auch im Cerebellum ist Arc an der Ausbildung von LTD beteiligt.¹²⁷ Arc-Expression wurde außerdem in anderen Regionen des Großhirns

¹²¹ G. L. Lyford u. a., *Neuron* 14 (1995), Nr. 2, S. 433–445.

¹²² W. Link u. a., *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995), Nr. 12, S. 5734–5738.

¹²³ D. Liu u. a., *Mech Dev* 92 (2000), Nr. 2, S. 207–215.

¹²⁴ J. F. Guzowski u. a., *Nat Neurosci* 2 (1999), Nr. 12, S. 1120–1124.

¹²⁵ O. Steward u. a., *Neuron* 21 (1998), Nr. 4, S. 741–751.

¹²⁶ D. E. Moga u. a., *Neuroscience* 125 (2004), Nr. 1, S. 7–11.

¹²⁷ C. Smith-Hicks u. a., *Nat Neurosci* 13 (2010), Nr. 9, S. 1082–1089.

^a<http://biogps.org/#goto=genereport&id=11838>

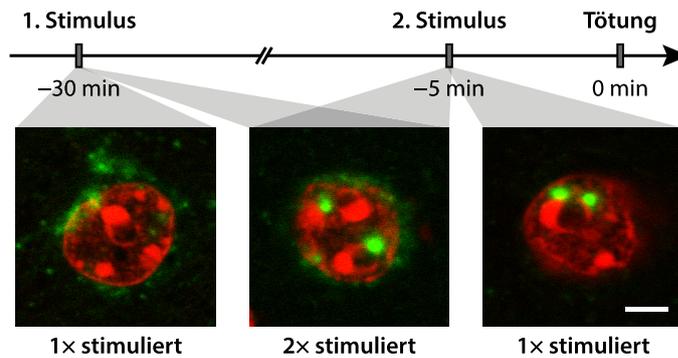


Abbildung 1.4: Die Arc-catFISH-Methode. Zwei Stimuli werden in geeignetem zeitlichen Abstand appliziert. Die intrazelluläre Verteilung der Arc-RNA (grün) gibt Aufschluss, durch welchen der Stimuli eine Zelle aktiviert wurde. Tritt Arc-RNA nur im Zytoplasma oder Nukleus (rot) auf, führte nur der erste bzw. zweite Stimulus zur Arc-Expression. Tritt Arc-RNA hingegen in beiden Kompartimenten auf, wurde die Zelle durch beide Stimuli zur Arc-Expression angeregt. Maßstab 5 µm

beschrieben, wie der Amygdala, wo es eine Rolle bei Angstkonditionierung spielt,¹²⁰ oder sensorischen Cortices, wo Arc durch Stimulation, insbesondere durch neuartige Reize, induziert wird.^{128–132}

1.3.2 Die Arc-catFISH-Methode

Arc war das erste IEG, bei dem der Transport der RNA aus dem Perikaryon in die Dendriten beschrieben wurde.^{121,122} Dadurch zeigt die *Arc*-RNA eine charakteristische Verteilung innerhalb der Zelle, die sich mit der Zeit verändert, die seit Aktivierung des Neurons vergangen ist (s. Abb. 1.3). In den ersten Minuten ist die *Arc*-RNA ausschließlich im Nukleus nachweisbar, während sie nach 30 Minuten ausschließlich im Zytoplasma zu beobachten ist. Daher erlaubt die Verteilung der *Arc*-RNA innerhalb des Neurons Rückschlüsse, zu welchem Zeitpunkt das Neuron aktiv war. Dies haben sich Guzowski und Kollegen zunutze gemacht und ein Experiment entworfen, bei dem Tiere zweimal stimuliert werden. Die Stimulationszeitpunkte wurden so gewählt, dass die jeweils induzierte *Arc*-Expression nur in einem Kompartiment, also entweder im Nukleus oder im Zytoplasma auftrat (s. Abb. 1.4). So kann die durch den jeweiligen Stimulus induzierte *Arc*-RNA unterschieden und hergeleitet werden, durch welchen der beiden Stimuli eine Zelle aktiviert wurde.¹²⁴ Das bemerkenswerte an dieser Methode ist, dass die RNA nur eines Gens Aufschluss gibt, welcher von zwei Stimuli dieselbe Zelle aktivierte.

Der Nachweis der *Arc*-RNA erfolgt mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung. So lassen sich rasch große Mengen von Neuronen untersuchen. Die Methode ist als *Arc catFISH (cellular compartment analysis of temporal activity by fluorescent in situ hybridization)* bekannt und wurde bislang vor allem in Strukturen des Großhirns eingesetzt. Die meisten Experimente wurden in Hippocampus und Amygdala durchgeführt, aber auch in sensorischen Cortices.^{124,132–135}

Mittlerweile wurden mehrere Varianten der catFISH-Methode beschrieben. Eine Variante beruht auf der Expression der zwei *Immediate-early*-Gene *Arc* und *Homer1a*. Da das *Homer1a*-Transkript mit etwa 45 kb mehr als zehnmals so lang ist wie das *Arc*-Transkript (ca. 3,5 kb), ist es bei Verwendung einer Sonde, die mit dem 3'-untranslatierten-Bereich hybridisiert, erst nach etwa 25 Minuten im Nukleus

¹²⁸M. Montag-Sallaz und N. Buonviso, *J Neurobiol* 52 (2002), Nr. 1, S. 61–72.

¹²⁹M. Montag-Sallaz und D. Montag, *Learn Memory* 10 (2003), Nr. 2, S. 99–107.

¹³⁰M. P. Saddoris, P. C. Holland und M. Gallagher, *J Neurosci* 29 (2009), Nr. 49, S. 15386–15396.

¹³¹C. L. McCurry u. a., *Nat Neurosci* 13 (2010), Nr. 4, S. 450–457.

¹³²E. P. Carpenter-Hyland u. a., *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010), Nr. 33, S. 14828–14832.

¹³³A. Vazdarjanova und J. F. Guzowski, *J Neurosci* 24 (2004), Nr. 29, S. 6489–6496.

¹³⁴S. K. Barot u. a., *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008), Nr. 52, S. 20959–20963.

¹³⁵B. Desgranges u. a., *PLoS One* 5 (2010), Nr. 4, e10097.

nachweisbar.^{133,136} So ist die Untersuchung der Zellantwort auf zwei Stimuli ausschließlich anhand des konzentrierten Auftretens der RNA dieser beiden IEGs im Zellkern möglich. RNA, die bereits ins Zytoplasma transportiert wurde, muss nicht mehr zur Auswertung herangezogen werden. Dies erleichtert die Zuordnung insbesondere in Regionen mit hoher Dichte kleiner Zellen, wie dem Hippocampus, und vereinfacht eine automatisierte Auswertung.¹³⁶ Die Voraussetzung für diese Methode ist, dass in der zu untersuchenden Hirnregion dieselben Stimuli sowohl *Arc*- als auch *Homer1a*-Expression induzieren. Zudem ist der methodische Aufwand etwas höher, da eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit zwei RNA-Sonden und getrennten Detektionsmechanismen durchgeführt werden muss. Eine zweite Variante beruht auf dem RNA-Nachweis des IEGs *Fos*, das in vielen Hirnregionen als Aktivitätsmarker eingesetzt wird. *Fos*-RNA zeigt einen ähnlichen zeitlichen Verlauf der Lokalisierung wie *Arc*-RNA. Die Verwendung einer zweiten RNA-Sonde, die mit intronischen Sequenzen des *Fos*-Transkripts hybridisiert, erleichtert die Unterscheidung von prä-mRNA und gespleißter RNA.¹³⁷ Die Idee, den zeitlichen Verlauf der Genexpression zur Untersuchung der Zellaktivierung durch zwei Stimuli auszunutzen, wurde bereits zwei Jahre vor Publikation der *Arc*-catFISH-Methode umgesetzt. Eine Kombination aus *In-situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie wurde genutzt, um die RNA und das Protein von *Egr1* im visuellen Cortex nachzuweisen.¹³⁸

1.4 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Verarbeitung von Geschmacksinformation mithilfe eines neuen experimentellen Ansatzes zu untersuchen. Die bisherigen Experimente haben auf der einen Seite zu einer sehr detaillierten Charakterisierung der einzelnen geschmacksverarbeitenden Neuronen geführt und auf der anderen Seite ihre Lokalisierung und Verschaltung offenbart. Wie in Abschnitt 1.2 dargestellt, haben jedoch die bislang eingesetzten Techniken entscheidende Nachteile. Die detaillierte elektrophysiologische Charakterisierung ist nur anhand weniger Neurone im selben Tier möglich, während man bei der Nutzung von *Fos* als Aktivitätsmarker auf einen Stimulus beschränkt ist. Wichtige Fragestellungen, wie die Verarbeitung der Geschmacksinformation über die große Anzahl der strukturell diversen Bitterstoffe auf zellulärer Ebene, sind vermutlich auch in Ermangelung geeigneter Methoden bislang nicht hinreichend beantwortet worden (s. Abschnitt 1.2.1).

Im Zuge dieser Arbeit soll die *Arc*-catFISH-Methode (s. Abschnitt 1.3.2) für das Geschmackssystem etabliert werden. Diese Methode erlaubt die rasche Untersuchung der Antwort großer Zellpopulationen auf zwei Stimuli. Dadurch lassen sich die Nachteile der bislang eingesetzten Methoden umgehen und ihre Vorteile verbinden. Zunächst soll die *Arc*-Expression in der ersten Station der Geschmacksverarbeitung im Gehirn, dem *Nucleus tractus solitarii* (NTS), nach Stimulation mit verschiedenen Geschmacksstoffen untersucht werden. Anschließend soll die *Arc*-catFISH-Methode zum Einsatz kommen. Hierzu wird die Maus als Modellorganismus eingesetzt, deren Geschmackssystem dem des Menschen stark ähnelt. Mäuse werden zu zwei Zeitpunkten mit Geschmacksstoffen stimuliert. Entweder wird dabei zweimal derselbe oder zwei unterschiedliche Geschmacksstoffe eingesetzt. Die resultierenden Aktivierungsmuster sollen Aufschluss über die zelluläre Verarbeitung der Geschmacksinformation geben.

Bei diesen Experimenten gilt ein besonderes Augenmerk der Verarbeitung von Information über bitter schmeckende Substanzen und der Frage nach einer zellulären Grundlage für deren mögliche Diskriminierung. Bei der Auswertung der *Arc*-catFISH-Experimente sind zwei Fälle denkbar. Wenn keine Unterscheidung von Bitterstoffen möglich ist, sollten die gleichen Zellen aktiviert werden, unabhängig davon, ob zwei unterschiedliche oder derselbe Bitterstoff zu beiden Zeitpunkten appliziert wurde. Falls bei Stimulation mit zwei verschiedenen Bitterstoffen jedoch insgesamt mehr Zellen aktiviert werden, darunter aber weniger durch beide Stimuli, würde dies für die Möglichkeit der Diskriminierung der

¹³⁶ A. Vazdarjanova u. a., *J Neurosci* 22 (2002), Nr. 23, S. 10067–10071.

¹³⁷ D. Lin u. a., *Nature* 470 (2011), Nr. 7333, S. 221–226.

¹³⁸ A. Chaudhuri u. a., *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), Nr. 6, S. 2671–2675.

betreffenden Bitterstoffe sprechen. Solche funktionell getrennten Populationen von bitterverarbeitenden Zellen könnten die Grundlage für divergentes Verhalten gegenüber verschiedenen Bitterstoffen darstellen. Um die Funktion der *Arc* exprimierenden Zellen abzuschätzen, soll zudem deren Lage innerhalb des NTS herangezogen werden. Wie in Abschnitt 1.1.3 dargestellt, handelt es sich bei der ersten Station der Geschmacksverarbeitung um einen komplexen und vielseitigen Hirnnervenkern.

2 Material

Dieser Abschnitt enthält die verwendeten Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien. Materialien und Geräte, die zur Grundausstattung eines molekularbiologischen Labors gehören, sind nicht explizit aufgeführt.

2.1 Geräte

Tabelle 2.1: Geräte

Gerät	Hersteller
Automatisiertes Mikroskop Mirax MIDI	Carl Zeiss Microscopy, Jena
Färbeautomat Shandon Varistain 24-4	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Fluoreszenzmikroskop AxioPlan 1	Carl Zeiss Microscopy, Jena
Geldokumentationsanlage GeneGenius	Synoptics, Cambridge, UK
konfokales Laserscanningmikroskop LCS SP2	Leica Microsystems, Wetzlar
Kryomikrotom HM 560 CryoStar	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
pH-Meter HI 9024	HANNA Instruments, Kehl am Rhein
pH-Meter Lab 850	SI Analytics, Mainz
Spannungsquelle für Elektrophorese	BioRad, München
Spannungsquelle für Elektrophorese EPS 601	BioRad, München
Spektralphotometer NanoDrop ND-1000	NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler PTC-200	MJ Research, Waltham, MA, USA
Thermocycler TProfessional	Biometra, München
Thermocycler TProfessional Basic	Biometra, München
TissueLyser II	Qiagen, Hilden
Pipettierroboter Freedom EVO 150	Tecan, Crailsheim
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Wasserbad 1003	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Wasserbad OLS200	Grant Instruments, Shepreth, UK
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg

2.2 Software

Tabelle 2.2: Software

Programm	Hersteller
GeneSnap 6.01	Synoptics, Cambridge, UK
ImageJ	Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MD, USA
Leica Confocal Software 2.61	Leica Microsystems, Wetzlar
Excel 2010, 2013	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
MIRAX Scan 1.12	Carl Zeiss Microscopy, Jena
MIRAX Viewer 1.12	Carl Zeiss Microscopy, Jena
Photoshop CS3, CS6	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
SigmaPlot 11.0	Systat Software, Erkrath
Tecan EVOware 2.3, 2.5	Tecan, Crailsheim
Venn Diagram Plotter 1.5	Kyle Littlefield, Matthew Monroe, PNNL, Richland, WA, USA

2.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.3: Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Substanz (Kurzbezeichnung)	Reinheitsgrad	Hersteller	Katalognr.
Agarose, UltraPure		Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt	16500500
Agarose, Wide Range		SERVA, Heidelberg	11406
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	<i>BioUltra, for molecular biology, ≥99,5 %</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim	09718
Blockierreagens (BR)		Roche Applied Science, Mannheim	11096176
5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP), 50 mg·ml ⁻¹ in Dimethylformamid	>95 %	Roche Applied Science, Mannheim	11383221
Bromphenolblau, Natriumsalz		USB Corp., Cleveland, OH, USA	12370
Chloroform	p. a., EMSURE	Merck KGaA, Darmstadt	1.02445
Daily System Clean		LVL technologies, Crailsheim	2001
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	<i>ReagentPlus, ≥99 %</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim	S0876
Dimethylsulfoxid (DMSO)	BioUltra, ≥99,5 %	Sigma-Aldrich, Steinheim	41639
DNA-Größenstandard „GeneRuler DNA Ladder Mix“		Fermentas, St.-Leon-Rot	SM0331
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	≥99 %	Fermentas, St.-Leon-Rot	R0181
Elektroisolierband		Carl Roth, Karlsruhe	1256.1
Essigsäure	reinst	Carl Roth, Karlsruhe	6755.1
Essigsäureanhydrid	puriss. p. a., <i>ACS reagent ≥99,0 %</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim	45830
Ethanol (EtOH)	p. a., EMSURE	Merck KGaA, Darmstadt	1.00983
Ethidiumbromid, wässrig, 10 mg·ml ⁻¹ (EtBr)	BioReagent	Sigma-Aldrich, Steinheim	E1510
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz, Dihydrat (Na ₂ H ₂ EDTA · 2 H ₂ O)	<i>ACS reagent, 99,0–101,0 %</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim	E4884
Fluorescein-Avidin-D, 5 mg·ml ⁻¹		Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA	A-2001
Fluorescent Mounting Medium		Dako, Hamburg	S302380-2
Formalin, wässrig, ≥36 %	BioReagent	Sigma-Aldrich, Steinheim	47608
Formamid		Roche Applied Science, Mannheim	1814320
High Pure PCR Product Purification Kit		Roche Applied Science, Mannheim	11732668
<i>In Situ Hybridization Buffer</i>		Ambion, Life Technologies, Darmstadt	B8807G
Iodacetamid	SigmaUltra, ≥99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim	I1149
Kaliumchlorid (KCl)	<i>ReagentPlus, ≥99 %</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim	P4504
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	<i>ReagentPlus</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim	P5379
Lammserum		Gibco, Life Technologies, Darmstadt	16070-096
Levamisol	≥99 % (GC)	Sigma-Aldrich, Steinheim	L9756
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ · 6 H ₂ O)	p. a., EMSURE	Merck KGaA, Darmstadt	1.05833
Maleinsäure	<i>ReagentPlus</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim	M0375
Methanol (MeOH)	p. a., EMSURE	Merck KGaA, Darmstadt	1.06009
2-Methylbutan	zur Synthese, ≥99 %	Carl Roth, Karlsruhe	3927.1
Minipax-Silikagel-Trockenpäckchen, 10 g		Sigma-Aldrich, Steinheim	Z163597

Tabelle wird fortgesetzt ...

Tabelle 2.3: Chemikalien und Verbrauchsmaterial (Fortsetzung)

Substanz (Kurzbezeichnung)	Reinheitsgrad	Hersteller	Katalognr.
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	≥99 %	Carl Roth, Karlsruhe	6979.4
Natriumacetat, wasserfrei (NaAc)	p. a., EMSURE	Merck KGaA, Darmstadt	1.06268
Natriumchlorid (NaCl)	<i>BioUltra, for molecular biology,</i> ≥99,5 %	Sigma-Aldrich, Steinheim	71376
Natriumcitrat, Dihydrat (Na-Citrat · 2 H ₂ O)	≥98 %	Sigma-Aldrich, Steinheim	C7254
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	p. a., EMSURE	Merck KGaA, Darmstadt	1.06329
Natriumhydroxid (NaOH)	rein, >97,0 %	Merck KGaA, Darmstadt	1.06462
Neutravidin-Alkalische-Phosphatase		Thermo Fisher Scientific, Dreieich	31002
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT), 100 mg·ml ⁻¹ in 70 % Dimethylformamid	>95 %	Roche Applied Science, Mannheim	11383213
Objektträger SuperFrost Plus		Carl Roth, Karlsruhe	H867.1
Paraformaldehyd (PFA)	Reagent Grade	Sigma-Aldrich, Steinheim	P6148
PCRx Enhancer System		Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt	11495-017
Polysorbat 20 (Tween 20)		Fisher Scientific, Schwerte	BP337
2-Propanol	p. a., EMSURE	Merck KGaA, Darmstadt	1.09634
QIAquick Gel Extraction Kit		Qiagen, Hilden	28704
Random Primers		Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt	48190-011
RNA-Größenstandard „Ribo-Ruler High Range RNA Ladder“		Fermentas, St.-Leon-Rot	SM1821
Salzsäure, rauchend, 37 %	p. a.	Carl Roth, Karlsruhe	X942.1
Set Up Clean		LVL technologies, Crailsheim	2000
TO-PRO-3 Iodid, 1 mM in DMSO		Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt	T3605
Triethanolamin (TEA)	<i>BioChemika,</i> ≥99,0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim	90279
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	≥99,9 %	Sigma-Aldrich, Steinheim	T1503
TRIZol Reagent		Ambion, Life Technologies, Darmstadt	15596-018
TSA Biotin System		PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim	NEL700001KT
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30 % (w/w)	<i>ACS reagent</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim	216763

2.4 Enzyme

Tabelle 2.4: Enzyme

Enzym	Hersteller	Katalognr.
Desoxyribonuklease I, <i>Amplification Grade</i>	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt	18068-015
<i>Pfu</i> -Polymerase	Promega, Mannheim	M7741
Proteinase K, rekombinant, aus <i>Pichia pastoris</i> , <i>PCR Grade</i>	Roche Applied Science, Mannheim	3115828
Reverse Transkriptase SuperScript II	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt	18064-014
Ribonuklease-Inhibitor RiboLock	Fermentas, St.-Leon-Rot	EO0381
T3-RNA-Polymerase	Roche Applied Science, Mannheim	11031163001
T7-RNA-Polymerase	Roche Applied Science, Mannheim	10881767001
TURBO DNase	Ambion, Life Technologies, Darmstadt	AM2238

2.5 Antikörper

Tabelle 2.5: Antikörper

Epitop	Ursprung	Typ	Hersteller	Katalognr.
Digoxigenin	Schaf, polyklonal	Fab	Roche Applied Science, Mannheim	1207733

2.6 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg lyophilisiert bezogen. Sie wurden in deionisiertem, UV-bestrahltem Wasser zu einer Endkonzentration von 100 μM gelöst und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tabelle 2.6: Oligonukleotide, die für die Generierung der RNA-Sonden genutzt wurden. Die Sequenz des T3- bzw. T7-Promotors ist fett gedruckt.

Bezeichnung	Sequenz
T3-Arc ABA fw	AATTAACCCCTCACTAAAGGGT GGAAGAGTACCTGCGGC
T7-Arc ABA rv	TAATACGACTCACTATAGGG ACCCAAAGAGCCCTGGAC

2.7 Geschmacksstimuli

Tabelle 2.7: Geschmacksstimuli

Geschmacksqualität	Substanz (Abkürzung)	Referenz
Kontrollstimulus Standard	25 mM KCl, 0,25 mM NaHCO ₃	[139]
	0,1 M Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	[86, 104, 140]
umami	0,1 M Natriumglutamat (NaGlu)	[86, 140]
	1 M Natriumglutamat, 0,5 mM IMP, 30 μM Amilorid	[140]
süß	0,5 M Saccharose (Sucr)	[104]
	1 M Saccharose	
	1,5 M Saccharose	
salzig	0,1 M Natriumchlorid (NaCl niedrig)	[86, 140, 141]
	0,8 M Natriumchlorid (NaCl hoch)	[141]
sauer	0,03 M Citronensäure (Citr)	[84]
	0,1 M Citronensäure	[57, 140]
bitter	0,5 mM Cycloheximid (Cyx)	[104, 140]
	10 mM Chininhydrochlorid (Qui)	[103, 104, 140, 142]
	1 mM Cucurbitacin I (Cuc)	

2.8 Lösungen und Puffer

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Lösungen mit deionisiertem Wasser hergestellt (Leitfähigkeit maximal $0,06\ \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Auf die Zugabe von Diethylpyrocarbonat (DEPC) zu den Lösungen zur Inaktivierung von Ribonukleasen (RNasen) wurde verzichtet. Stattdessen wurden die verwendeten

Gefäße entweder bei 200 °C mindestens zwei Stunden sterilisiert oder – im Falle von temperaturempfindlichen Materialien – die Oberflächen mit RNase-AWAY-Lösung behandelt. Flaschen, die für die Zubereitung und Aufbewahrung von Lösungen für RNase-sensible Methoden gedacht waren, wurden in regelmäßigen Abständen mit DEPC behandelt. Soweit nicht anders angegeben wurden die Lösungen bei Raumtemperatur gelagert.

2.8.1 Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer), 50×

2 M Tris-Base
1 M Essigsäure
1/10 Volumen 0,5 M EDTA, pH 8

Laufpuffer für denaturierende RNA-Gele

1/10 Volumen 10× MOPS-Puffer
0,67 % Formaldehyd

MOPS-Puffer für denaturierende RNA-Gele, 10×

0,2 M MOPS
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA
pH 7,0
autoklavieren
bei 4 °C lagern

Ladepuffer für Agarosegelelektrophorese, 6×

60 % Glycerol
60 mM EDTA
10 mM Tris-HCl, pH 7,6
0,03 % Bromphenolblau
0,03 % Xylencyanol
bei –20 °C lagern

2.8.2 Lösungen für die Vorbehandlung

4 % PFA in PBS

PFA bei ca. 65 °C in 0,2 mM NaOH lösen
1/10 Volumen 10× PBS zugeben
pH 7,4 einstellen
frisch herstellen

Triethanolaminpuffer

0,1 M Triethanolamin
pH 8 mit HCl einstellen
frisch herstellen

2.8.3 Lösungen für die *In-situ*-Hybridisierung

Die im Pipettierautomaten genutzten wässrigen Lösungen wurden mithilfe der hier aufgeführten Stammlösungen angesetzt. Zur Herabsetzung der Oberflächenspannung wurde allen wässrigen Lösungen 0,05 % Tween-20 zugesetzt. Einzige Ausnahme war der Hybridisierungspuffer, der als fertiges Produkt erworben wurde. Außerdem wurden die im Pipettierautomaten eingesetzten Lösungen – mit wenigen Ausnahmen – vor ihrer Bereitstellung durch Anlegen eines Vakuums entgast. Hierdurch sollte die Bildung von Gasblasen unter dem Glasdeckel durch Austreten von in den Flüssigkeiten gelösten Gasen vermieden werden. Lösungen, die nicht entgast wurden, waren 0,6 % H₂O₂ in Methanol, Hybridisierungspuffer, Tyramid-Biotin in *Amplification Diluent* sowie die Systemflüssigkeit, die im letzten Waschschrift eingesetzt wurde.

PBS (*phosphate-buffered saline*), 10×

0,1 M Na₂HPO₄
17,64 mM KH₂PO₄
26,83 mM KCl
1,369 M NaCl
pH 7,4
autoklavieren

Proteinase-K-Puffer, 2×

0,1 M Tris-Base
10 mM Na₂H₂EDTA · 2 H₂O
pH 8 (HCl)
autoklavieren

2 Material

SSC (saline sodium citrate), 20×

0,3 M Natriumcitrat
3 M NaCl
pH 7
autoklavieren

TN (Tris-NaCl-Puffer), 10×

1 M Tris-Base
1,5 M NaCl
pH 7,4
autoklavieren

NTE (NaCl-Tris-EDTA-Puffer), 5×

2,5 M NaCl
50 mM Tris-Base
25 mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
pH 8
autoklavieren

MWB (maleate wash buffer)

0,15 M NaCl
0,1 M Maleinsäure
0,2 M NaOH
pH 7,4
bei 4 °C lagern

20 % PFA in PBS

PFA bei ca. 65 °C in 0,2 mM NaOH lösen
 $\frac{1}{10}$ Volumen 10× PBS zugeben
pH 7,4 einstellen
bei -20 °C lagern

4 % PFA in PBS

$\frac{1}{5}$ Volumen 20 % PFA in PBS
 $\frac{1}{10}$ Volumen 10× PBS
mit Wasser auffüllen

TNB (Tris-NaCl-Puffer mit Blockierreagens)

0,5 % Blockierreagens (PerkinElmer) bei ca. 55 °C
in TN lösen
bei -20 °C lagern

BR (Blockierreagens)

1 % Blockierreagens (Roche) bei ca. 55 °C in MWB
lösen
frisch herstellen

2.9 Versuchstiere

Als Versuchstiere kamen 123 männliche Mäuse des Inzuchtstamms C57BL/6 zum Einsatz. Die Tiere wurden bei Société Janvier, Le Genest Saint Isle, Frankreich, Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA oder Harlan Laboratories, Eyrstrup bezogen oder stammten aus eigener Zucht. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Experimente 8–19 Wochen alt und zur Gewöhnung mindestens eine Woche in der Tierhaltung untergebracht.

3 Methoden

Dieser Abschnitt soll einen Überblick über die verwendeten Methoden bieten. Zunächst werden die Schritte bei der Generierung der RNA-Sonde geschildert. Anschließend folgt die Darstellung der Stimulation der Versuchstiere, der Präparation der Gehirne und der Anfertigung der Kryoschnitte. Zuletzt wird die Durchführung und Auswertung der *In-situ*-Hybridisierung erläutert.

3.1 Generierung der RNA-Sonde

Die RNA-Sonde, die in der *In-situ*-Hybridisierung eingesetzt wurde, entspricht 862 Nukleotiden des ersten Exons des *Arc*-Gens (Nukleotide 869–1730, vgl. Ensembl-Datenbank^a). Die Primersequenzen, die für die Generierung genutzt wurden, finden sich in Tabelle 2.6 auf Seite 20. Die Sonden wurden von einem DNA-Stück generiert, das mittels PCR amplifiziert wurde. Die oben genannte Sequenz wurde von Promotoren für die T7- (*antisense*) und T3-RNA-Polymerase (*sense*) flankiert (s. Abb. 3.1).

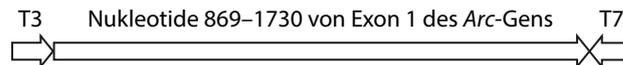


Abbildung 3.1: DNA-Fragment, das als Matrize für die *In-vitro*-Transkription diente. Die Nukleotide 869 bis 1730 des ersten Exons des *Arc*-Gens sind flankiert von den Promotorsequenzen der T3- bzw. T7-RNA-Polymerase (T3 bzw. T7).

Um die Ergebnisse der einzelnen Schritte der Sondengenerierung zu kontrollieren, wurde die Agarosegelelektrophorese genutzt. Handelte es sich um DNA kamen 1%ige Agarosegele mit 1× TAE-Puffer zum Einsatz und die Auftrennung erfolgte bei $12 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ für 25–30 min. Bei RNA wurden denaturierende Gele mit 1,5 % Agarose, 0,67 % Formaldehyd und 1× MOPS-Puffer eingesetzt und etwa 25 min bei $8,4 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ aufgetrennt. Die Zusammensetzung der Puffer findet sich in Abschnitt 2.8.1 auf Seite 21.

3.1.1 RNA-Extraktion

Für die spätere cDNA-Synthese wurde Gesamt-RNA aus Mausgehirn mittels Phenol-Chloroform-Guanidiniumthiocyanat-Methode extrahiert.¹⁴³ Es kam ein fertiges Gemisch (TRIzol) des Herstellers Invitrogen zum Einsatz.

Das Hirngewebe wurde mit 1 ml TRIzol je 100 mg Gewebe mittels TissueLyzer II homogenisiert und anschließend 10 min bei 12 000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform je Milliliter TRIzol, wurde das Gemisch 15 s lang kräftig geschüttelt und anschließend 2–3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Trennung der organischen von der wässrigen Phase wurde das Gemisch 15 min bei 12 000 g und 4 °C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde entnommen und zur Fällung der RNA mit 0,5 ml Isopropanol pro Milliliter TRIzol versetzt. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur folgten 10 min Zentrifugation bei 12 000 g und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und der RNA-Niederschlag mit 1 ml 75 %igem, unvergälltem Ethanol pro Milliliter TRIzol gewaschen. Nach erneutem fünfminütigem Zentrifugieren

¹⁴³P. Chomczynski und N. Sacchi, *Anal Biochem* 162 (1987), Nr. 1, S. 156–159.

^ahttp://apr2013.archive.ensembl.org/Mus_musculus/Transcript/Exons?db=core;g=ENSMUSG00000022602;r=15:74669083-74672570;t=ENSMUST00000110009

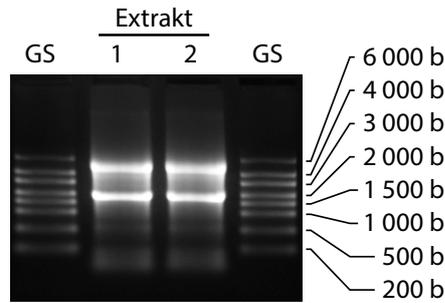


Abbildung 3.2: Zur Kontrolle der extrahierten RNA wurden je 2 μl auf ein denaturierendes 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen. Die intensiven Banden der ribosomalen 28S- und 18S-RNA, die etwa auf Höhe von 4700 bzw 1900 b zu sehen sind, zeigen kaum Zeichen von Degradierung. Auch sind schwache Banden der 5S- und 5,8S-rRNA sichtbar, die unterhalb von 200 b auftreten. Am rechten Rand sind die Fragmentlängen der Banden des Größenstandards in Basen (b) notiert.

bei 7 500 g und 4 °C wurde der Überstand verworfen und der RNA-Niederschlag bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Der getrocknete Niederschlag wurde bei 55–60 °C in deionisiertem Wasser gelöst.

Die Kontrolle der RNA-Extraktion erfolgte durch Auftragen auf ein denaturierendes 1,5 %iges Agarosegel (s. Abb. 3.2). Die Konzentration der extrahierten RNA wurde UV-spektrometrisch bestimmt.

3.1.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mittels der genetisch modifizierten Reversen Transkriptase SuperScript II des Herstellers Invitrogen. Als Ausgangssubstanz kam Gesamt-RNA aus Mausgehirn zum Einsatz.

Um Rest-DNA, die bei der RNA-Extraktion nicht entfernt wurde, zu beseitigen, wurde zunächst ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurden 150 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ der extrahierten RNA, $\frac{1}{10}$ Volumen 10 \times DNase-Puffer, 1 mM DTT, 1,33 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ RiboLock RNase-Inhibitor und 0,067 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ DNase I (Invitrogen) zu einem Ansatz von 15–30 μl vermengt.

Der Ansatz wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurde die DNase durch Zugabe von 2 mM EDTA und Erhitzen auf 68 °C für 15 min inaktiviert. Für die anschließende Reverse Transkription wurden $\frac{2}{3}$ des Reaktionsgemischs abgenommen, mit 12,5 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ Random-Primer versetzt, 5 min bei 72 °C inkubiert und anschließend rasch auf Eis abgekühlt. Der Rest des Reaktionsgemischs wurde mit dem gleichen Volumen deionisiertem, UV-bestrahltem Wasser versetzt und bei –80 °C gelagert. Er diente später als Kontrolle für den Erfolg des DNase-Verdau („–RT“).

Anschließend wurde der Reverse-Transkription-Ansatz ($\frac{2}{3}$ des Ursprungsvolumens des DNase-Verdau) mit $\frac{2}{5}$ des Ursprungsvolumens 5 \times Reverse-Transkriptase-Puffer, dNTPs (je 0,5 μM), 3 mM MgCl_2 , 0,5 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ RiboLock RNase-Inhibitor und 10 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ SuperScript II vermengt. Das Endvolumen betrug $\frac{4}{3}$ des Ursprungsvolumens.

Die Reverse Transkription erfolgte bei 42 °C für 1 h. Zehn Minuten vor Ende wurden erneut 10 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ SuperScript II zugegeben. Schließlich wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 72 °C für 15 min abgestoppt. Für die nachfolgenden PCRs wurden je 1 μl des Reverse-Transkription-Ansatzes („+RT“) und der –RT-Kontrolle eingesetzt.

3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Generierung von Ausgangsmaterial für die *In-vitro*-Transkription wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Als Matrize wurde cDNA aus Mausgehirn eingesetzt. Zunächst wurde in 25- μl -Ansätzen die optimale Temperatur während des *Annealing*-Schritts ermittelt. Hierzu wurde ein PCR-Programm verwendet, bei dem während des *Annealing*-schritts verschiedene Temperaturen in den einzelnen Reaktionsgefäßen vorliegen. Im Falle der *Arc*-spezifischen Primer wurden sechs Temperaturen

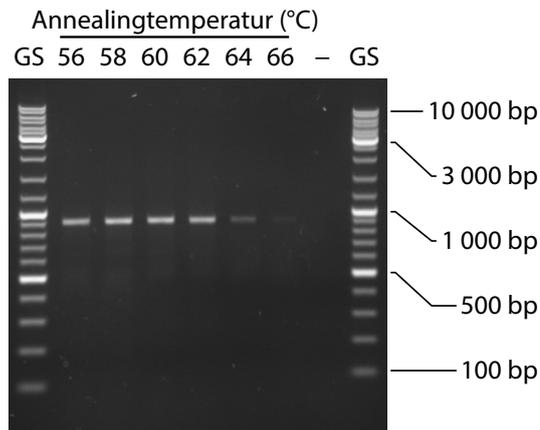


Abbildung 3.3: Zur Ermittlung der optimalen *Annealing*-Temperatur wurde eine PCR mit Temperaturgradient während des *Annealing*-Schritts durchgeführt. Die *Annealing*-Temperaturen sind auf volle Grad gerundet angegeben. Die Ergebnisse wurden zusammen mit DNA-Größenstandard (GS) auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Am rechten Rand sind die Fragmentlängen ausgewählter Banden des Größenstandards in Basenpaaren (bp) notiert. „–“ Kontrolle ohne Zugabe von cDNA

zwischen 56 und 66 °C gewählt, die errechnete Schmelztemperatur der Primer-Matrizen-Hybride lag bei etwa 64 °C (<http://www.sigma-genosys.com/calc/DNACalc.asp>). Als *Annealing*-Temperatur für die folgenden PCRs wurde 58 °C festgelegt, da hier auf dem Agarosegel eine intensive Bande der erwarteten Größe ohne Nebenbanden auftrat (s. Abb. 3.3).

Anschließend erfolgte eine PCR in größerem Maßstab (acht Ansätze à 50 µl), um ausreichend Material zu gewinnen.

Ein PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen.

25-µl-Ansatz	50-µl-Ansatz	
11,5 µl	24 µl	entionisiertes und UV-bestrahltes Wasser
2 µl	4 µl	10× Polymerasepuffer
2 µl	4 µl	dNTP-Gemisch (je 2,5 mM)
0,5 µl	1 µl	Vorwärtsprimer (10 µM)
0,5 µl	1 µl	Rückwärtsprimer (10 µM)
2,5 µl	5 µl	10× PCRx Enhancer Solution
1 µl	1 µl	cDNA als Matrize
20 µl	40 µl	

Die Polymerase wurde separat mit Polymerasepuffer und Wasser angesetzt und anschließend auf Eis gekühlt. Die manuelle Zugabe des Polymerase-Puffer-Gemischs erfolgte erst während des ersten Schritts des PCR-Programms.

25-µl-Ansatz	50-µl-Ansatz	
4 µl	8 µl	entionisiertes und UV-bestrahltes Wasser
0,5 µl	1 µl	10× Polymerasepuffer
0,5 µl	1 µl	<i>Pfu</i> -Polymerase (2–3 U·µl ⁻¹)
5 µl	10 µl	

Der Ablauf der PCR zur Amplifizierung der Matrize für die *Arc*-RNA-Sonde war wie folgt.

1. 95 °C, 5 min – verlängerter Denaturierungsschritt für die Zugabe der Polymerase
2. 95 °C, 30 s – Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Matrize
3. 58 °C, 30 s – Primerhybridisierung (*Annealing*)

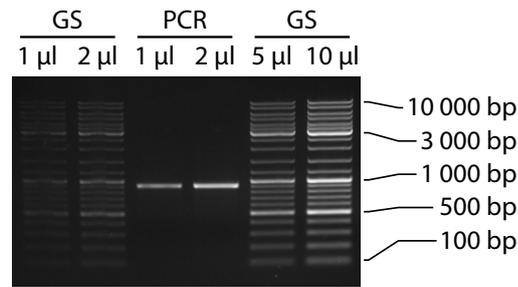


Abbildung 3.4: Zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurden 1 und 2 µl des aufgereinigten PCR-Produkts (PCR) mit 1, 2, 5 und 10 µl DNA-Größenstandard (GS) auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Am rechten Rand sind die Fragmentlängen ausgewählter Banden des Größenstandards in Basenpaaren (bp) notiert.

4. 75 °C, 2 min – Elongation: Synthese der neuen DNA-Stränge
Schritte 2 bis 4 wurden 40-mal durchlaufen
5. 75 °C, 10 min – finale Synthesephase
6. 4 °C – Kühlung bis zur Entnahme

Nach Beendigung der PCR wurden die Reaktionsansätze mithilfe des High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) nach Herstellerangaben aufgereinigt und die in deionisiertem Wasser gelöste DNA anschließend zur Konzentrationsabschätzung mit unterschiedlichen Mengen DNA-Größenstandard auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (s. Abb. 3.4).

3.1.4 *In-vitro*-Transkription

Die RNA-Sonden für die *In-situ*-Hybridisierung wurden mittels der RNA-Polymerase des T3- (*Sense*-Sonde) bzw. T7-Bakteriophagen (*Antisense*-Sonde) gewonnen. Als Ausgangsmaterial kam ein aufgereinigtes, per PCR vervielfältigtes DNA-Fragment zum Einsatz, das die gewünschte Sequenz der Sonde enthielt, die von einem T3- und T7-Promotor flankiert wurde (s. Abb. 3.1).

Ein Ansatz für die *In-vitro*-Transkription enthielt 4–6 ng·µl⁻¹ DNA-Matrize als Ausgangsmaterial, 1/10 Volumen 10× Transkriptionspuffer, 1/10 Volumen 10× Digoxigenin-NTP-Mix, 0,9 U·µl⁻¹ RiboLock RNase-Inhibitor und 0,9 U·µl⁻¹ RNA-Polymerase. Aufgrund der großen Menge benötigter RNA-Sonde wurden Ansätze von 500 µl verwendet, was zu einer Ausbeute von etwa 200–250 µg RNA-Sonde führte.

Die *In-vitro*-Transkription erfolgte bei 37 °C für 3,5 h. Im Anschluss wurde 1/2s Volumen Turbo DNase (2 U·µl⁻¹) zugeben und 30 min bei 37 °C inkubiert, um das DNA-Ausgangsmaterial abzubauen. Zur Fällung der RNA-Sonde wurde 1/4 Volumen Ammoniumacetat (Endkonzentration: 2 M) und anschließend Ethanol zu einer Endkonzentration von 70 % zugegeben. Die Fällung wurde entweder 12 h bei –20 °C oder 1 h bei –80 °C durchgeführt. Anschließend wurde die RNA-Sonde durch 30-minütiges Zentrifugieren bei 20 000 g und 4 °C präzipitiert. Das Präzipitat wurde durch Zugabe des zweifachen des Ursprungsvolumens 80 %igen Ethanol und 20-minütiges Zentrifugieren bei 20 000 g und 4 °C gewaschen. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Präzipitat an der Luft trocknen gelassen und anschließend im Ursprungsvolumen Wasser gelöst. Die Fällung wurde wiederholt und das getrocknete Präzipitat zum Schluss erneut in Wasser gelöst. Zur Kontrolle der Qualität der Sonden und zur Bestimmung der Konzentration wurde ein Aliquot mittels Agarosegelelektrophorese und UV-spektrometrisch untersucht (s. Abb. 3.5 und 3.6). Für die Abschätzung der Qualität der Sonden wurden die Quotienten der optischen Dichte (OD) bei vier Wellenlängen herangezogen. Die optische Dichte einer Nukleinsäurelösung ist abhängig vom pH der Lösung und damit vom Lösungsmittel.¹⁴⁴ Die hier aufgeführten Werte beziehen sich auf reines Wasser als Lösungsmittel. Ein OD-Quotient bei den Wellenlängen 260 und 280 nm (OD₂₆₀/OD₂₈₀) von kleiner als 1,85 weist bei in Wasser gelöster RNA auf Verunreinigung durch Proteine hin. Ein OD₂₆₀/OD₂₃₀-Wert

¹⁴⁴W. W. Wilfinger, K. Mackey und P. Chomczynski, *BioTechniques* 22 (1997), Nr. 3, S. 474–476.

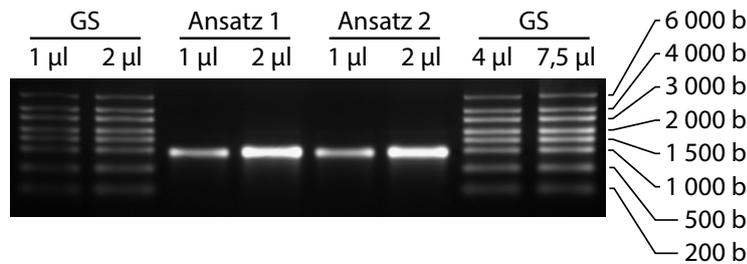


Abbildung 3.5: Um die Qualität der RNA-Sonde zu kontrollieren und die Konzentration abzuschätzen wurden je 1 und 2 μl der Sonde mit 1, 2, 4 und 7,5 μl RNA-Größenstandard (GS) auf ein denaturierendes 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen. Am rechten Rand sind die Fragmentlängen der Banden des Größenstandards in Basen (b) notiert.

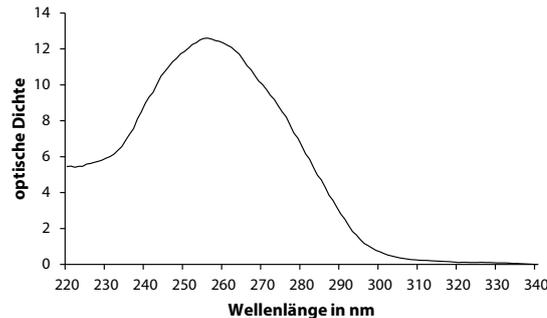


Abbildung 3.6: Zur Kontrolle der Reinheit und genaueren Konzentrationsbestimmung der RNA-Sonde wurde die optische Dichte im UV-Spektrometer im Bereich von 220 bis 340 nm gemessen. Die optische Dichte bei 260 nm wurde zur Konzentrationsbestimmung herangezogen. Drei Quotienten der optischen Dichte bei verschiedenen Wellenlängen wurden als Indikator der Reinheit der RNA-Sonden herangezogen: OD_{260}/OD_{280} (in diesem Fall 1,87), OD_{260}/OD_{230} (2,08) sowie OD_{260}/OD_{270} (1,23).

kleiner als 2 weist auf Kontamination durch Dithiothreitol, Phenol, Salze oder Kohlenhydrate hin. Der Ein OD_{260}/OD_{270} -Wert schließlich liefert einen weiteren Hinweis auf Verunreinigung mit Phenol, das ein Absorptionsmaximum nahe 270 nm hat. Dieser Wert sollte bei etwa 1,2 liegen. Für die Verwendung in der *In-situ*-Hybridisierung wurde eine Konzentration von 400–500 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ eingestellt. Die RNA-Sonden wurden bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2 Stimulation und Gewebeentnahme

Die Stimulationsexperimente wurden in der Tierhaltungseinrichtung des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung (Max-Rubner-Labor) vorgenommen. Die Versuche wurden in Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und waren vom brandenburgischen Landesamt für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz im Tierversuchsantrag mit dem Geschäftszeichen 23-2347-8-10-2008 genehmigt worden. Die Durchführung der Versuche erfolgte vormittags zwischen 9:00 und 13:00 Uhr. Etwa eine Stunde vor Beginn der Experimente wurden Futter und Trinkflaschen aus den Käfigen entfernt.

Zur Stimulation wurden die Tiere einzeln aus dem Käfig genommen und durch Greifen im Nacken und an der Schwanzwurzel fixiert. Mittels einer Schlundsonde wurde über einen Zeitraum von 2 min etwa 1–2 ml der Geschmacksstimuli gleichmäßig in die Mundhöhle appliziert. Durch Bewegung der Sonde sollte eine Verteilung in der gesamten Mundhöhle erreicht werden. Da die Tiere nicht narkotisiert waren, wurde dies durch Bewegung von Kiefer und Zunge unterstützt. Der überwiegende Teil der Stimulationslösungen rann wieder aus der Mundhöhle heraus. Die meisten Tiere verhielten sich während der Stimulation ruhig. Erst nach etwa 1 bis 1,5 min kam es zu vermehrter Aktivität.

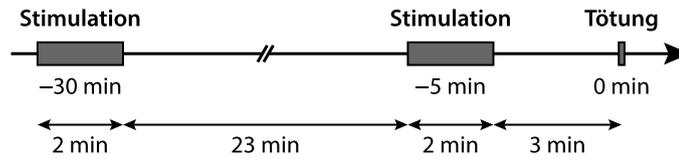


Abbildung 3.7: Stimulationsprotokoll

Nach der ersten Stimulation wurden die Mäuse einzeln in einen neuen Käfig gesetzt, um zu verhindern, dass andere Tiere mit Stimulationslösung in Kontakt kamen, die noch an Maul oder Fell haftete. Die Vereinzelung erleichterte außerdem die Beobachtung der Tiere nach der Stimulation.

Die Tötung der Tiere erfolgte durch Dekapitation. Anschließend wurde möglichst rasch das Gehirn freipräpariert, in eine quadratische Kunststoffschale überführt, mit Einbettmedium umhüllt und in mit Trockeneis gekühltem 2-Methylbutan tiefgefroren. Dieser Prozess dauerte in der Regel weniger als zwei Minuten. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Gewebe bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.3 Anfertigung von Gewebeschnitten

Mittels eines Kryomikrotoms wurden $14\text{ }\mu\text{m}$ dicke, horizontale Gefrierschnitte der Mausgehirne angefertigt. Die Gewebetemperatur wurde auf -11 bis $-13\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingestellt, die Temperatur des Messers lag etwa 2 K darunter. Jeder Objektträger fasste vier Gewebeschnitte. Die Gewebeschnitte wurden in Serien zu je sechs Objektträgern nach folgendem Muster aufgenommen: Schnitt 1 – Objektträger 1 ... Schnitt 6 – Objektträger 6, Schnitt 7 – Objektträger 1 ... Schnitt 24 – Objektträger 6. Die Objektträger wurden von der Beschriftungsfläche ausgehend bestückt (vgl. Abb. 3.8).

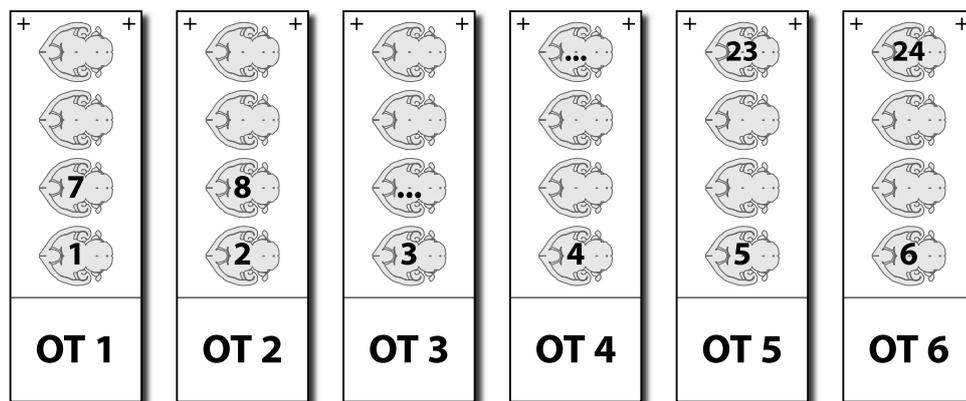


Abbildung 3.8: Reihenfolge der Bestückung der Objektträger bei der Anfertigung der Gefrierschnitte. Dargestellt ist eine Serie à sechs Objektträgern (OT 1–6), die 24 Schnitte umfasst. Die Beschriftungsfläche der Objektträger zeigt nach unten.

Zu Beginn des Schneideprozesses wurde das in Einbettmedium eingefrorene Mausgehirn möglichst horizontal ausgerichtet. Zur Orientierung wurde ein Mausgehirnatlas herangezogen.¹⁴⁵ Die Gehirne wurden von dorsal nach ventral geschnitten. Mit dem Aufziehen der Schnitte auf die Objektträger wurde begonnen, sobald ein Durchbruch vom Kleinhirnmark zum Pons sichtbar wurde (Tafel 152 in Franklin und Paxinos [145]). Dies ist unmittelbar vor dem Auftauchen des *Nucleus parabrachialis* der Fall. Von hier wurden durchgehend Schnitte gesammelt bis das ventrale Ende des Hypothalamus erreicht war. An diesem Punkt waren nur wenige Teile, vorwiegend der Großhirnrinde übrig. Typischerweise ergaben sich so pro Mausgehirn zwölf Serien, entsprechend 72 Objektträgern bzw. 288 Schnitten.

¹⁴⁵K. B. J. Franklin und G. Paxinos. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 3. Aufl. Amsterdam: Elsevier, 2007. ISBN: 978-0-12-369460-7

Die Schnitte wurden nach dem Aufziehen auf den Objektträger an der Luft trocknen gelassen und anschließend im Kryomikrotom tiefgefroren. Nach Abschluss des Schneidevorgangs wurden die Objektträgerkästen mit einem Silikagel-Trockenpäckchen versehen, mit Elektroisolerband luftdicht verschlossen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.4 *In-situ*-Hybridisierung

Die *In-situ*-Hybridisierung wurde mit Hilfe eines Pipettierautomaten durchgeführt. Die Objektträger wurden hierzu in sogenannte Durchflusskammern eingespannt (vgl. Abschnitt 3.4.2). Da der Acetylierungsschritt sich in diesen Kammern nicht durchführen lässt, wurde er zuvor gemeinsam mit der Fixierung des Gewebes in einem separaten Arbeitsschritt vorgenommen.

Die hier dargestellten Verfahren spiegeln den Stand nach der Optimierung des Vorbehandlungs- und *In-situ*-Hybridisierungsprotokolls wider. Die Einzelheiten zur Optimierung finden sich im Ergebnisteil in Abschnitt 4.1 ab Seite 35.

3.4.1 Vorbehandlung der Gewebeschnitte

Die Vorbehandlung der Gehirnschnitte (Fixierung und Acetylierung) wurde in einem Färbeautomaten durchgeführt. Die getrockneten Schnitte wurden hierzu aus dem Gefrierschrank geholt und in ihren luftdicht verschlossenen Behältern bei 37 °C aufgetaut, um Kondensation von Wasser an den Objektträgern zu verhindern. Anschließend wurden die Objektträger in ein Metallgestell eingeordnet und in den Färbeautomaten verbracht, der die Objektträger automatisch in die entsprechenden Lösungen tauchte (das Programm für den Färbeautomaten findet sich im Anhang in Abschnitt A.1). Zunächst erfolgte die Fixierung des Gewebes durch zehnmündige Inkubation in 4 % PFA in PBS (die Zusammensetzung der Lösungen finden sich in Abschnitt 2.8.2, S. 21). Anschließend wurden die Objektträger zweimal je 2 min in 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen. Danach wurde das Färbeprogramm unterbrochen und der Acetylierungsschritt manuell in einem Färbetrog durchgeführt. Hierzu wurden 1,875 ml Essigsäureanhydrid in 750 ml Triethanolaminpuffer gegeben, das Metallgestell mit den Objektträgern rasch zehnmal in den Puffer getaucht und anschließend im Puffer belassen. Ein Magnetrührer sorgte währenddessen für die Durchmischung von Puffer und Essigsäureanhydrid. Nach fünf Minuten wurde die Prozedur durch erneute Zugabe von 1,875 ml Essigsäureanhydrid wiederholt. Nach weiteren fünf Minuten wurden die Objektträger wieder in den Färbeautomaten verbracht und das Programm fortgesetzt. Nach je zweiminütigen Waschschrinen in PBS und 0,9 %iger NaCl-Lösung folgte die Entwässerung der Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 95 %, 100 %, 100 %, je 2 min). Nachdem die Objektträger getrocknet waren, wurden sie wieder luftdicht bei -80 °C gelagert.

3.4.2 Durchführung der *In-situ*-Hybridisierung

Die eigentliche *In-situ*-Hybridisierung erfolgte mit Hilfe eines Pipettierautomaten. Die Tecan-Freedom-EVO-Plattform beruht auf einem flüssigkeitsgefüllten Pipettiersystem, das exaktes Pipettieren ermöglicht. Als Systemflüssigkeit kam deionisiertes Wasser zum Einsatz. Nach jedem Pipettiervorgang wurde das Schlauchsystem mit der Systemflüssigkeit gespült, um Kreuzkontaminationen zu verhindern. Die Pipettiervorgänge erfolgten automatisch. Zu bestimmten Zeitpunkten mussten die vorbereiteten Lösungen auf der Arbeitsfläche des Automaten in Reagenziengefäßen bereitgestellt werden. Neben Kunststoffgefäßen verschiedener Volumina standen vier beheizbare Glasgefäße zur Verfügung, in denen die Lösungen für die Stringenzwaschschrine vorgelegt wurden. Die Anordnung der Reagenziengefäße findet sich im Anhang in Abschnitt A.2.

Die Objektträger wurden in sogenannte Durchflusskammern eingespannt. Die Komponenten einer Durchflusskammer sind in Abbildung 3.9 dargestellt. Hierzu wurden die luftdicht bei 37 °C aufgetauten Objektträger (b) mit den Gewebeschnitten nach oben zeigend auf ein Metallgestell (a) gelegt, mit einem

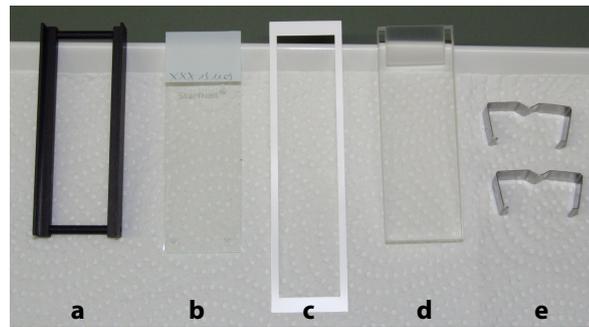


Abbildung 3.9: Die Komponenten einer Durchflusskammer. **a:** Metallgestell, **b:** Objektträger, **c:** Abstandhalter (noch mit weißer Schutzfolie), **d:** Glasblock mit keilförmiger Aushöhlung am oberen Ende, **e:** Halteklammern.

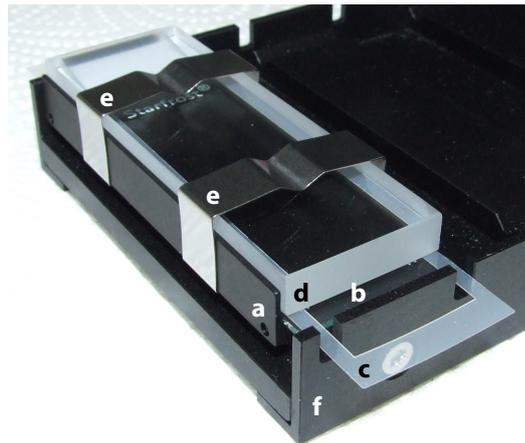


Abbildung 3.10: Eine zusammengesetzte Durchflusskammer bestehend aus Metallgestell (a), Objektträger (b), Abstandhalter (c), Glasblock (d) und zwei Halteklammern (e). Die Kammer befindet sich noch auf der metallenen Montageunterlage (f).

Glasblock (d) abgedeckt und mit Halteklammern fixiert (e). Zwischen Objektträger und Glasblock sorgten zwei schmale Abstandhalter (c) an den langen Kanten für die Schaffung eines Hohlraums mit einem Volumen von etwa 90 μl . Dieser Hohlraum stellte sicher, dass die Gewebeschnitte, bedingt durch die Kapillarkraft, stets benetzt waren und stellte somit den eigentlichen Reaktionsraum während der Prozessierung dar. An den kurzen Kanten war der Hohlraum offen, um Zu- und Abfluss der Lösungen zu ermöglichen. An einer der kurzen Seiten des Glasblocks befand sich eine keilförmige Aushöhlung. Sie zeigte nach Einsetzen der Durchflusskammer in den Automaten nach oben und bildete mit dem Objektträger jenen Hohlraum, in den die Flüssigkeiten hineinpipettiert wurden. Aus diesem Reservoir, das etwa 570 μl fasste, flossen die Lösungen durch den Hohlraum an den Gewebeschnitten vorbei und am unteren Ende wieder aus den Durchflusskammern hinaus. Die fertig zusammengesetzte Kammer ist in Abbildung 3.10 dargestellt.

Die eingespannten Objektträger wurden mit dem Reservoir nach oben zeigend, aufrecht leicht angewinkelt in das temperierte Te-Flow-Gestell eingehängt. Nach der Bereitstellung der ersten Lösungen wurde das Programm gestartet. Der detaillierte Ablauf der automatisierten *In-situ*-Hybridisierung findet sich im Anhang in Abschnitt A.3.

Im ersten Schritt erfolgte die Inhibierung endogener Peroxidaseaktivität durch 0,6 % Wasserstoffperoxid in Methanol. Das Methanol erleichterte zudem die erste Benetzung der Gewebeschnitte, da es eine deutlich geringere Oberflächenspannung aufweist als Wasser. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 0,2 M Salzsäure zur Permeabilisierung der Zellen. Nach der Äquilibration mit Proteinase-K-Puffer wurden 0,0159 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ Proteinase K zum proteolytischen Aufschluss des Gewebes zugegeben. Durch

die anschließende Inkubation mit 4 % PFA in PBS wurde der Proteinase-K-Verdau abgebrochen und das Gewebe fixiert. Im Anschluss erfolgte die Äquilibrierung mit Hybridisierungspuffer, während derer die Temperatur der Objektträger innerhalb von etwa 15 min auf 64 °C angehoben wurde. War die Hybridisierungstemperatur erreicht, wurde die in Hybridisierungspuffer gelöste RNA-Sonde zu einer Endkonzentration von 600 ng·ml⁻¹ zugegeben. Nach der Hälfte der sechsständigen Inkubationszeit wurde nochmals Hybridisierungspuffer mit RNA-Sonde zugegeben.

Während der Prähybridisierung wurde das Gewebe zwischen den einzelnen Schritten jeweils mit PBS gewaschen. Alle wässrigen Lösungen mit Ausnahme des Hybridisierungspuffers enthielten 0,05 % Tween-20 zur Herabsetzung der Oberflächenspannung. Der Hybridisierungspuffer und der Hybridisierungspuffer mit RNA-Sonde wurden vor der Bereitstellung auf dem Automaten 10 min bei 65 °C inkubiert und anschließend möglichst rasch auf Eis abgekühlt.

Im Anschluss an die Hybridisierung erfolgten die Stringenzwaschschritte zur Entfernung von überschüssiger oder unspezifisch gebundener RNA-Sonde. Die Temperatur der Objektträger wurde hierzu auf 62 °C abgesenkt und die Waschlösungen auf 62 °C vorgeheizt. Der erste Waschschritt erfolgte mit 5× SSC, danach wurde mit 2× SSC in 50 % Formamid, 1× SSC in 50 % Formamid und schließlich mit 0,1× SSC gewaschen. Während des letzten Waschschritts wurde die Temperatur der Objektträger auf 24 °C abgesenkt.

Danach wurde 20 mM Iodacetamid in NTE zur Alkylierung von Sulfhydrylgruppen zugegeben. Zur Maskierung von Epitopen im Gewebe wurden die Schnitte nacheinander mit 4 % Lammserum in TN, TNB und 0,5 % Blockierreagens in MWB behandelt.

Im Anschluss erfolgte die Zugabe des in TNB verdünnten, gegen Digoxigenin gerichteten Antikörpers, an den eine Peroxidase gekoppelt war. Die Peroxidase bewirkte im nun folgenden Amplifikationsschritt die Umsetzung des in *Amplification Diluent* gelösten Tyramid-Biotin und dessen Bindung an das Gewebe. Schließlich wurden die Fluoreszenzfarbstoffe auf die Objektträger gegeben. Zunächst Avidin-Cy3-Konjugat, das an den Biotin-Rest des Tyramid-Biotins band, und anschließend DAPI, das zur Kernfärbung genutzt wurde. Im letzten Schritt wurden die Objektträger mit deionisiertem Wasser gespült.

Zwischen den Schritten, die auf die Stringenzwaschschritte folgten, wurde das Gewebe jeweils mit TN gewaschen. Kam bei einem Schritt ein anderer Puffer, NTE oder MWB, zum Einsatz, folgte auf den TN-Waschschritt eine Äquilibrierung mit dem jeweiligen Puffer und das Gewebe wurde vor dem nachfolgenden TN-Waschschritt zusätzlich mit dem entsprechenden Puffer gewaschen.

Nach Beendigung des Programms wurden die Durchflusskammern zerlegt und die gefärbten Schnitte mit Fluoreszenzeindeckmedium eingedeckt. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie bei 4 °C dunkel und trocken gelagert.

3.5 Auswertung

Im Zuge der Etablierung der Methode und der Anpassung für die *Arc*-catFISH-Analyse wurden die Ergebnisse der Prozessierung mithilfe des konfokalen Laserscanningmikroskops TCS SP2 (Leica) ausgewertet. Nach Abschluss der Optimierungen des *In-situ*-Hybridisierungs-Protokolls erfolgte die Auswertung der Experimente durch Digitalisierung der gefärbten Hirnschnitte. Die Identifikation der Hirnregionen und die Quantifizierung der *Arc*-Expression erfolgten mittels eines Bildverarbeitungsprogramms.

3.5.1 Auswertung mithilfe des Konfokalmikroskops

Zur Auswertung der Ergebnisse der *In-situ*-Hybridisierung mithilfe des Konfokalmikroskops wurden Aufnahmen im Neocortex und Hippocampus angefertigt, von denen eine starke basale *Arc*-Expression bekannt ist. Da das Konfokalmikroskop keine geeignete Lichtquelle für die Anregung von DAPI und keinen geeigneten Filtersatz für die Detektion von Cy3 besaß, wurde während der Optimierung des Protokolls auf Fluorescein zur Markierung der *Arc*-RNA und TO-PRO-3 als Kernfärbung zurückgegriffen. Die Aufnahmen wurden mittels eines 40-fach vergrößernden apochromaten Ölimmersionsobjektivs

angefertigt. Für die Anregung wurden die 488-nm-Linie eines Argon-Lasers und die 633-nm-Linie eines Helium-Neon-Lasers genutzt. Die Detektionsbereiche für die Emission wurden auf 500–550 nm bzw. 649–671 nm eingestellt. Die Spannung an den Photoelektronenvervielfachern wurde auf einen Wert zwischen 450 und 500 V festgelegt. Dies erlaubte eine ausreichende Verstärkung der emittierten Photonen, ohne dass es zu starkem Rauschen kam. Des Weiteren wurden zur Rauschunterdrückung jeweils drei bis vier Bilder pro Ausschnitt angefertigt und gemittelt. Die zum Vergleich bestimmten Bilder wurden stets mit den gleichen Parametern aufgenommen.

3.5.2 Digitalisierung der Gewebeschnitte

Die Digitalisierung erfolgte möglichst schnell nach der *In-situ*-Hybridisierung, jedoch frühestens nach 12 h, wenn das Eindeckmedium etwas eingetrocknet war und die Deckgläschen ausreichend Haftung auf dem Objektträger hatten. Durchgeführt wurde die Digitalisierung mittels eines automatisierten Fluoreszenzmikroskops (Mirax Midi, Zeiss). Als Lichtquelle kam eine Quecksilber-Kurzbogenlampe zum Einsatz. Für die Erfassung der Fluoreszenzfarbstoffe wurden die Zeiss-Filtersätze 43 (Anregungsfilter: zentrale Wellenlänge 545 nm, nutzbare Bandbreite 25 nm; Strahlteiler: 570 nm; Emissionsfilter: zentrale Wellenlänge 605 nm nutzbare Bandbreite 70 nm) und 49 (Anregungsfilter: 365 nm, Strahlteiler: 395 nm, Emissionsfilter: 445 nm/50 nm) eingesetzt.

An jeder Stelle im Gewebe wurden sieben Bilder aufgenommen, die jeweils 1 µm senkrecht zur Schnittfläche voneinander entfernt lagen. Die Bildinformation dieser sieben Ebenen wurden durch die Aufnahmesoftware ähnlich einer Dekonvolution verrechnet und zu einer Ebene kombiniert. Die Algorithmen, die diesem Prozess zugrundeliegen, sind in der Mikroskopsoftware integriert und werden vom Hersteller nicht genau beschrieben. Die Einzelbilder wurden schließlich zu einem großen zweidimensionalen Bild zusammengefügt und auf Festplatte gespeichert. Für die Analyse wurden die relevanten Bereiche als TIF-Datei exportiert.

3.5.3 Auszählung der *Arc* exprimierenden Zellen

Zur Quantifizierung der *Arc*-Expression wurden die TIF-Dateien in Adobe Photoshop geladen. Hier wurden zunächst die Umriss des vierten Ventrikels bzw. des Zentralkanal und des NTS nachgezeichnet. Der Umriss des NTS hob sich als dunklere Region im Cy3-Kanal sowie durch eine höhere Dichte von Zellkernen vom umliegenden Gewebe ab. Zusätzlich dienten das innere Facialisknie und das Liquorsystem als anatomische Landmarken bei der Identifikation des NTS. Im Anschluss wurden eventuelle Defekte im Gewebeschnitt, wie Risse, Falten oder durch Luftblasen entstandene Löcher, notiert. Schließlich wurde die Bilddatei in Originalvergrößerung abgerastert und *Arc* exprimierende Zellen von Hand mit farbigen Kreisen markiert. Die Farbe der Kreise gibt Aufschluss über die intrazelluläre Verteilung der RNA.

Nach der Markierung der *Arc* exprimierenden Zellen wurde das Bild so gedreht, dass die Mittellinie horizontal lag und diese markiert. Anschließend erfolgte die Unterteilung des NTS und die Bestimmung der Dichte der *Arc* exprimierenden Zellen in den NTS-Unterregionen. Der NTS wurde zum einen nach der für Ratte und Hamster beschriebenen, traditionellen Methode in einen rostralen und einen caudalen Teil getrennt. Hierzu wurden beidseits ausgehend von dem Punkt, an dem die mediale Grenze des NTS auf den vierten Ventrikel bzw. den Zentralkanal trifft, waagerechte Linien bis zur lateralen Grenze des NTS gezogen. Diese einfache, grobe Unterteilung wird mangels erkennbarer histologischer Unterschiede zwischen dem rostralen und caudalen NTS verwendet, spiegelt die funktionelle Teilung des NTS aber nur bedingt wider. Da der so definierte rostrale Teil den Großteil der oralen Afferenzen erhält, gustatorische aber auch andere sensorische, wird er als gustatorischer NTS bezeichnet.⁵⁴ Zusätzlich wurde eine neuartige Methode der NTS-Unterteilung verwendet, die auf geometrischen Merkmalen beruht, und sowohl die Projektionsgebiete der gustatorischen Fasern als auch die funktionelle Unterscheidung

⁵⁴R. M. Bradley u. a. *The Role of the Nucleus of the Solitary Tract in Gustatory Processing*. Frontiers in Neuroscience. Boca Raton (FL), 2007. ISBN: 978-0-8493-4200-4

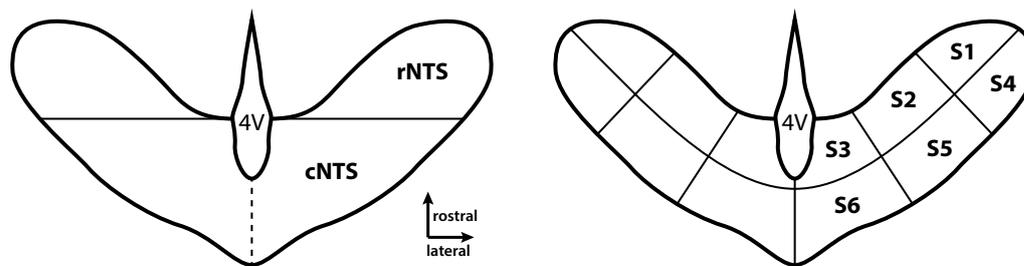


Abbildung 3.11: Unterteilung des NTS. Links ist die traditionelle Unterteilung des NTS in einen rostralen (rNTS) und einen caudalen (cNTS) Teil dargestellt. Ausgehend von dem Punkt, an dem die mediale Grenze des NTS auf den vierten Ventrikel (4V) trifft, wird die Grenze orthogonal zur Mittellinie (gestrichelt) definiert. Auf der rechten Seite ist die Unterteilung des NTS in sechs Felder anhand geometrischer Merkmale dargestellt.

zwischen medialem und lateralem NTS berücksichtigen soll. Hierzu wurde der NTS zunächst entlang der Längsachse vom rostralen Pol bis zur Mittellinie in zwei Hälften geteilt. Anschließend wurde er senkrecht zu dieser Längsachse gedrittelt, sodass sechs Unterteilungen entstanden, die von rostro-medial nach caudo-lateral als S1 bis S6 bezeichnet wurden (s. Abb 3.11).

Schließlich wurden die *Arc* exprimierenden Zellen gezählt und den Unterteilungen (gesamt, rostral/caudal, S1–6) zugeordnet. Um die Ergebnisse zwischen den Tieren vergleichen zu können, wurde die Dichte der *Arc* exprimierenden Zellen für die einzelnen Unterteilungen ermittelt, indem die Anzahl der *Arc* exprimierenden Zellen auf die Fläche normalisiert wurde. Der Arbeitsablauf während der Auswertung ist in Abbildung 3.12 auf Seite 34 illustriert.

In die Auswertung wurden nur jene Horizontalschnitte einbezogen, die den dorsalen NTS enthielten. Dieser erhält den Großteil der Hirnnerv-Afferenzen.⁵⁴ Die Grenze zwischen dorsalem und ventralem NTS wurde anhand der Form des NTS und des Winkels zwischen medialer Grenze und Ventrikelsystem festgemacht. Am Übergang verändert sich die Form des NTS von einem V zu einem U, dadurch dass sich der Winkel am Ventrikelsystem vergrößert und die Krümmung der medialen Grenze zunimmt. Ferner war der Umriss des ventralen NTS nicht mehr klar erkennbar, wie von Bradley *et al.* berichtet.⁵⁴ Sämtliche Markierungen wurden im Bildbearbeitungsprogramm auf separaten Ebenen durchgeführt, sodass das ursprüngliche Bildmaterial erhalten blieb. In Einzelfällen war die intrazelluläre Verteilung der *Arc*-RNA nicht eindeutig am digitalisierten Schnitt zu bestimmen. Hier wurde der entsprechende Gewebeschnitt selbst am Fluoreszenzmikroskop untersucht.

3.5.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Programme Microsoft Excel und SigmaPlot. Mittels *t*-Test und einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) wurde auf statistisch signifikante Unterschiede getestet. Das Signifikanzniveau α wurde auf 0,05 festgelegt. In einigen Fällen folgte der Varianzanalyse ein paarweiser Vergleich der Mittelwerte nach Holm-Šidák.

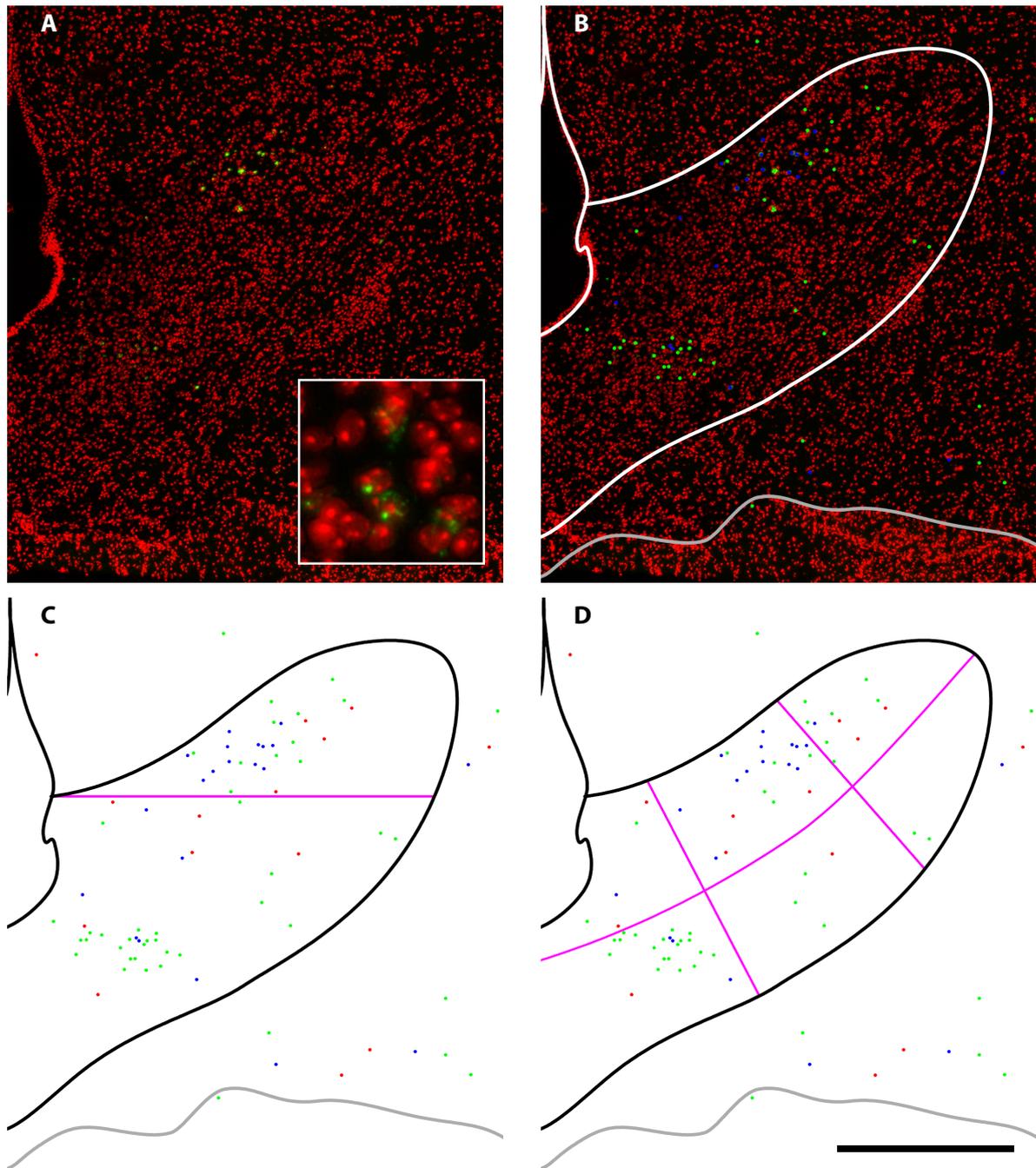


Abbildung 3.12: Quantifizierung der Arc-Expression. **A:** Rohbildmaterial. Der Ausschnitt zeigt eine Gruppe von Zellen mit Arc-RNA in unterschiedlichen Kompartimenten. rot: Kernfärbung, grün: Arc-RNA. **B:** Die Umrisse des NTS und des Ventrikelsystems wurden nachgezeichnet (weiß/schwarz). Eventuelle Defekte des Gewebeschnitts (Falten, Risse, Löcher etc.) sind grau markiert. Die Arc exprimierenden Zellen wurden mit farbigen Kreisen gekennzeichnet, die Aufschluss über die intrazelluläre Verteilung der Arc-RNA geben (rot: nukleär, grün: zytoplasmatisch, blau: nukleär und zytoplasmatisch). **C:** Unterteilung des NTS zur Quantifizierung der Arc exprimierenden Zellen in rostralem und caudalem NTS. **D:** Desgleichen in den geometrisch definierten Unterteilungen S1 bis S6 (vgl. Abb. 3.11). Maßstab 500 µm, Ausschnitt in A achtfach vergrößert. Das Tier wurde in diesem Fall zu den Zeitpunkten –30 min und –5 min jeweils mit Cycloheximid stimuliert.

4 Ergebnisse

In diesem Abschnitt sollen die Ergebnisse dieser Arbeit dargelegt werden. Zunächst wird die Etablierung des *In-situ*-Hybridisierungs-Protokolls geschildert und anschließend die Auswertung der *Arc*-Expression im *Nucleus tractus solitarii* (NTS) nach ein- und zweimaliger Stimulation mit Geschmacksstoffen. In diesem Zusammenhang wird zudem eine neuartige Methode der Unterteilung des NTS vorgestellt und anhand der Ergebnisse evaluiert.

4.1 Etablierung des *In-situ*-Hybridisierungs-Protokolls

Die *In-situ*-Hybridisierungs-Experimente wurden mithilfe des Pipettierautomaten Tecan Freedom EVO durchgeführt. Die automatisierte *In-situ*-Hybridisierung auf Objektträgerbasis und mit temperierten, sogenannten *Te-Flow-Racks* wurde von der Forschergruppe um Prof. Eichele vom Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen entwickelt¹⁴⁶ und ist auch auf der Internetseite des Projektes gut dokumentiert.^a Aus mehreren Gründen war diese Methode allerdings nicht ohne weiteres für die Fragestellung dieser Arbeit nutzbar. So ist das Protokoll auf 25 µm dicke Gewebeschnitte von Mausembryonen optimiert. Außerdem erfolgt die Visualisierung der RNA chromogen durch Umsetzung von 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) in Anwesenheit von Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) durch eine Alkalische Phosphatase (AP). Für eine ausreichende subzelluläre Auflösung und die Möglichkeit mehrerer Färbungen auf demselben Gewebeschnitt ist jedoch eine Detektion der RNA durch Fluoreszenzfarbstoffe nötig. Auch sollte in unserem Fall immer dieselbe RNA-Sonde eingesetzt werden, während im EurExpress-Projekt die Expression vieler Tausender Gene untersucht wird. Das Protokoll musste also zunächst für unsere Zwecke angepasst und optimiert werden.

Zur Optimierung der Konditionen für die Vorbehandlung und die *In-situ*-Hybridisierung wurde die *Arc*-Expression im Neocortex und im Hippocampus untersucht. Von diesen Gebieten ist bekannt, dass sie eine starke basale Expression zeigen. Die Aufnahmen wurden mithilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops TCS SP2 von Leica Microsystems erstellt. Im Gegensatz zu den späteren Experimenten kamen als Fluoreszenzfarbstoffe TO-PRO-3 für die Kernfärbung und ein Fluorescein-Avidin-Konjugat zur Visualisierung der *Arc*-RNA zum Einsatz, da am Konfokalmikroskop DAPI nicht und Cy3 nur schwer detektierbar war.

4.1.1 Anpassung des Protokolls für Fluoreszenzdetektion

Da das Ursprungsprotokoll für die chromogene Visualisierung der RNA-Expression durch Umsetzung von NBT und BCIP zu einem Indigofarbstoff ausgelegt war, musste das Protokoll zunächst für die Visualisierung mittels Fluoreszenzfarbstoffen abgeändert werden. Das Originalprotokoll sah nach dem TSA-Schritt die Zugabe einer avidingekoppelten Alkalischen Phosphatase vor, die anschließend die Umsetzung des Farbsubstrats katalysierte. Nach der Bildung des Farbstoffs folgten ein Fixierschritt mit Paraformaldehydlösung und ein letzter Waschschrift mit destilliertem Wasser. Im abgeänderten Protokoll wurden stattdessen nacheinander die Fluoreszenzfarbstoffe Avidin-Fluorescein bzw. Avidin-Cy3 und TO-PRO-3 bzw. DAPI zur Färbung der Zellkerne zugegeben, jeweils gefolgt von Waschschriften mit TN-Puffer. Der Fixierschritt entfiel, der letzte Waschschrift blieb jedoch unverändert.

¹⁴⁶U. Herzig u. a., *Novartis Found Symp* 239 (2001), S. 129–146.

^a<http://www.eurexpress.org/ee/technology/SOPs.html>

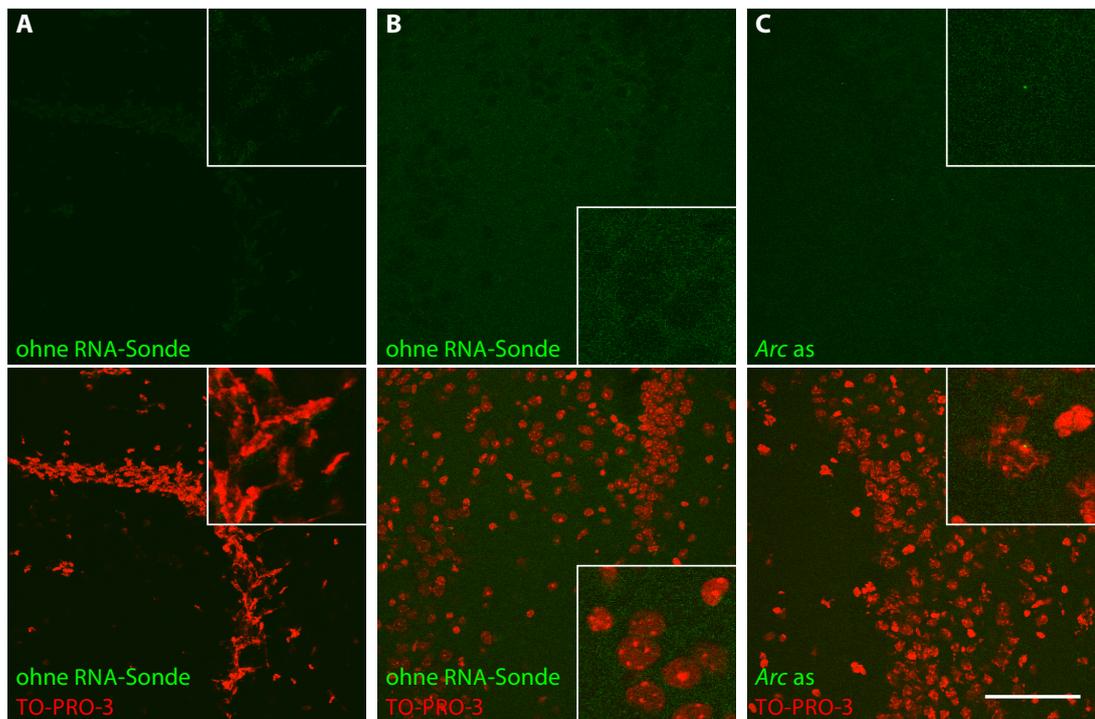


Abbildung 4.1: Ausgangspunkt der Optimierung der Fixierzeit und des Proteinase-K-Verdau. Das Ausgangsprotokoll sah 25 min Fixierung und einen Verdau mit $0,35 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ Proteinase K vor. **A:** Der Verdau mit Proteinase K führte zu einer starken Zersetzung des Gewebes. **B:** Ohne Proteinase-K-Verdau ist das Gewebe intakt. **C:** Jedoch ist der Arc-RNA-Nachweis durch Zugabe von RNA-*antisense*-Sonde („Arc as“) nur sehr schwach. grün: Arc-RNA, rot: Kernfärbung, Aufnahmen des Hippocampus, Maßstab 100 μm , Ausschnitte dreifach vergrößert

4.1.2 Optimierung der Fixierschritte und der Proteinase-K-Konzentration

Die ersten Ergebnisse der Prozessierung mit dem abgeänderten Protokoll zeigten, dass das Gewebe sehr stark in Mitleidenschaft gezogen wurde, was sich in einer starken Verformung der Zellkerne und Verlust der vom Gewebe stammenden Hintergrundfluoreszenz im Fluoresceinkanal äußerte (vgl. Abb. 4.1 A). Als wahrscheinliche Ursache wurde der Proteinase-K-Verdau ausgemacht, da die eingesetzte Proteinase-Konzentration deutlich höher als bei vergleichbaren Experimenten unserer Abteilung war. Durch Weglassen des Proteinase-K-Verdau blieb das Gewebe intakt (Abb. 4.1 B), jedoch gelang es kaum, Arc-RNA nachzuweisen (Abb. 4.1 C). Im Vergleich zu den Ergebnissen der bisherigen *In-situ*-Hybridisierungen war das Arc-Signal sehr schwach.

Die erste am Protokoll vorzunehmende Anpassung war also die Ermittlung der optimalen Proteinase-K-Konzentration. Einen gegenteiligen Effekt zum Proteinase-K-Verdau hat bei der *In-situ*-Hybridisierung die Fixierung. Während die Proteinase im Gewebe befindliche Proteine abbaut und so die Zugänglichkeit für Reagenzien und die RNA-Sonde erhöht, führt die Behandlung mit Paraformaldehyd zur Quervernetzung von Proteinen und stabilisiert damit die Gewebestruktur. Eine zu starke Fixierung kann allerdings die Verteilung der RNA-Sonde im Gewebe behindern. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zum Proteinase-K-Schritt auch die Parameter der beiden Fixierungsschritte angepasst.

In einem ersten Experiment wurde die Proteinase-K-Konzentration des Ausgangsprotokolls auf ein Zehntel, ein Hundertstel sowie ein Tausendstel reduziert. Zusätzlich wurde der Einfluss einer Fixierungsdauer von 25 und 10 min untersucht (vgl. Abb. 4.2). Gegenüber dem Ausgangsprotokoll wurden bessere Ergebnisse mit den reduzierten Proteinase-Konzentrationen erzielt, das Ziel einer intensiven Färbung bei intakter Gewebestruktur wurde jedoch noch nicht erreicht. Bei einer Fixierzeit von 25 min war die intensivste Färbung bei $\frac{1}{10}$ der Proteinase-K-Ausgangskonzentration zu sehen (Abb. 4.2 B), bei 10 min Fixierung war die Färbung ebenfalls bei der Konzentration von $\frac{1}{10}$ am stärksten (Abb. 4.2 F), jedoch war

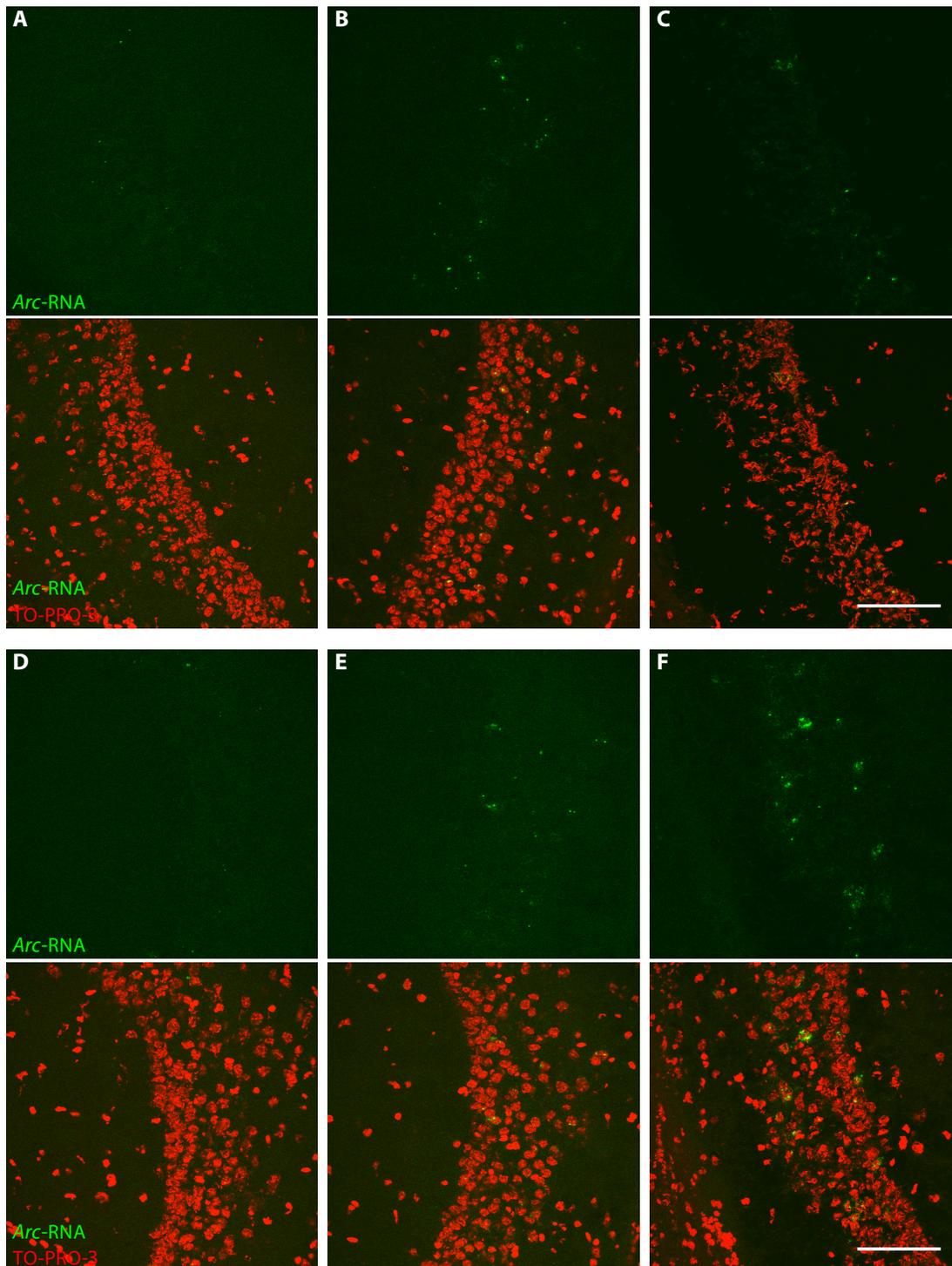


Abbildung 4.2: Erste Runde der Optimierung von Fixierzeit und Proteinase-K-Verdau. Untersuchung des Einflusses von Fixierzeit und Proteinase-K-Konzentration auf die Stärke der Arc-Signale. **A–C:** 25 min Fixierung **A:** $\frac{1}{100}$ **B:** $\frac{1}{10}$ **C:** $\frac{1}{1}$ der Proteinase-K-Ausgangskonzentration **D–F:** 10 min Fixierung **D:** $\frac{1}{1000}$ **E:** $\frac{1}{100}$ **F:** $\frac{1}{10}$ der Proteinase-K-Ausgangskonzentration. grün: Arc-RNA, rot: Kernfärbung, Aufnahmen des *Cornu ammonis* des Hippocampus, Maßstab 100 μm

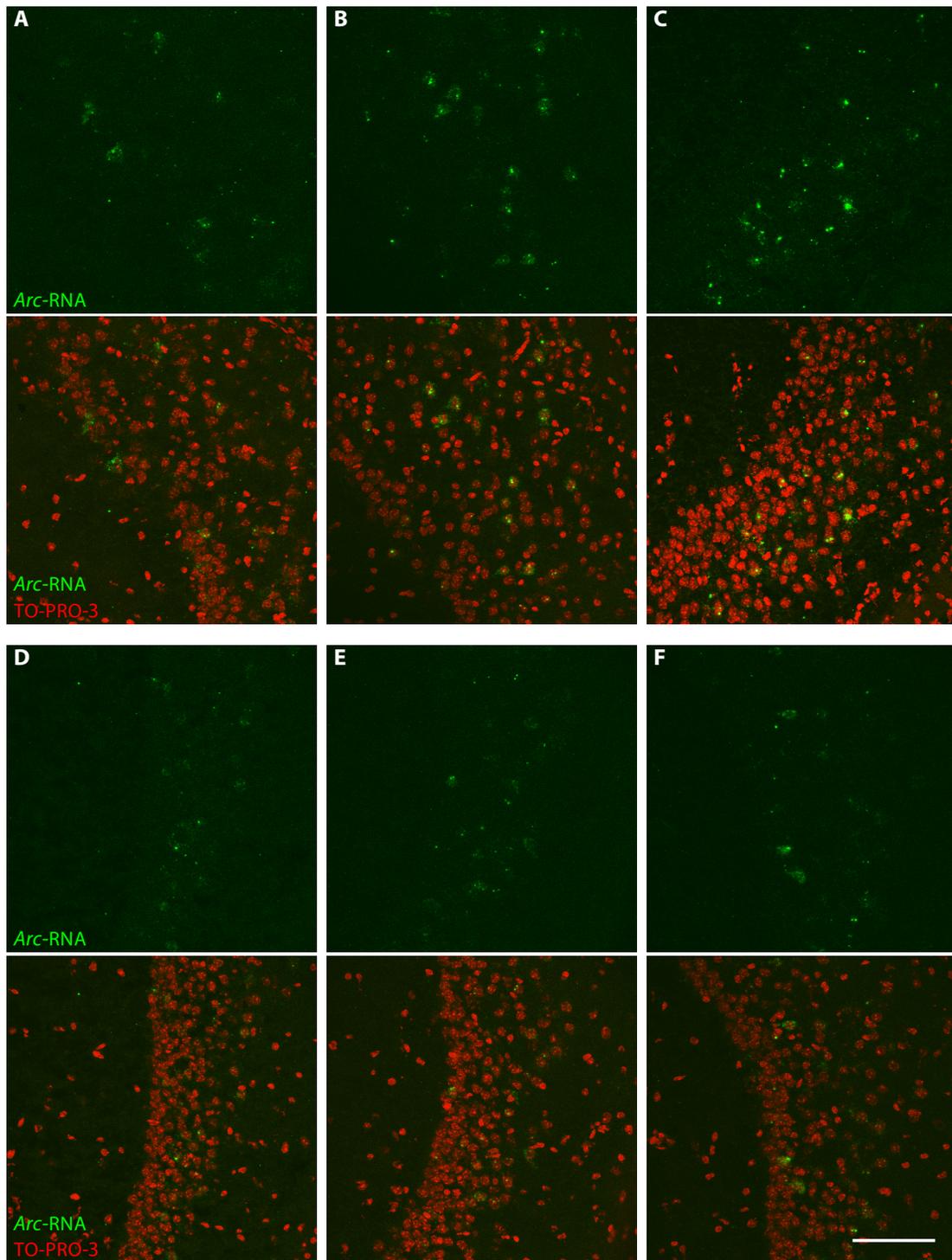


Abbildung 4.3: Zweite Runde der Optimierung von Fixierzeit und Proteinase-K-Verdau. Untersuchung des Einflusses von Fixierzeit, Nachfixierzeit und Proteinase-K-Konzentration auf die Stärke der Arc-Signale bei einer Fixierzeit von 25 min. **A–C:** 2× 10 min Nachfixierung **A:** $\frac{1}{22}$ **B:** $\frac{1}{10}$ **C:** $\frac{1}{3}$ der Proteinase-K-Ausgangskonzentration **D–F:** 2× 5 min Nachfixierung **D:** $\frac{1}{47}$ **E:** $\frac{1}{22}$ **F:** $\frac{1}{10}$ der Proteinase-K-Ausgangskonzentration. grün: Arc-RNA, rot: Kernfärbung, Aufnahmen des Cornu ammonis des Hippocampus, Maßstab 100 μ m

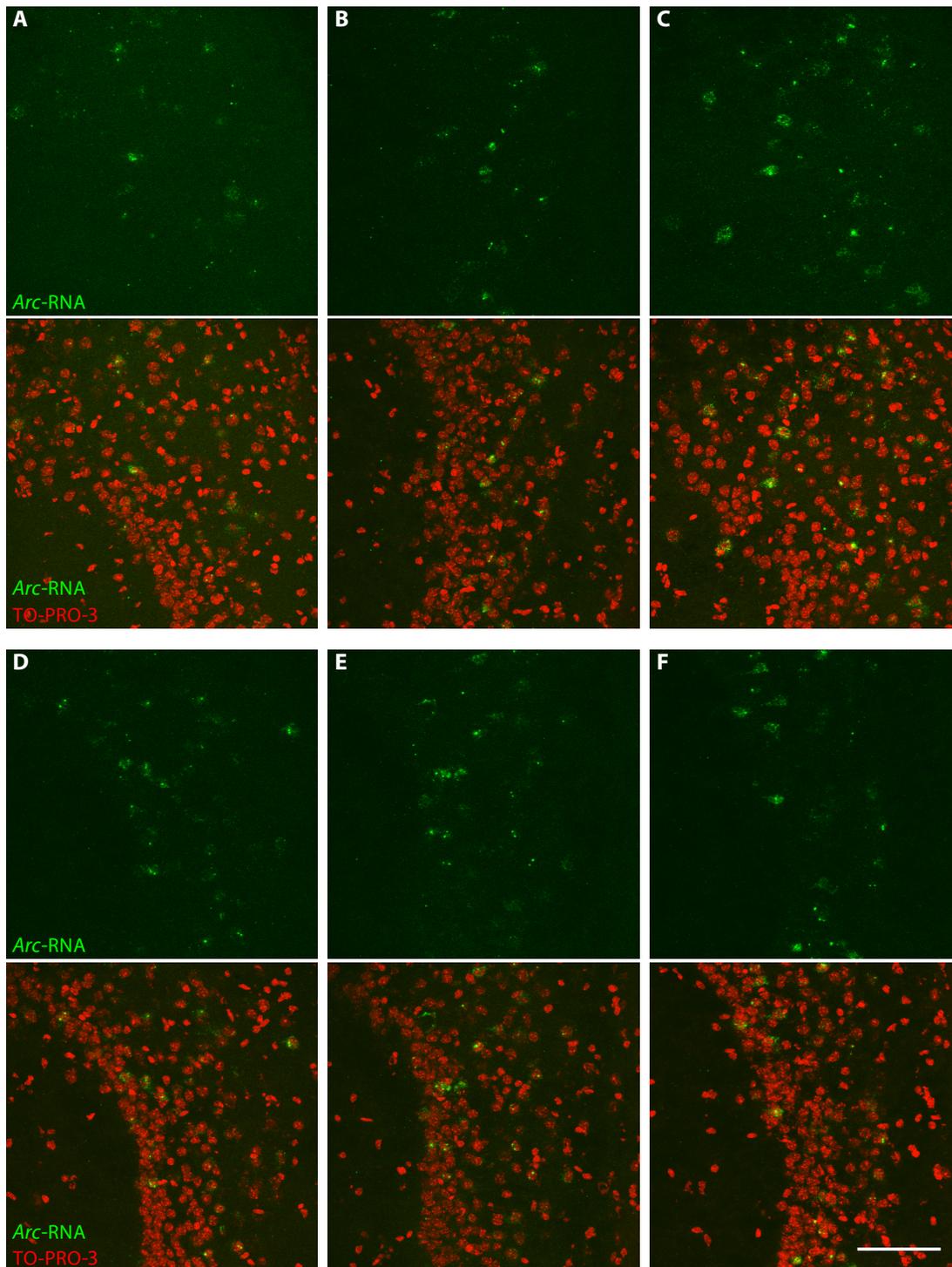


Abbildung 4.4: Zweite Runde der Optimierung von Fixierzeit und Proteinase-K-Verdau. Untersuchung des Einflusses von Fixierzeit, Nachfixierzeit und Proteinase-K-Konzentration auf die Stärke der Arc-Signale bei einer Fixierzeit von 10 min. **A–C:** 2× 10 min Nachfixierung **A:** $\frac{1}{47}$ **B:** $\frac{1}{22}$ **C:** $\frac{1}{10}$ der Proteinase-K-Ausgangskonzentration **D–F:** 2× 5 min Nachfixierung **D:** $\frac{1}{47}$ **E:** $\frac{1}{22}$ **F:** $\frac{1}{10}$ der Proteinase-K-Ausgangskonzentration. grün: Arc-RNA, rot: Kernfärbung, Aufnahmen des *Cornu ammonis* des Hippocampus, Maßstab 100 µm

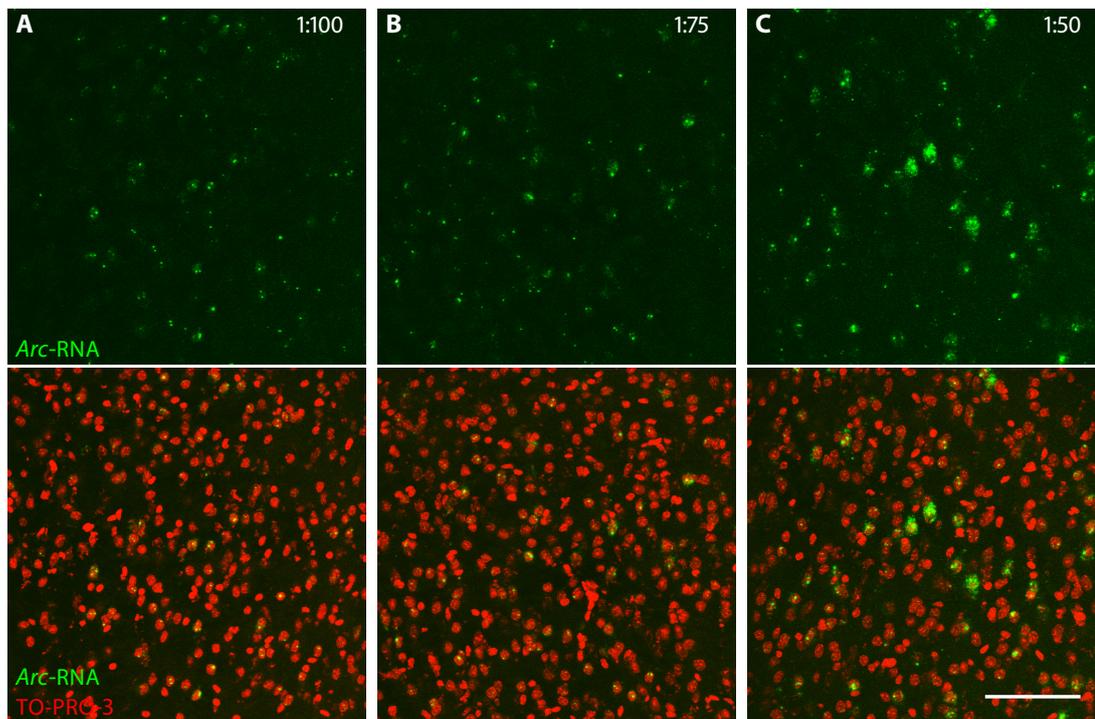


Abbildung 4.5: Optimierung der Tyramid-Biotin-Konzentration. Konzentration der RNA-Sonde $400 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. **A:** 1:100 verdünnt in *Amplification Diluent* **B:** Desgleichen 1:75 **C:** Desgleichen 1:50. grün: Arc-RNA, rot: Kernfärbung, Aufnahmen des Neocortex, Maßstab $100 \mu\text{m}$

das Gewebe hier bereits stark angegriffen.

Im zweiten Schritt wurden feinere Zwischenstufen der Konzentration der Proteinase eingesetzt, die sich um einen Faktor von etwa 2,2 anstatt 10 unterschieden (entsprechend der Drittelung einer dekadisch logarithmischen Skala). Es wurden wiederum zwei Fixierzeiten (25 und 10 min) untersucht und zusätzlich wurde die Zeit für den Nachfixierschritt variiert, der dem Proteinase-K-Verdau folgt. Diese betrug entweder zweimal 10 oder zweimal 5 min.

Bei einer Fixierzeit von 25 min erbrachten die Kombinationen aus $\frac{1}{10}$ Proteinase-K-Konzentration und zweimal 10 bzw. zweimal 5 min Nachfixierung die besten Ergebnisse (Abb. 4.3 B bzw. F). Bei einer Proteinase-K-Konzentration von $\frac{1}{3}$ wies das Gewebe bereits sichtbare Schäden auf (Abb. 4.3 C).

Nach zehnminütiger Fixierung wurden sehr gute Ergebnisse bei der Kombination von 10 min Nachfixieren und Proteinase-K-Konzentrationen von $\frac{1}{22}$ und $\frac{1}{10}$ des Ausgangsprotokolls erzielt (Abb. 4.4 B und C). Bei fünfminütiger Nachfixierung waren intensive Arc-Signale bei Proteinase-K-Konzentrationen von $\frac{1}{47}$, $\frac{1}{22}$ und $\frac{1}{10}$ des Ausgangsprotokolls zu sehen (Abb. 4.4 D–F). Insgesamt zeigten die Ergebnisse bei einer Fixierzeit von 10 min eine weniger starke Abhängigkeit von der Proteinase-K-Konzentration und von der Dauer der Nachfixierung. Diese Robustheit erschien vorteilhaft für nachfolgende Experimente, die dadurch weniger anfällig für Einflüsse von Pipettierfehlern oder schwankender Enzymaktivität würden. Aus diesem Grund wurde die Kombination von 10 min Fixierung, $\frac{1}{22}$ der Proteinase-K-Konzentration des Ausgangsprotokolls und zweimal 5 min Nachfixierung als Parameter für die nachfolgenden Experimente festgelegt.

4.1.3 Optimierung des TSA-Schritts

Die *tyramide signal amplification* (TSA) ist eine enzymatische Methode zur Signalverstärkung in histologischen Färbeverfahren. Eine an den Primärantikörper gekoppelte Peroxidase vermittelt die enzymatische Umsetzung von Tyramid zu einem hochreaktiven Radikal, das chemische Reaktionen mit elektronendichten Molekülen des Gewebes, wie etwa Tyrosin- oder Tryptophanseitenketten eingeht. Dadurch

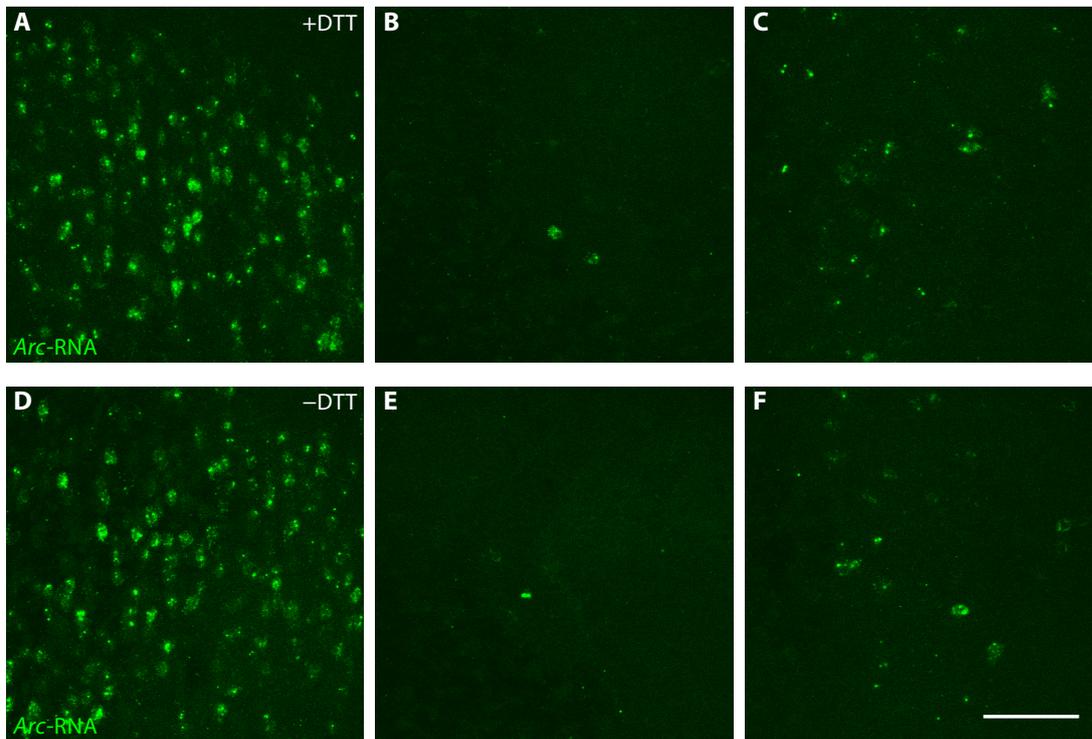


Abbildung 4.6: Auswirkung von DTT-Zugabe zum Hybridisierungspuffer. **A–C:** Mit Zugabe von DTT. **D–F:** Ohne Zugabe von DTT. **A, D:** Neocortex **B, C:** Gyrus dentatus des Hippocampus **E, F:** Cornu ammonis des Hippocampus. grün: Arc-RNA, rot: Kernfärbung, Maßstab 100 µm

kommt es in der Nähe der Peroxidase zu einer vielfachen Bindung von Tyramid an das Gewebe.¹⁴⁷ Durch Kopplung verschiedener Moleküle an das Tyramid, wird die anschließende Detektion ermöglicht. In diesem Fall wurde ein Tyramid-Biotin-Konjugat eingesetzt, das anschließend mit einem an ein Avidin gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff reagierte. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente waren Reagenzien für die Durchführung der TSA ausschließlich bei PerkinElmer erhältlich und stellten einen großen Kostenpunkt dar. Aus diesem Grund wurde eine Reduktion der eingesetzten Tyramid-Biotin-Menge ausgetestet.

Zusätzlich zur vom Hersteller vorgegebenen Verdünnung des Tyramid-Biotins im Verhältnis 1:50 in *Amplification Diluent* wurden Verdünnungen von 1:75 und 1:100 ausgetestet. Da die beiden stärkeren Verdünnungen zu starken Reduktionen der Fluoreszenz führten, wurde weiterhin die vom Hersteller empfohlene Menge eingesetzt (s. Abb. 4.5).

4.1.4 Dithiothreitolzugabe zum Hybridisierungspuffer

Des Weiteren wurde die Auswirkung der Zugabe von Dithiothreitol (DTT) zum Hybridisierungspuffer geprüft. Der Zusatz von DTT zum Hybridisierungspuffer dürfte seinen Ursprung in der Zeit haben, als vornehmlich mit Schwefel-35 radioaktiv markierte RNA-Sonden eingesetzt wurden. Hier diente DTT im Hybridisierungspuffer als Reduktionsmittel. Da keine schwefelhaltigen Sonden eingesetzt wurden und der vorgemischte erworbene Hybridisierungspuffer bereits DTT enthielt, sollten die Auswirkungen von zusätzlichem DTT zum Hybridisierungspuffer untersucht werden.

In keinem der untersuchten Hirngebiete wurde ein Einfluss der DTT-Zugabe auf die Intensität der Arc-Signale beobachtet (vgl. Abb. 4.6). Bei den folgenden Experimenten wurde daher auf die DTT-Zugabe verzichtet.

¹⁴⁷M. N. Bobrow u. a., *J Immunol Methods* 125 (1989), Nr. 1-2, S. 279–285.

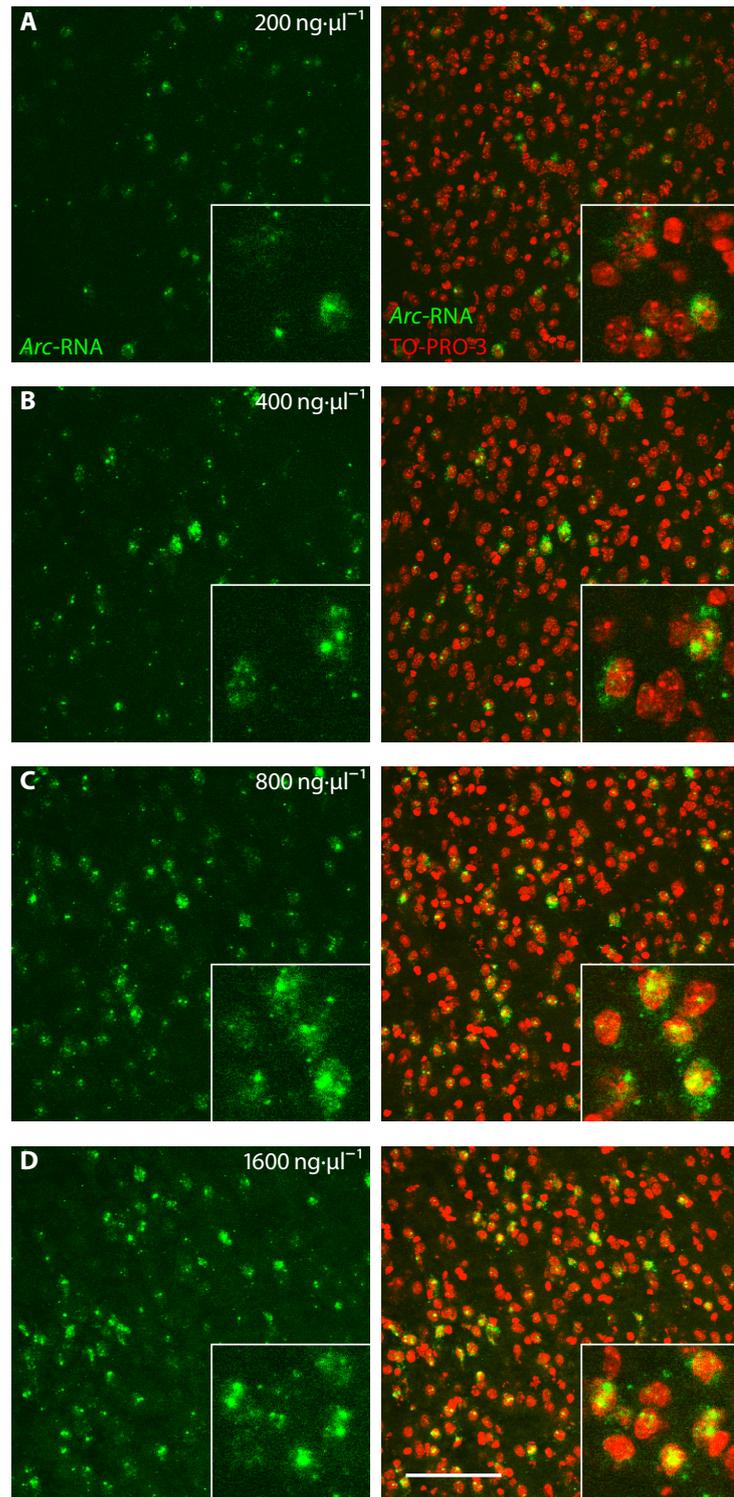


Abbildung 4.7: Optimierung der Konzentration der RNA-Sonde. Zusatz verschiedener Mengen Antisense-RNA-Sonde zum Hybridisierungspuffer. **A:** 200 ng·µl⁻¹ **B:** 400 ng·µl⁻¹ **C:** 800 ng·µl⁻¹ **D:** 1600 ng·µl⁻¹. grün: Arc-RNA, rot: Kernfärbung, Aufnahmen des Hippocampus, Maßstab 100 µm, Ausschnitte dreifach vergrößert

4.1.5 Optimierung der Konzentration der RNA-Sonde

Anschließend sollte die optimale Konzentration der RNA-Sonde ermittelt werden. Die zuvor in händisch durchgeführten *In-situ*-Hybridisierungen zur Detektion von *Arc*-RNA eingesetzte Konzentration lag bei $800 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ Hybridisierungspuffer. Beim Allen-Brain-Atlas^a und EurExpress-Projekt^b, die ebenfalls auf automatisierte *In-situ*-Hybridisierung mittels der Tecan-Plattform setzen, kommen Konzentrationen von 300 bzw. $2000 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ zum Einsatz. Obwohl sich Plattform und Protokoll stark ähneln, sind die Konzentrationen doch sehr verschieden. Deshalb sollte die optimale Konzentration für diese Anwendung empirisch ermittelt werden.

Es wurden vier verschiedene Konzentrationen getestet: 200, 400, 800 und 1600 ng pro Mikroliter Hybridisierungspuffer. Erwartungsgemäß stieg die Intensität der Färbung von der niedrigsten zur höchsten Konzentration an (s. Abb. 4.7). Der stärkste Unterschied war zwischen 200 und $400 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ zu beobachten. Bei weiterer Steigerung der Konzentration erhöhte sich die Intensität nur noch gering, es kam jedoch zu einem überdurchschnittlichen Anstieg der Hintergrundfluoreszenz. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Experimente eine Konzentration der RNA-Sonde von $600 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ gewählt.

4.1.6 Zusammenfassung der Protokolloptimierung

Als Resultat der Protokolloptimierung wurden die Fixierungs- und Nachfixierungsschritte gekürzt und die Proteinase-K-Konzentration stark gesenkt. Die Konzentration der RNA-Sonde wurde in einer Größenordnung gewählt, die auch bei vergleichbaren Experimenten zum Einsatz kommt. Die Verdünnung des Tyramid-Biotins im TSA-Schritt wurde nicht verändert. Auf eine Zugabe von DTT zum Hybridisierungspuffer wurde verzichtet. Schließlich wurde das Protokoll von chromogener Visualisierung mittels NBT und BCIP auf Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen umgestellt. Eine Übersicht der vorgenommenen Änderungen am Hybridisierungsprotokoll findet sich in Tabelle 4.1.

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Optimierung des Detektionsprotokolls, sortiert nach der Position im fertigen Protokoll

Schritt	Ausgangsprotokoll	optimiertes Protokoll
Fixierung	25 min	10 min
Proteinase-K-Konzentration	$0,35 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$	$0,0159 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$
Nachfixierung	$2 \times 10 \text{ min}$	$2 \times 5 \text{ min}$
Konzentration der RNA-Sonde	ABA: ^a $300 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ Eur: ^b $2000 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ DA: ^c $800 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	$600 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$
DTT-Zusatz zum Hybridisierungspuffer	10 mM	keine DTT-Zugabe
Tyramid-Biotin-Verdünnung	1:50 (Herstellerempfehlung)	1:50
Detektion	chromogen mit NBT/BCIP	Fluoreszenzfarbstoffe Cy3, DAPI

In Abbildung 4.8 ist beispielhaft das Resultat einer *In-situ*-Hybridisierung nach Optimierung des Protokolls dargestellt. Die Ausschnitte aus der Großhirnrinde zeigen eine intensive grüne Färbung bei Einsatz der *Arc-antisense*-Sonde (4.8 A), die in Form und Auftreten bereits publizierten Ergebnissen entsprechen.^{124,135} Bei Einsatz der *Arc-sense*-Sonde (4.8 B) und bei Prozessierung ohne Zugabe von RNA-Sonde (4.8 C) war nur sehr schwache Fluoreszenz im grünen Teil des Spektrums zu beobachten, was für

¹²⁴J. F. Guzowski u. a., *Nat Neurosci* 2 (1999), Nr. 12, S. 1120–1124.

¹³⁵B. Desgranges u. a., *PLoS One* 5 (2010), Nr. 4, e10097.

^aAllen Brain Atlas – <http://mouse.brain-map.org>

^bEurExpress – <http://www.eurexpress.org>

^cDiplomarbeit Jonas Töle

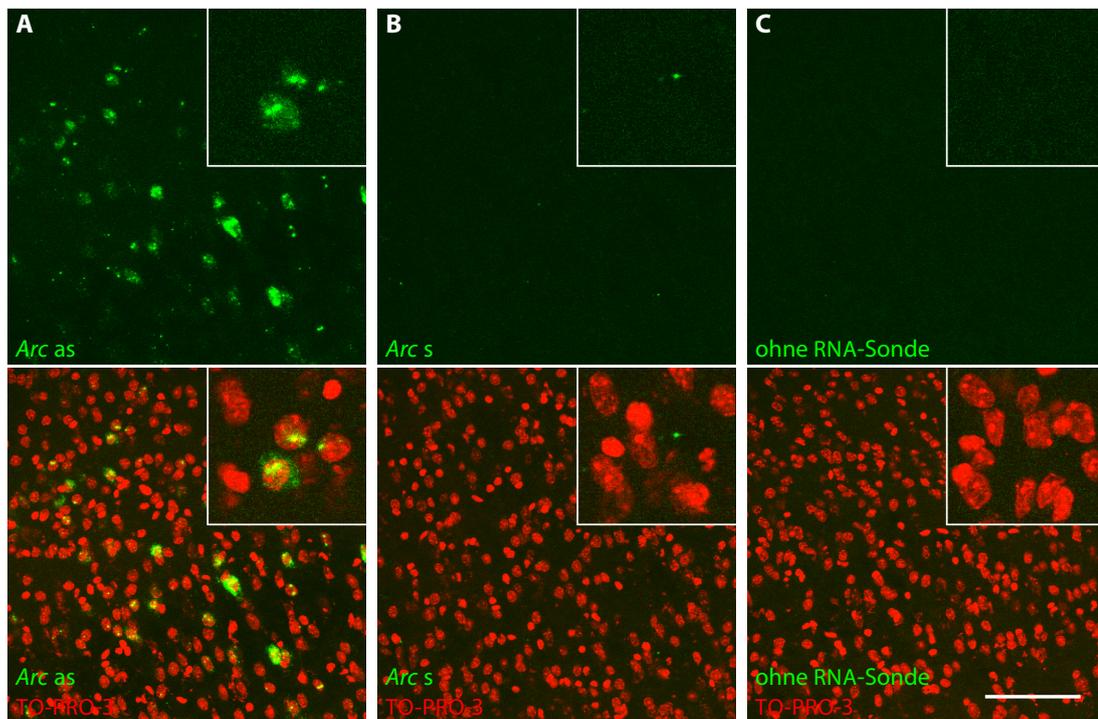


Abbildung 4.8: Ergebnis der Protokolloptimierung. **A:** Hybridisierung mit *Arc-antisense*-Sonde. **B:** Kontrolle mit *Arc-sense*-Sonde. **C:** Kontrolle ohne Zugabe von RNA-Sonde. grün: Fluorescein, rot: TO-PRO-3, Aufnahmen des Neocortex, Maßstab 100 μ m, Ausschnitte dreifach vergrößert

ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis spricht. Lediglich bei der Negativkontrolle mit *Sense*-Sonde traten vereinzelt wenig intensiv fluoreszierende, punktförmige Färbungen auf. Zusätzlich zur Verbesserung der Ergebnisse der *In-situ*-Hybridisierung ergaben sich durch die Änderungen ein kleiner Zeitgewinn durch die Verkürzungen und etwas Einsparung an Material.

4.2 *Arc*-Expression nach einmaliger Stimulation

Um die *Arc*-catFISH-Methode zu etablieren, wurden Mäuse zunächst nur einmal entweder zum Zeitpunkt -5 min oder -30 min stimuliert. Als Stimuli kamen die folgenden Lösungen zum Einsatz. Für umami 0,1 M Natriumglutamat (NaGlu) und 1 M Natriumglutamat mit Zusatz von 0,5 mM Inositolmonophosphat (IMP) und 30 μ M Amilorid (NaGlu +I +A). Als süßer Stimulus wurde 0,5 M Saccharose gewählt (Sacc). Für die Salzstimuli wurden die Konzentrationen 0,1 M (NaCl niedrig) und 0,8 M Natriumchlorid (NaCl hoch) verwendet. Für sauer wurde 30 mM Citronensäure appliziert (Citr). Bitter war mit drei Stimuli vertreten: 0,5 mM Cycloheximid (Cyx), 10 mM Chininhydrochlorid (nachfolgend nur Chinin, Qui) und 1 mM Cucurbitacin I (nachfolgend nur Cucurbitacin, Cuc). Schließlich wurde noch 0,1 M Ammoniumchlorid als, vor allem in elektrophysiologischen Experimenten, häufig eingesetzter Standardstimulus ins Repertoire aufgenommen. Alle Stimuli waren in entionisiertem Wasser mit Zusatz von 25 mM Kaliumchlorid und 0,25 mM NaHCO_3 gelöst. Diese als für Menschen geschmacksneutral beschriebene Lösung wurde in dieser Arbeit auch als Kontrollstimulus (Kontr.) eingesetzt (vgl. auch Tab. 2.7, S. 20).¹³⁹

Repräsentative Resultate der *In-situ*-Hybridisierung zur Detektion der *Arc*-RNA sind in Abbildung 4.9 auf der nächsten Doppelseite dargestellt. Unter den verwendeten Stimuli war lediglich bei den drei Bittersubstanzen Cycloheximid, Chinin und Cucurbitacin eine vermehrte *Arc*-Expression im NTS zu

¹³⁹I. E. de Araujo u. a., *J Neurophysiol* 90 (2003), Nr. 3, S. 1865–1876.

beobachten. Dabei waren die *Arc* exprimierenden Zellen insbesondere im rostro-medialen Teil des NTS lokalisiert (vgl. vergrößerte Ausschnitte in Abb. 4.9 A). Zudem trat in diesen Zellen die *Arc*-RNA fast ausschließlich punktförmig im Zellkern auf, wenn die Tiere 5 min nach der Stimulation getötet wurden. Wurden die Tiere hingegen erst 30 min nach der Stimulation getötet, war die *Arc*-RNA überwiegend nur im Zytoplasma zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass die *Arc*-Expression auf die Stimulation zurückzuführen ist. Bei den übrigen Stimuli zeigte sich kein Unterschied zum Kontrollstimulus, weder bei der Anzahl noch bei der Verteilung der *Arc* exprimierenden Zellen im NTS. Nur vereinzelt kam es zur *Arc*-Expression. Nach der Stimulation zum Zeitpunkt –30 min zeigten sich vergleichbare Ergebnisse wie nach der Stimulation zum Zeitpunkt –5 min, die in Abb. 4.9 gezeigt ist. Daher wird an dieser Stelle auf Beispiele verzichtet.

Die Quantifizierung der *Arc*-Expression bestätigte, dass nur die Stimulation mit Bitterstoffen zu einer verstärkten *Arc*-Expression führte. Bei keinem der anderen Geschmacksstoffe war eine gegenüber dem Kontrollstimulus erhöhte Expression zu beobachten. In Abbildung 4.10 A auf Seite 48 ist die Dichte der *Arc* exprimierenden Zellen unter Berücksichtigung der intrazellulären Lokalisation der *Arc*-RNA gezeigt. Während die Zahl der *Arc* exprimierenden Zellen pro mm² NTS beim Kontrollstimulus und den übrigen Geschmacksstimuli unter 10 liegt, ist sie bei den drei Bitterstimuli deutlich erhöht. Auch befand sich bei den Bitterstimuli der Großteil der *Arc*-RNA in dem Kompartiment, das dem zeitlichen Muster der intrazellulären Verteilung der *Arc*-RNA entspricht, also im Nukleus, wenn die Stimulation 5 min vor der Tötung erfolgte, und im Zytoplasma, wenn 30 min dazwischen lagen. Bei den übrigen Stimuli war diese charakteristische intrazelluläre Verteilung in Abhängigkeit vom Stimulationszeitpunkt, wenn überhaupt, nur schwach ausgeprägt (Abb. 4.10 A).

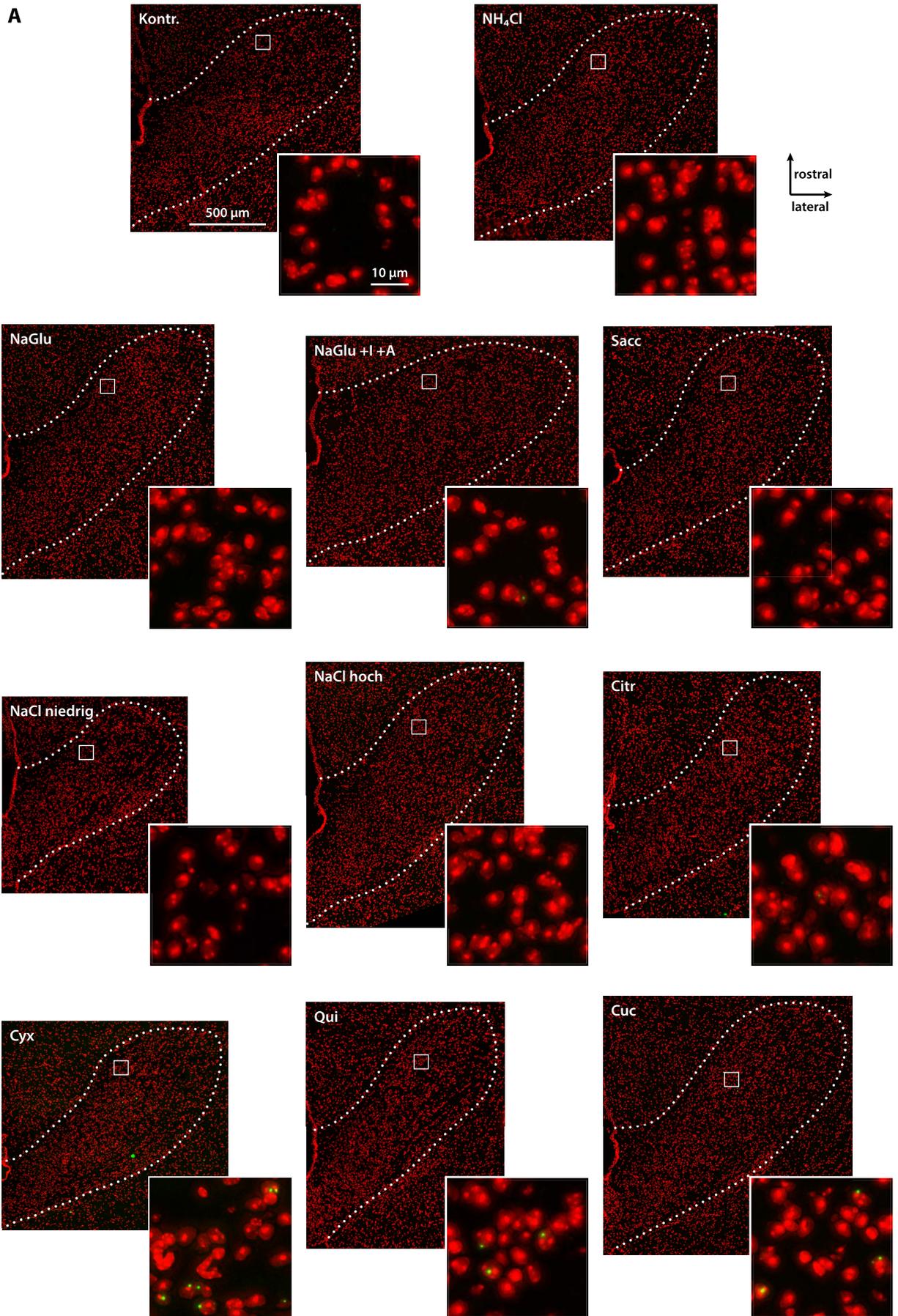
Um die Daten für die nachfolgenden Betrachtungen übersichtlicher zu gestalten, werden im folgenden nur die für den jeweiligen Stimulationszeitpunkt relevanten *Arc* exprimierenden Zellen betrachtet. Für den Zeitpunkt –5 min also nur Zellen, die *Arc*-RNA im Zellkern aufwiesen – auch solche, die *Arc*-RNA in Zellkern und Zytoplasma zeigten (N und N+Z). Für den Zeitpunkt –30 min entsprechend die Zellen, die *Arc*-RNA im Zytoplasma zeigten (Z und N+Z). Dies erlaubt den Vergleich der Expression zwischen den Stimulationszeitpunkten und wird im folgenden als „relevante Expression“ bezeichnet (s. Abb. 4.10 B). Bei Betrachtung der relevanten Expression wird erneut die Sonderstellung der Bitterstimuli deutlich. Ein *t*-Test ergab, dass bei keinem der Stimuli ein signifikanter Unterschied zwischen den relevanten Signalen bestand, die nach Stimulation zum Zeitpunkt –5 min oder –30 min beobachtet wurden. Daher wurden die relevanten Signale für beide Stimulationszeitpunkte zusammengefasst, um die Stimuli untereinander vergleichen zu können (s. Abb. 4.10 C). Die statistische Auswertung mittels Varianzanalyse und paarweisem Vergleich der Mittelwerte nach Holm-Šidák ergab, dass lediglich die Bitterstimuli zu einer stärkeren *Arc*-Expression als der Kontrollstimulus führten. Auch war die *Arc*-Expression gegenüber allen anderen Stimuli erhöht. Unter den Bitterstimuli jedoch gab es keine signifikanten Unterschiede. Keiner der übrigen Stimuli führte zu einer signifikant erhöhten *Arc*-Expression gegenüber dem Kontrollstimulus oder einem der anderen Stimuli. Die Ergebnisse der Varianzanalyse sind in Abb. 4.10 D aufgeführt.

4.2.1 Verteilung der *Arc* exprimierenden Zellen im NTS

Da bereits bei Betrachtung der Rohdaten (vgl. Abb. 4.9) eine ungleiche Verteilung der *Arc* exprimierenden Zellen im NTS nach Stimulation mit den Bittersubstanzen aufgefallen war, sollte diese nun untersucht werden. Bei den übrigen Stimuli wurde auf die Verteilungsanalyse verzichtet, weil in keinem Fall eine offensichtliche Ungleichverteilung der *Arc* exprimierenden Zellen zu beobachten und die Expression insgesamt sehr schwach war. Einzige Ausnahme war der Kontrollstimulus, dessen Daten zum Vergleich herangezogen wurden.

Zur Verdeutlichung der Ungleichverteilung der *Arc*-Signale ist in Abbildung 4.11 auf Seite 49 eine Überlagerung aller untersuchten Horizontalschnitte eines Tieres dargestellt, das zum Zeitpunkt –5 min mit Cycloheximid stimuliert wurde. Die *Arc* exprimierenden Zellen befinden sich zum größten Teil entlang der medialen Ränder des NTS. Ein vergleichbares Muster wurde von Susan Travers und Kollegen

4 Ergebnisse



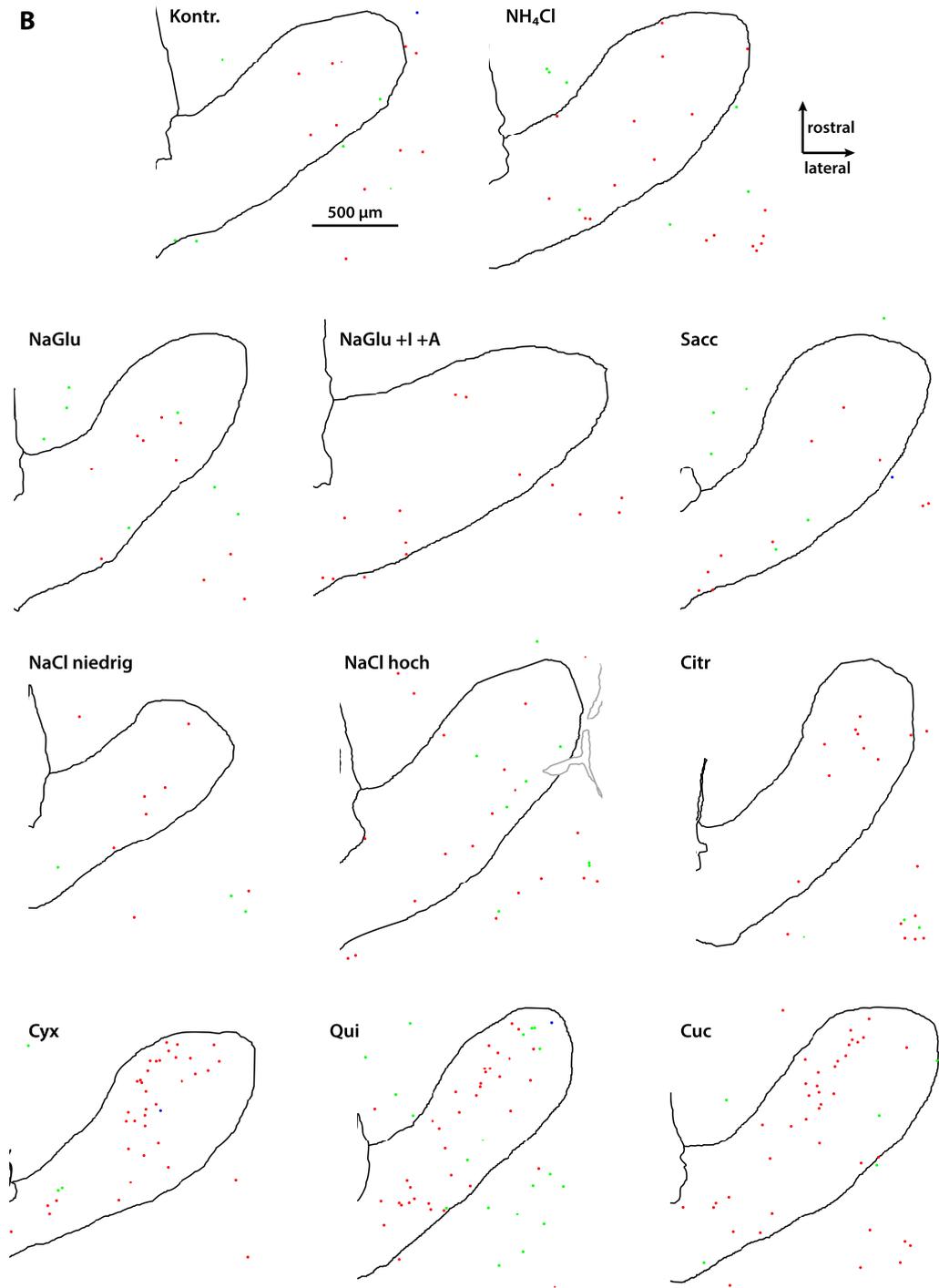


Abbildung 4.9: Arc-Expression im NTS nach einmaliger Stimulation. Beispielhaft ist die Arc-Expression nach Stimulation zum Zeitpunkt -5 min gezeigt. Die Abkürzungen der Stimuli sind in Abschnitt 4.2 erläutert. **A:** Repräsentative Ergebnisse der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen. Die gepunktete Linie markiert den Umriss des NTS, die Mittellinie befindet sich jeweils am linken Bildrand. In rot ist die Kernfärbung durch DAPI und in grün die Arc-RNA markiert. Die Ausschnitte liegen im gustatorischen NTS. **B:** Ergebnisse der Auszählung der in A dargestellten Schnitte. Farbige Punkte markieren Zellen, die Arc exprimieren, rot: nukleäre, grün: zytoplasmatische, blau: nukleäre und zytoplasmatische Lokalisation der Arc-RNA. Die Mittellinie befindet sich jeweils am linken Bildrand. schwarz: Umriss von NTS und Ventrikelsystem, grau: Defekte im Gewebe

4 Ergebnisse

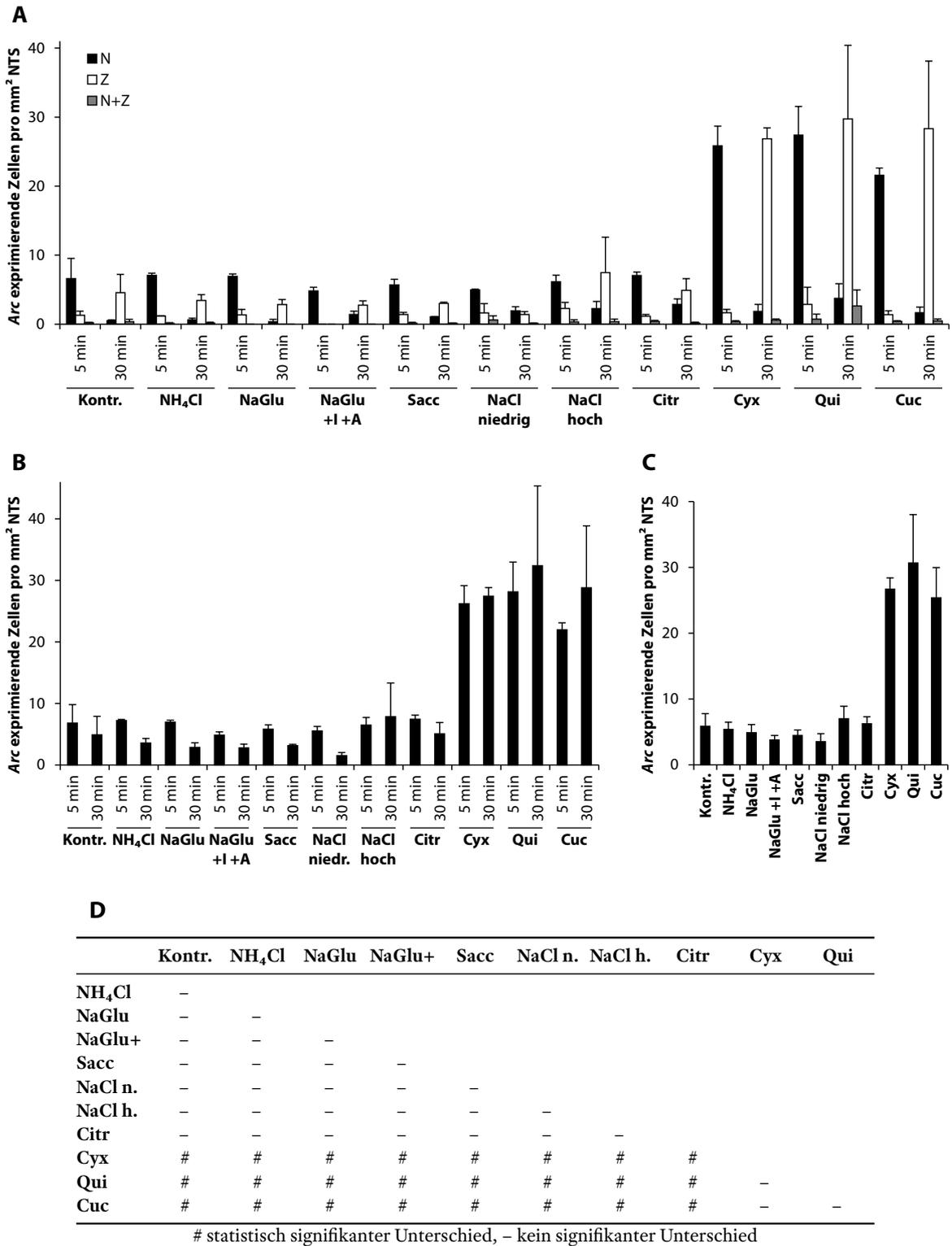


Abbildung 4.10: Arc-Expression im NTS nach einmaliger Stimulation. **A:** Intrazelluläre Verteilung der Arc-RNA, schwarz: nukleär (N), weiß: zytoplasmatisch (Z), grau: nukleär und zytoplasmatisch (N+Z). n = 2–3 **B:** Expression, die dem Stimulationszeitpunkt entspricht: für –5 min nur Neurone, die Arc-RNA im Nucleus zeigten, und für –30 min nur Neurone, die Arc-RNA im Zytoplasma aufwiesen („relevante Expression“). n = 2–3 **C:** Zusammengefasste Werte der relevanten Expression beider Stimulationszeitpunkte. n = 4–6. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte der Arc exprimierenden Zellen pro mm² NTS und Standardfehler. **D:** Statistische Analyse der in C dargestellten Daten. Die durch verschiedene Stimuli induzierte „relevante“ Arc-Expression wurde mittels Varianzanalyse und nachfolgendem paarweisen Vergleich nach Holm-Šidák auf Unterschiede überprüft.

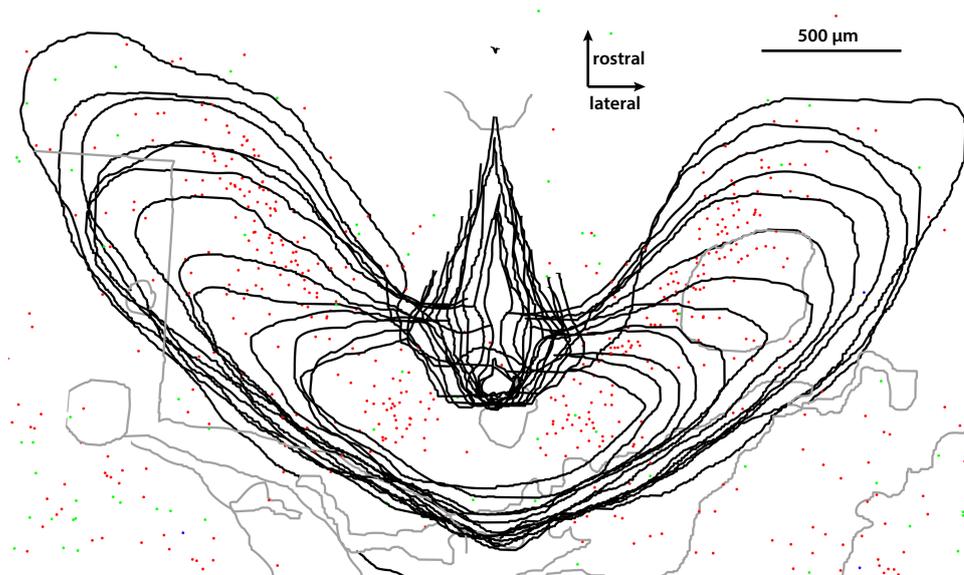


Abbildung 4.11: Verteilung der *Arc* exprimierenden Zellen im NTS nach einmaliger Stimulation mit Cycloheximid zum Zeitpunkt -5 min. Überlagerung der Horizontalschnitte, für die die *Arc*-Expression bestimmt wurde. Der Abstand der einzelnen Ebenen betrug $14\ \mu\text{m}$. Farbige Punkte markieren Zellen, die *Arc* exprimieren, rot: nukleäre, grün: zytoplasmatische, blau: nukleäre und zytoplasmatische Lokalisation der *Arc*-RNA. schwarz: Umriss von NTS und Ventrikelsystem, grau: Defekte im Gewebe

nach Stimulation von Ratten mit Chinin beobachtet.⁵⁷ Allerdings wurde in jener Studie *Fos*-Expression als neuronaler Aktivitätsmarker eingesetzt. Eine weitere Häufung tritt im caudalen NTS auf, wobei auffällig ist, dass die Bereiche um die Mittellinie ausgespart bleiben.

Zur Quantifizierung der Verteilung innerhalb des NTS wurden zwei Arten der Unterteilung herangezogen. Zum einen wurde die klassische Unterscheidung in einen rostralen und einen caudalen Teil vorgenommen. Dies geschah anhand des Punktes, an dem die mediale Kante des NTS auf den vierten Ventrikel trifft. Zum anderen wurde der NTS nach den oben beschriebenen geometrischen Gesichtspunkten in sechs Felder unterteilt, um auch der medio-lateralen Verteilung Rechnung zu tragen. Die Methoden der Unterteilung sind detailliert in Abschnitt 3.5.3 auf Seite 32 beschrieben und dort in Abbildung 3.11 illustriert.

Die Auszählung der *Arc* exprimierenden Zellen in den einzelnen NTS-Unterteilungen bestätigte die ungleiche Verteilung bei allen drei Bitterstimuli (s. Abb. 4.12 A). Von den sechs Feldern, wiesen die rostro-medial gelegenen Felder S1 und S2 die höchste Dichte an *Arc* exprimierenden Zellen auf, wobei die Unterschiede im Falle von Chinin weniger deutlich waren. Bei der weitaus geringeren Expression nach Applikation des Kontrollstimulus zeigten sich nur geringe Dichteunterschiede. Eine leichte Häufung war hier in den rostro-lateralen Feldern S4 und S5 zu beobachten. Eine Varianzanalyse ergab, dass die Dichte der *Arc* exprimierenden Zellen nach Applikation von Cycloheximid und Chinin in den Felder S1, S2 und S3 signifikant erhöht war. Nach Cucurbitacin-Stimulation war dies nur im Feld S1 der Fall. Außerdem zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Dichte im Feld S1 zwischen Chinin und Cucurbitacin. In allen anderen Fällen lag kein statistisch signifikanter Unterschied vor.

Um einen Vergleich zwischen der klassischen Unterscheidung des gustatorischen und nichtgustatorischen NTS mit der hier vorgestellten neuartigen Unterteilung ziehen zu können, wurden die Felder S1 und S2, die gemeinsam den Großteil der *Arc* exprimierenden Zellen aufwiesen, zusammengefasst und den übrigen Feldern S3 bis S6 gegenübergestellt (s. Abb. 4.12 B). Es sei angemerkt, dass in dieser Arbeit die gängige Bezeichnung des rostralen NTS als gustatorischer NTS und des caudalen NTS als nichtgustatorischer NTS verwendet wird. Der Einfachheit halber werden diese Bezeichnungen auf die neuartige

⁵⁷S. P. Travers, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282 (2002), Nr. 6, R1798–1810.

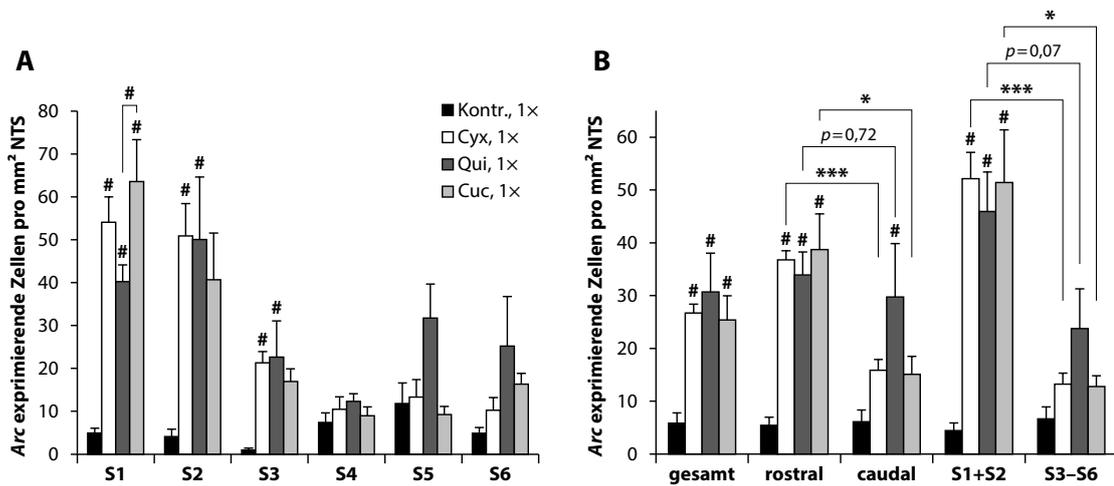


Abbildung 4.12: Verteilung der Arc exprimierenden Zellen in den Unterteilungen des NTS nach einmaliger Stimulation. Zu den Unterteilungen siehe Abb. 3.11, S. 33 **A:** Die Verteilung auf die Felder S1 bis S6 ist für die einmalige Stimulation mit Kontrollstimulus (Kontr.), Cycloheximid (Cyx), Chinin (Qui) und Cucurbitacin (Cuc) dargestellt. **B:** Vergleich der klassischen Einteilung des NTS in einen rostralen und caudalen Teil mit der neuartigen Aufteilung in sechs Felder. Innerhalb der Einteilungen wurde mittels Varianzanalyse und Posthoc-Test nach Holm-Šidák auf Unterschiede getestet (# signifikant unterschiedliche Mittelwerte). Innerhalb der Stimuli wurde der *t*-Test angewendet (* $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$). Unter *gesamt* ist die Dichte der Arc-Expression im gesamten NTS aufgetragen. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte der Arc exprimierenden Zellen pro mm^2 NTS und Standardfehler. $n = 4-6$

Unterteilung ausgedehnt. Wenn im Zusammenhang mit dieser vom gustatorischen NTS die Rede ist, sind die Felder S1 und S2 gemeint, beim nichtgustatorischen NTS entsprechend die Felder S3 bis S6. Das bedeutet nicht, dass in den als gustatorischer NTS bezeichneten Gebieten ausschließlich gustatorische Verarbeitung stattfindet. Umgekehrt ist eine gustatorische Verarbeitung in den als nichtgustatorischer NTS bezeichneten Gebieten nicht ausgeschlossen. Es gelten die in Abschnitt 1.1.3 auf Seite 5 angeführten Limitierungen bei der funktionellen Unterteilung des NTS.

Bei der klassischen Unterteilung finden sich relativ geringe Unterschiede in der Signaldichte. Für Cycloheximid und Cucurbitacin ist diese etwa zweimal höher im rostralen als im caudalen NTS. Bei Chinin war kaum ein Unterschied festzustellen. Chinin war auch der einzige Stimulus, bei dem die Signaldichte im caudalen NTS signifikant höher war als beim Kontrollstimulus. Bei der neuartigen Unterteilung sind die Unterschiede deutlich ausgeprägter. Die Signaldichte in S1 und S2 ist für Cycloheximid und Cucurbitacin etwa vierfach und für Chinin etwa zweifach höher. Damit offenbart sich mit der neuen Unterteilungsmethode ein Unterschied, der mit der klassischen Methode verborgen bleibt. Um die Ergebnisse statistisch abzusichern wäre allerdings die Untersuchung von weiteren Tieren nötig, da bei Stimulation mit Chinin eine vergleichsweise hohe Varianz auftrat. Die Signaldichte nach Kontrollstimulation zeigte in beiden Fällen keine Unterschiede.

Schließlich wurde die Anzahl aktivierter Zellen pro Gesamt-NTS extrapoliert. Hierzu wurde zunächst die durchschnittliche Fläche des Gesamt-NTS und der jeweiligen Unterteilungen bestimmt und mit der jeweiligen Dichte Arc exprimierender Zellen multipliziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Wie bei den Ergebnissen der Signaldichte liegen die absoluten Zahlen bei Bitterstimulation deutlich höher als bei den übrigen Stimuli. Nach Bitterstimulation zeigen etwa vier- bis fünfmal mehr Zellen Arc-Expression, als wenn ein anderer Geschmacksstoff appliziert wurde. Im Gegensatz zum Kontrollstimulus war nach Bitterstimulation ein überdurchschnittlicher Anteil der Arc exprimierenden Zellen in den gustatorischen Subregionen konzentriert. Dies war bei Cycloheximid und Cucurbitacin stärker ausgeprägt als bei Chinin, wo insgesamt etwas weniger als die Hälfte der Arc exprimierenden Zellen in den gustatorischen Anteilen auftrat.

Obwohl sich die Dichte Arc exprimierender Zellen im NTS nach Bitterstimulation nicht zwischen den

Tabelle 4.2: Die Anzahl der Arc exprimierenden Zellen pro Tier und der Standardfehler wurden anhand der Signaldichte und der durchschnittlichen NTS-Fläche extrapoliert. Unter *gesamt* sind die Daten der beiden Stimulationspunkte zusammengefasst. n = 4–6

Stimulus	Zeitpunkt	Anzahl Tiere	Arc ⁺ -Zellen pro Tier		
			gesamt	rostral	S1+S2
Kontr.	-5 min	3	204 ± 86	81 ± 26	62 ± 21
	-30 min	3	137 ± 75	36 ± 16	30 ± 15
	gesamt	6	171 ± 53	58 ± 17	46 ± 13
NH ₄ Cl	-5 min	2	212 ± 6		
	-30 min	2	106 ± 12		
	gesamt	4	159 ± 31		
NaGlu	-5 min	2	209 ± 12		
	-30 min	2	81 ± 10		
	gesamt	4	145 ± 38		
NaGlu +I +A	-5 min	2	122 ± 14		
	-30 min	2	105 ± 3		
	gesamt	4	114 ± 7		
Sacc	-5 min	2	182 ± 25		
	-30 min	2	106 ± 7		
	gesamt	4	144 ± 25		
NaCl niedrig	-5 min	2	181 ± 52		
	-30 min	2	87 ± 28		
	gesamt	4	134 ± 36		
NaCl hoch	-5 min	3	221 ± 53		
	-30 min	2	255 ± 112		
	gesamt	5	235 ± 47		
Citr	-5 min	2	217 ± 23		
	-30 min	2	200 ± 27		
	gesamt	4	208 ± 15		
Cyx	-5 min	3	704 ± 77	472 ± 10	455 ± 39
	-30 min	2	741 ± 10	578 ± 17	515 ± 99
	gesamt	5	719 ± 43	511 ± 14	477 ± 39
Qui	-5 min	2	784 ± 186	422 ± 48	402 ± 83
	-30 min	3	914 ± 381	367 ± 81	410 ± 130
	gesamt	5	862 ± 219	386 ± 48	405 ± 76
Cuc	-5 min	2	590 ± 44	340 ± 15	361 ± 34
	-30 min	2	770 ± 275	509 ± 88	528 ± 178
	gesamt	4	680 ± 125	416 ± 65	437 ± 89

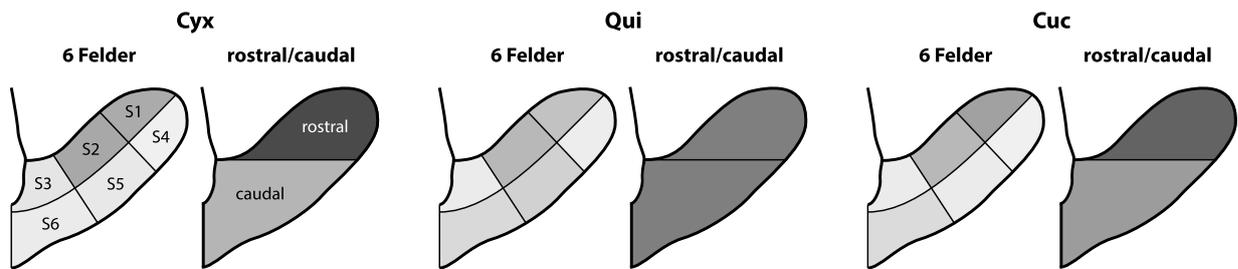


Abbildung 4.13: Prozentuale Verteilung der Signale auf die NTS-Unterteilungen. Eine Heatmap stellt die prozentuale Verteilung der gesamten *Arc* exprimierenden Zellen (grau) auf die NTS-Unterteilungen dar. Bei allen drei Bitterstoffen tritt eine Häufung in den rostro-medialen Feldern S1 und S2 auf. Dies ist bei Cycloheximid (Cyx) besonders stark ausgeprägt. Bei Cucurbitacin (Cuc) sind die Zellen vorwiegend in S1 lokalisiert, während bei Chinin (Qui) die Konzentrierung auf den rostro-medialen Teil weniger stark ausfällt. Das trifft auch auf die Unterteilung in rostral und caudal zu, die bei Cyx und Cuc deutlich ausgeprägt, bei Qui hingegen nicht vorhanden ist. Hier zeigen sich erneut die Vorteile der neuen Unterteilungsmethode, die Muster offenbart, etwa im Fall von Qui, die mit der klassischen verborgen bleiben. $n = 4-6$

Bitterstimuli unterscheidet, zeigte die Verteilung der *Arc* exprimierenden Zellen bereits Unterschiede zwischen den Bitterstoffen. Um diese Unterschiede deutlicher darzustellen, wurde die prozentuale Verteilung der *Arc* exprimierenden Zellen auf die NTS-Subregionen in Form einer Heatmap aufgetragen (s. Abb. 4.13). Die Grauwerte repräsentieren den prozentualen Anteil der *Arc*-Signale in der jeweiligen Subregion. Die Skala reicht von weiß bei 0 % bis schwarz bei 100 %. Während bei Cycloheximid und Cucurbitacin die Häufung in den rostro-medialen Subfeldern S1 und S2 besonders ausgeprägt ist, tritt bei Chinin auch ein relativ großer Prozentsatz der Signale in den Feldern S5 und S6 auf. Auch bei der Einteilung in einen rostralen und caudalen NTS sind Unterschiede in der Verteilung sichtbar. Die nach Cycloheximid-Stimulation auftretenden Signale sind besonders stark im rostralen NTS konzentriert. Bei Cucurbitacin ist diese Verteilung bereits schwächer und bei Chinin nicht mehr vorhanden. Dies weist bereits darauf hin, dass je nach Bitterstimulus unterschiedliche Zellen aktiviert werden.

4.3 *Arc*-Expression nach zweimaliger Stimulation mit Saccharose und Citronensäure

Um auszuschließen, dass die ausbleibende *Arc*-Expression nach Stimulation mit nicht bitteren Geschmacksstoffen durch zu schwache Stimuli bedingt war, wurden zusätzlich Mäuse mit hochkonzentrierten Lösungen stimuliert. Für diesen Teilversuch wurden Saccharose und Citronensäure ausgewählt, um jeweils einen attraktiven und einen aversiven Stimulus abzudecken. Die Saccharoselösungen wurden mit Konzentrationen von 1 M und 1,5 M angesetzt und Citronensäure in einer Konzentration von 0,1 M. Zudem wurden die Stimuli zweimal im Abstand von 25 min appliziert, wie in Abschnitt 3.2 auf Seite 27 beschrieben. Zum Vergleich wurden zudem Cycloheximid und der Kontrollstimulus herangezogen, die ebenfalls zweimal appliziert wurden.

Wie in Abbildung 4.14 an repräsentativen Beispielen gezeigt, kam es nur nach zweimaliger Applikation von Cycloheximid zu einer verstärkten *Arc*-Expression im NTS. Nach zweimaliger Stimulation mit den hochkonzentrierten Saccharose- oder Citronensäurelösungen war weder eine auffällige Erhöhung noch eine Häufung der *Arc*-Expression zu beobachten, wie dies bei zweimaliger Applikation von Cycloheximid der Fall war. Auch die Quantifizierung der *Arc*-Signale im NTS bestätigte, dass keiner der Stimuli außer Cycloheximid zu einer signifikant erhöhten *Arc*-Expression im NTS führte (s. Abb. 4.15 A). Die Untersuchung der intrazellulären Verteilung der *Arc*-RNA zeigte zudem, dass, wie beim Kontrollstimulus, nur ein sehr geringer Anteil der Zellen *Arc*-RNA in beiden Kompartimenten, Nukleus und Zytoplasma, aufwies und daher durch beide Stimuli aktiviert wurde (s. Abb. 4.15 B). Dies spricht ebenfalls dagegen, dass es sich bei den *Arc* exprimierenden Zellen um solche handelt, die spezifisch auf die Geschmacksstimuli

4.3 Arc-Expression nach zweimaliger Stimulation mit Saccharose und Citronensäure

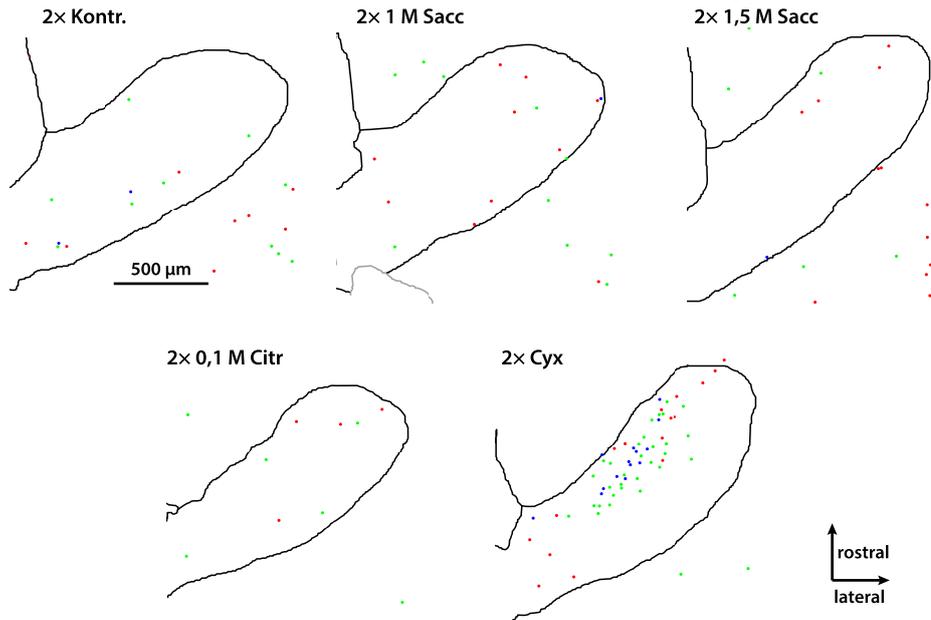


Abbildung 4.14: Arc-Expression im NTS nach zweimaliger Stimulation mit Saccharose und Citronensäure. Repräsentative Ergebnisse nach zweimaliger Stimulation 5 min und 30 min vor der Gehirnentnahme mit Kontrollstimulus (Kontr.), 1 M bzw. 1,5 M Saccharose (Sacc), 0,1 M Citronensäure (Citr) und Cycloheximid (Cyx) zum Vergleich. Farbige Punkte markieren Zellen, die Arc exprimieren, rot: nukleäre, grün: zytoplasmatische, blau: nukleäre und zytoplasmatische Lokalisation der Arc-RNA. Die Mittellinie befindet sich jeweils am linken Bildrand. schwarz: Umriss von NTS und Ventrikelsystem, grau: Defekte im Gewebe

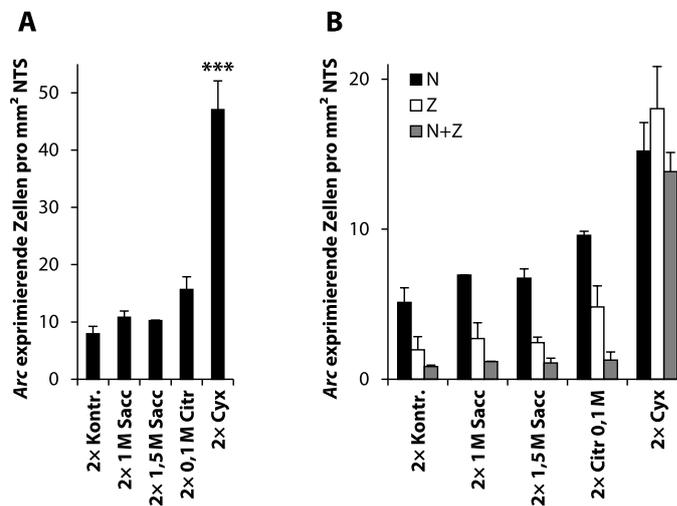


Abbildung 4.15: Arc-Expression nach zweimaliger Stimulation mit Saccharose und Citronensäure. Zum Vergleich ist auch die Expression nach Applikation von Kontrollstimulus und Cycloheximid dargestellt. **A:** Gesamtdichte aller Arc-exprimierenden Zellen. Auf Unterschiede zwischen Geschmacksstimuli und Kontrollstimulus wurde mittels *t*-Test getestet (***) $p \leq 0,001$ **B:** Dichte der Arc-exprimierenden Zellen, aufgeschlüsselt nach intrazellulärer Verteilung der Arc-RNA, schwarz: nukleär (N), weiß: zytoplasmatisch (Z), grau: nukleär und zytoplasmatisch (N+Z). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte der Arc-exprimierenden Zellen pro mm² NTS und Standardfehler. $n = 2-6$

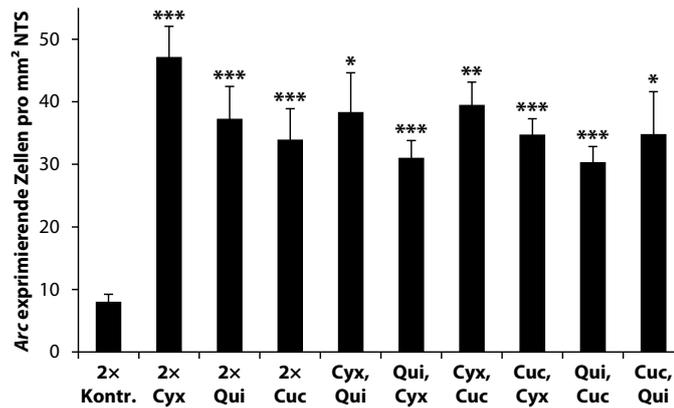


Abbildung 4.16: Arc-Expression nach zweimaliger Stimulation mit Bitterstoffen. Die Dichte der Arc exprimierenden Zellen im gesamten NTS ist für alle Stimulationsprotokolle – zweimalige Applikation desselben sowie Kombinationen verschiedener Bitterstimuli – und Kontrollstimulation (Kontr.) dargestellt. Sowohl die zweimalige Applikation desselben Bitterstimulus (Balken 2–4) als auch die Applikation von zwei verschiedenen Bitterstimuli zu den Stimulationszeitpunkten (Balken 5–10) führte zu einer signifikant erhöhten Arc-Expression im Vergleich zum Kontrollstimulus (Balken 1). Unter den Stimuli gab es keine signifikanten Unterschiede. Auf Unterschiede zwischen Kontrollstimulus und Bitterstimuli wurde mittels *t*-Test getestet (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$), Unterschiede zwischen den Bitterstimuli wurden mittels Varianzanalyse überprüft. Dargestellt sind die Mittelwerte der Arc exprimierenden Zellen pro mm² NTS und Standardfehler. $n = 4-9$

Saccharose bzw. Citronensäure ansprechen. Im Falle von Cycloheximid dagegen war der Anteil der zweimal aktivierten Zellen deutlich erhöht.

4.4 Arc-Expression nach zweimaliger Stimulation mit Bitterstoffen

Nachdem die bisherigen Experimente ergeben hatten, dass nur die Stimulation mit Bitterstoffen zu einer signifikant erhöhten Arc-Expression im NTS führt, sollte nun die Arc-catFISH-Methode angewandt werden, um die Verarbeitung der Bittergeschmacksinformation im NTS zu untersuchen. Hierzu wurden Mäuse zu beiden Zeitpunkten mit Bitterstoffen stimuliert. Dabei wurde den Mäusen entweder zu beiden Zeitpunkten derselbe Stimulus präsentiert (2x Cyx etc.) oder sie wurden an beiden Zeitpunkten mit einem anderen Bitterstoff stimuliert. Hierbei wurden alle möglichen Kombinationen der drei Bitterstoffe eingesetzt: Cyx/Qui, Cyx/Cuc und Qui/Cuc. Für jede Kombination wurden beide möglichen Reihenfolgen genutzt (Cyx, Qui und Qui, Cyx etc.).

Die zweimalige Applikation von Bitterstoffen führte in jedem Fall zu einer signifikant erhöhten Arc-Expression im gesamten NTS im Vergleich zur zweimaligen Applikation des Kontrollstimulus (s. Abb. 4.16). Eine Varianzanalyse ergab, dass zwischen den Bitterstimuli keine signifikanten Unterschiede auftraten. Dennoch war eine Tendenz erkennbar, dass unter allen Bitterstimuli Cycloheximid die stärkste Expression hervorrief.

Schlüsselt man die Dichte der Arc exprimierenden Zellen anhand der intrazellulären Verteilung der Arc-RNA auf, so zeigt sich ein uneinheitliches Bild (s. Abb. 4.17). Sowohl in den Fällen, in denen zweimal derselbe Stimulus gegeben wurde, als auch nach Applikation zweier verschiedener Bitterstoffe, lag nur bei einem Teil der Arc exprimierenden Zellen Arc-RNA in beiden Kompartimenten vor. Demnach wurde nur ein Teil der Zellen durch beide Stimuli aktiviert, selbst wenn es sich dabei zweimal um dieselbe Substanz handelte. Es ist jedoch der Trend zu beobachten, dass die Dichte zweimal aktivierter Zellen von 2x Cyx hin zu den Kombinationen abnimmt. Auch bei den übrigen Zellen, die nur durch einen der Stimuli zur Expression von Arc angeregt wurden, variiert die Dichte zwischen den Stimuli. Bei manchen Stimuluskombinationen überwiegen Zellen, die Arc-RNA im Nukleus aufweisen, bei anderen solche mit Arc-RNA nur im Zytoplasma. Besonders auffällig ist das Muster nach zweimaliger Stimulation mit

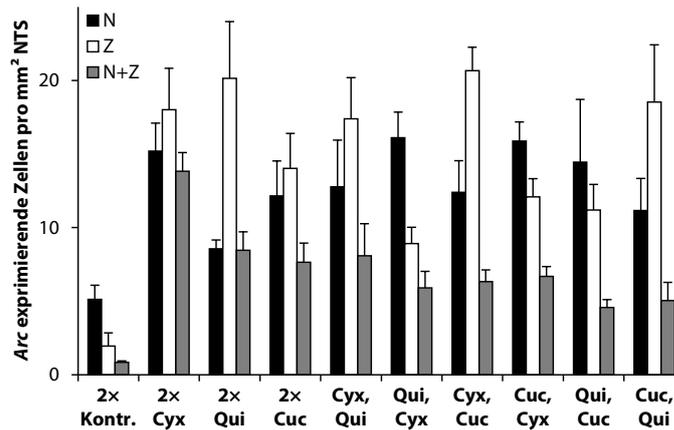


Abbildung 4.17: Arc-Expression nach zweimaliger Stimulation mit Bitterstoffen. Die Arc exprimierenden Zellen sind nach der intrazellulären Verteilung der Arc-RNA aufgeschlüsselt: schwarz: nukleär (N), weiß: zytoplasmatisch (Z), grau: nukleär und zytoplasmatisch (N+Z). Bei allen Stimuli wurde nur ein Teil der Zellen durch beide Stimuli aktiviert, was sich durch das Auftreten von Arc-RNA in Nukleus und Zytoplasma äußert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Arc exprimierenden Zellen pro mm² NTS und Standardfehler. n = 4–6

Chinin. Im Gegensatz zu den beiden anderen Fällen, bei denen zweimal derselbe Stimulus appliziert wurde, traten hier besonders viele Zellen auf, die Arc-RNA im Zytoplasma aufwiesen und demnach nur durch den ersten Stimulus aktiviert wurden. Eine genaue Betrachtung der Zellen, die nur durch einen der Stimuli aktiviert wurden, findet sich in Abschnitt 4.4.2.

4.4.1 Verteilung der Arc exprimierenden Zellen im NTS

Wie nach einmaliger Stimulation ist auch die durch zweimalige Stimulation hervorgerufene Arc-Expression nicht gleichmäßig im NTS verteilt, sondern zeigt deutliche Häufungen (vgl. Abb. 4.14). Aus diesem Grund sollte auch hier die Verteilung der Arc-RNA auf die NTS-Unterteilungen untersucht werden. Da für die folgenden Auswertungen nur solche Zellen ausschlaggebend sind, die durch beide Stimuli aktiviert wurden, wird die Verteilung nur für jene Zellen gezeigt. Die Verteilung bei Betrachtung aller Arc exprimierenden Zellen war jedoch vergleichbar.

Wie bei den einmal bitterstimulierten Tieren ist die höchste Dichte der durch beide Stimuli aktivierten Zellen in den rostro-medialen Feldern S1 und S2 zu beobachten (s. Abb. 4.18). Wurde zweimal derselbe Stimulus appliziert, ist die Dichte der Arc exprimierenden Zellen in allen Fällen signifikant höher als beim Kontrollstimulus. Im Falle von zweimaliger Stimulation mit Cycloheximid trat auch in Feld S3 eine signifikante Steigerung der Arc-Expression auf, nicht aber bei den beiden anderen Bitterstimuli. Im Feld S2 war die Dichte Arc exprimierender Zellen nach zweimaliger Cycloheximid-Stimulation zudem signifikant höher als bei 2×Qui oder 2×Cuc. Im Übrigen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Bitterstimuli (Abb. 4.18 A). Die Verteilung der Arc-Signale für die Bitterkombinationen ist in Abbildung 4.18 B aufgeführt. Da sich keine großen Unterschiede zwischen den beiden Stimulationsreihenfolgen der Stimuluskombinationen zeigten, wurden die Daten eines Stimuluspaars zusammengefasst. Die zusammengefassten Daten sind mit einem Schrägstrich gekennzeichnet (Cyx, Qui und Qui, Cyx wurden zu Cyx/Qui vereint etc.) und finden sich in Abbildung 4.18 C. Auch bei den Stimuluskombinationen ist die größte Dichte der zweimal aktivierten Zellen in den rostro-medialen Feldern S1 und S2 zu beobachten. Allerdings ist die Dichte für die Qui/Cuc-Kombinationen in S2 nicht signifikant höher als beim Kontrollstimulus. Bei der Cyx/Qui-Kombination ist hingegen auch die Dichte in Feld S3 signifikant erhöht. Unter den Kombinationen trat in keinem Feld ein signifikanter Unterschied auf. Vergleicht man Abbildung 4.18 A und C fällt auf, dass die Dichte der zweimal aktivierten Zellen bei den Stimuluskombinationen insgesamt etwas geringer war als die Dichte zweimal aktivierter Zellen, wenn zweimal derselbe Stimulus präsentiert wurde.

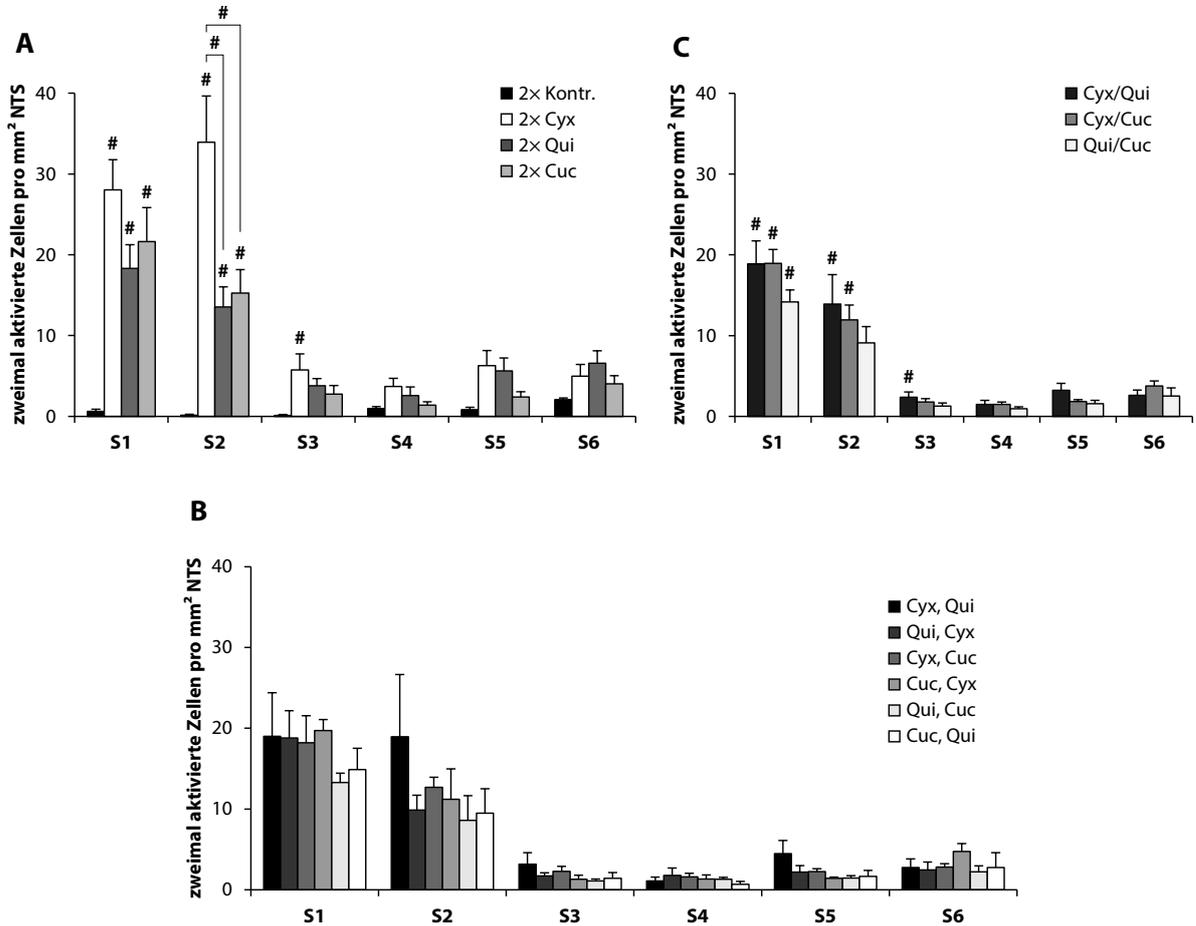


Abbildung 4.18: Verteilung der zweimal aktivierten Zellen auf die Subregionen des NTS. **A:** Nach zweimaliger Applikation desselben Bitterstimulus ist der überwiegende Teil der durch beide Stimuli aktivierten Zellen in den rostro-medialen Subfeldern S1 und S2 konzentriert. Im Feld S2 treten zudem Unterschiede der Signaldichte zwischen Cycloheximid (Cyx) und Chinin (Qui) sowie zwischen Cyx und Cucurbitacin (Cuc) auf. $n = 6-9$ **B:** Die Verteilung auf die Subregionen nach Applikation zweier verschiedener Bitterstimuli ist nicht abhängig von der Reihenfolge der Stimuli. $n = 4-5$ **C:** Die Daten beider Reihenfolgen einer Bitterkombination wurden zusammengefasst (Cyx, Qui und Qui, Cyx werden zu Cyx/Qui etc.). Auch bei den Bitterkombinationen befindet sich der Großteil der durch beide Stimuli aktivierten Zellen in den Subregionen S1 und S2. $n = 8-9$. Mittels Varianzanalyse wurde auf Unterschiede zwischen den Stimuli innerhalb der Subregion getestet (# signifikant unterschiedliche Mittelwerte). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte der zweimal aktivierten Zellen pro mm^2 NTS und Standardfehler.

4.4 Arc-Expression nach zweimaliger Stimulation mit Bitterstoffen

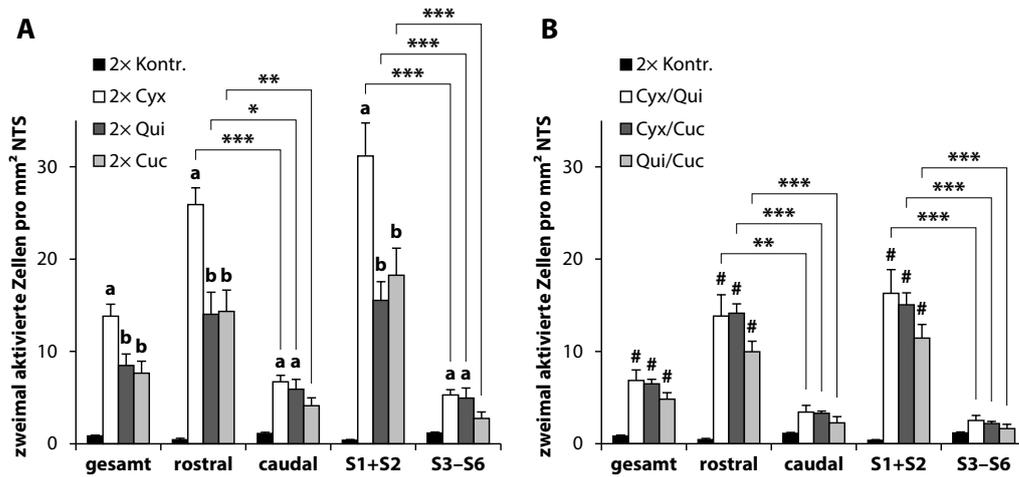


Abbildung 4.19: Vergleich der klassischen und neuen Unterteilung des NTS nach zweimaliger Stimulation mit Bitterstoffen. **A:** Nach zweimaliger Applikation desselben Bitterstoffes ist ein klarer Unterschied der Signaldichte zwischen den gustatorischen und nichtgustatorischen NTS-Teilen zu beobachten. Die Aufteilung nach der neuen Methode führt zu deutlicheren Unterschieden als die klassische Aufteilung. Die Dichte zweimalig aktivierter Zellen unterscheidet sich nicht nach Kontrollapplikation. $n = 6-9$ **B:** Auch im Falle der Bitterstimuluskombinationen treten Unterschiede zwischen gustatorischem und nichtgustatorischem NTS deutlicher mit der neuen Methode zutage. $n = 6-9$. Mittels Varianzanalyse wurde auf Unterschiede zwischen den Stimuli innerhalb der Subregion getestet. a, b, # signifikant unterschiedlich gegenüber Kontrollstimulus. Innerhalb der Stimuli, wurde der t -Test angewendet (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte der zweimal aktivierten Zellen pro mm^2 NTS und Standardfehler.

Auch für den Fall zweimaliger Bitterstimulation sollte der Vergleich zwischen der klassischen und der neuartigen NTS-Unterteilung gezogen werden. In Abbildung 4.19 sind beide Unterteilungsarten einander gegenübergestellt. Wie bereits nach einmaliger Stimulation mit Bitterstoffen wird mit beiden Unterteilungsmethoden ein klares Ungleichgewicht zwischen dem gustatorischen und dem nichtgustatorischen NTS deutlich. Wie zuvor wird auch hier die Konzentration *Arc* exprimierender Zellen in den rostro-medialen Anteilen mit der neuartigen Methode deutlicher, was sich auch in geringeren p -Werten der Ergebnisse der t -Tests äußert, die durch Sternchen repräsentiert werden. Allerdings ist der Unterschied hier nicht so ausgeprägt wie zuvor bei den einmal stimulierten Tieren (vgl. Abb. 4.12 B). Bei den Tieren, die zweimal denselben Stimulus erhielten, ist die Dichte der *Arc*-Signale unabhängig von der Unterteilung in fast allen Fällen signifikant erhöht (a, b bzw. #). Lediglich nach zweimaliger Cuc-Stimulation ist sie in den nichtgustatorischen Teilen nicht signifikant höher. Zudem ist sowohl im gesamten NTS als auch in beiden gustatorischen Teilen die Dichte zweimal aktivierter Zellen nach zweimaliger Cycloheximid-Stimulation signifikant gegenüber den anderen Bitterstimuli erhöht (Abb. 4.19 A, a vs. b). Dieser Effekt dürfte zu einem großen Teil auf der erhöhten Signaldichte in Feld S2 beruhen (vgl. Abb 4.18 A). Bei den Bitterkombinationen hingegen ist die Dichte zweimal aktivierter Zellen nur in den gustatorischen Teilen signifikant erhöht. Unter den Kombinationen gibt es keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4.19 B). In beiden Fällen zeigte die neuartige Methode eine deutlichere Auftrennung der Signale.

Eine etwas anschaulichere Darstellung der Verteilung auf die NTS-Unterteilungen findet sich in Abbildung 4.20. Hier ist die prozentuale Verteilung der *Arc* exprimierenden Zellen auf die jeweiligen Unterteilungen als Heatmap dargestellt. Je intensiver die Färbung, desto größer ist der Anteil *Arc* exprimierender Zellen in der betreffenden Unterteilung. Zum Vergleich sind jeweils die gesamte *Arc*-Expression, also unabhängig von der intrazellulären Verteilung (total, Graustufen), und die durch beide Stimuli aktivierten Zellen dargestellt (N+Z, blau). Der Übersichtlichkeit halber sind nur die Fälle zweimaliger Stimulation mit demselben Stimulus aufgeführt. Auffällig ist bei allen drei Bittersubstanzen eine Häufung der Signale in den rostro-medialen Feldern S1 und S2, die bei den zweimal aktivierten Zellen noch deutlicher zutage tritt. Bei der rostral/caudal-Unterteilung ist bei Betrachtung aller *Arc*-Signale kaum ein Unterschied auszumachen, erst bei den zweimal aktivierten Zellen tritt bei Cycloheximid und Cucurbitacin eine Häufung

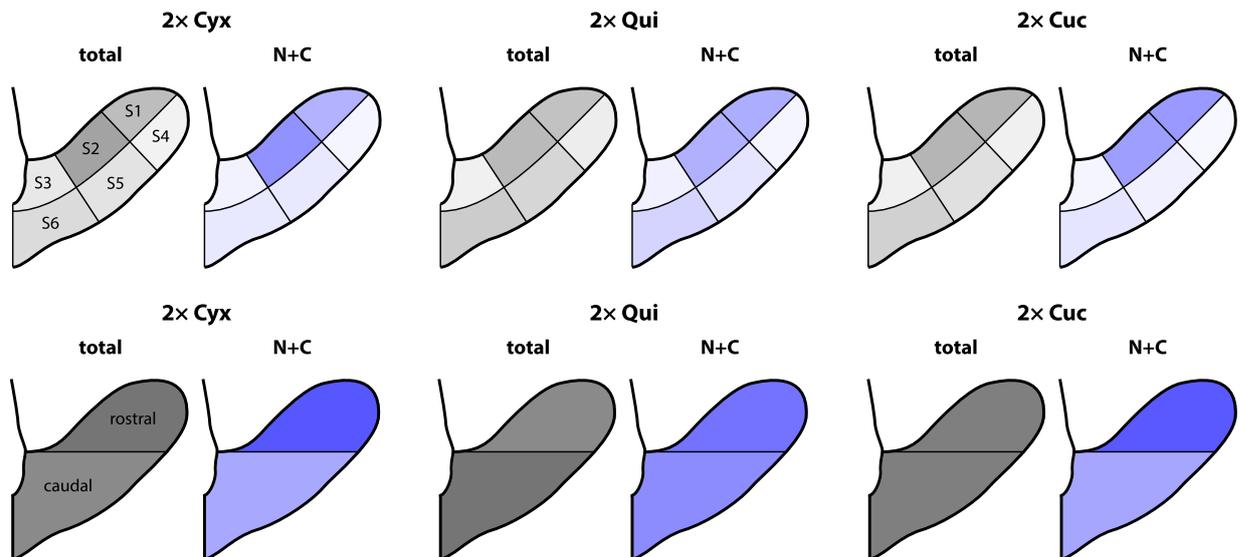


Abbildung 4.20: Prozentuale Verteilung der Signale auf die NTS-Unterteilungen. Eine Heatmap stellt die prozentuale Verteilung der gesamten *Arc* exprimierenden Zellen (grau) sowie der zweimal aktivierten Zellen (blau) auf die NTS-Unterteilungen dar. Bei allen drei Bitterstoffen tritt eine Häufung in den rostro-medialen Feldern S1 und S2 auf. Bei Cycloheximid (Cyx) sind die Zellen vorwiegend in S2 lokalisiert, während bei Chinin (Qui) und Cucurbitacin (Cuc) beide Areale etwa gleichviele Signale enthalten. Bei Qui ist außerdem auffällig, dass die Konzentrierung auf den rostro-medialen Teil weniger stark ausfällt. Das trifft auch auf die Unterteilung in rostral und caudal zu, die bei Cyx und Cuc deutlicher ausfällt. Hier zeigen sich erneut die Vorteile der neuen Unterteilungsmethode, die Muster offenbart, etwa im Fall von Qui, die mit der klassischen Unterteilung verborgen bleiben. $n = 6-9$

im rostralen NTS auf. Die Abbildung verdeutlicht aber auch die Unterschiede zwischen den Stimuli. Bei Cycloheximid und Cucurbitacin ist die Konzentration auf die Felder S1 und S2 stärker ausgeprägt als bei Chinin. Außerdem ist bei Cycloheximid im Gegensatz zu den anderen Stimuli eine deutliche Akkumulation in S2 zu sehen. Auch bei der Verteilung auf rostralen und caudalen NTS zeigen sich Unterschiede. Im Gegensatz zu Cycloheximid und Cucurbitacin ist bei Chinin jedoch kaum eine Abweichung zu beobachten. Da auch in diesem Fall die neuartige Methode ein genaueres Bild der Verteilung der *Arc*-Signale zeigte, wurde sie für die folgende Untersuchung herangezogen.

Um die Verarbeitung von verschiedenen Bittersubstanzen im NTS zu untersuchen, wurde die Dichte der zweimal aktivierten Zellen in den rostro-medialen Feldern S1 und S2 zwischen den Bitterstimuli und den Kombinationen verglichen (s. Abb. 4.21). Die Signaldichte nach zweimaliger Stimulation mit demselben Bitterstoff ist jeweils den Kombinationen dieses Bitterstoffs mit einem der anderen gegenübergestellt (Abb. 4.21 A). Mit Ausnahme von $2 \times$ Qui vs. Cyx/Qui ist die Signaldichte in jedem Fall geringer, wenn eine Bitterstoffkombination gewählt wurde, als wenn zu beiden Zeitpunkten derselbe Bitterstoff appliziert wurde. Es wurden also mehr Zellen durch beide Stimuli aktiviert, wenn es sich um denselben Stoff handelte. Dies weist darauf hin, dass die gustatorische Bitterinformation im NTS durch überlappende, aber nicht identische Zellpopulationen verarbeitet wird. Anhand dieser Daten wurde ein proportionales Mengendiagramm erstellt, das diese Populationen darstellt (Abb. 4.21 C). Die auf Cycloheximid reagierenden Zellen stellen die größte Population dar (rot). Die chininsensitiven Zellen stellen die kleinste Zahl und überlappen vollständig mit der Cycloheximid-Population (gelb). Die Population der Zellen, die auf Cucurbitacin reagieren, schließlich sind etwas zahlreicher (blau) und zeigen eine große Schnittmenge mit der Cycloheximid-Population (magenta). Jene Zellen, die auf alle Bitterstimuli reagieren, sind als weiße Schnittmenge dargestellt.

4.4.2 Vergleich der Stärke des ersten und zweiten Stimulus

Bereits bei der Betrachtung der intrazellulären Verteilung der *Arc*-RNA nach zweimaliger Bitterstimulation fiel auf, dass bei einem großen Teil der *Arc* exprimierenden Zellen die RNA nur in einem Kompartiment

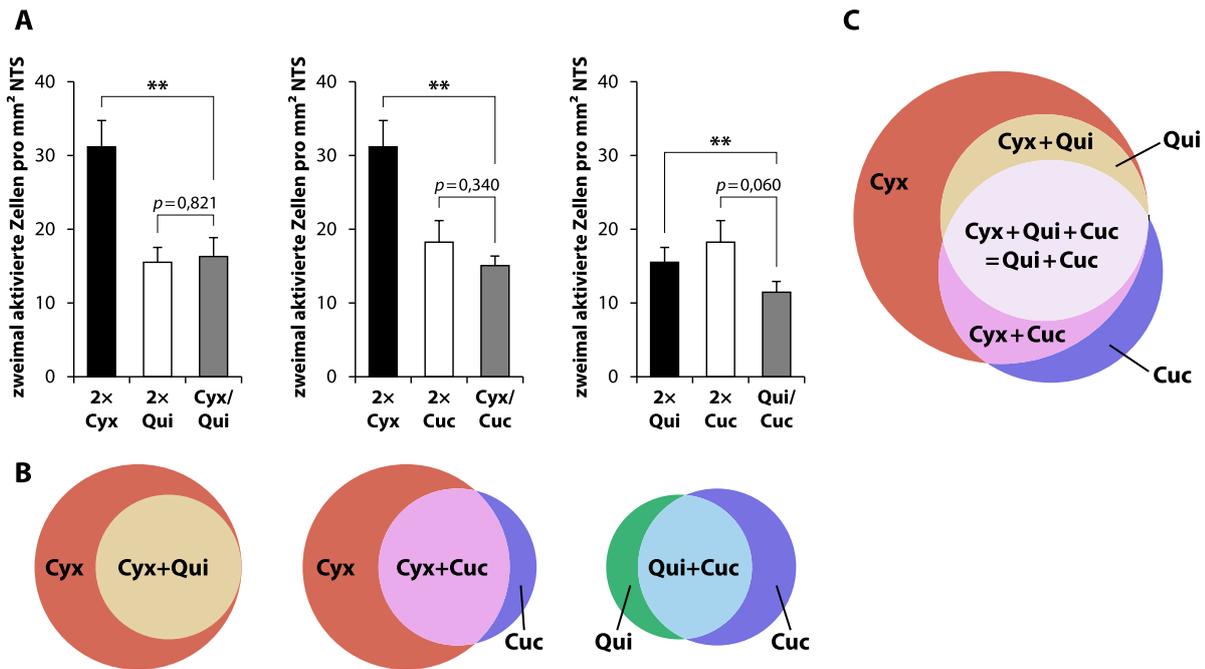


Abbildung 4.21: Populationen bitterverarbeitender Zellen im gustatorischen NTS. **A:** Vergleich der Zelldichte zweimal aktivierter Zellen im gustatorischen NTS nach zweimaliger Stimulation mit demselben bzw. der Kombination dieser Bitterstoffe. Mit der Ausnahme von Chinin und der Cyx/Qui-Kombination, werden in allen Fällen mehr Zellen durch beide Stimuli aktiviert, wenn es sich zu beiden Zeitpunkten um denselben Bitterstoff handelte. Dies weist auf eine Verschaltung in getrennten, aber überlappenden Zellpopulationen hin. **B:** Darstellung der resultierenden bitterverarbeitenden Zellpopulationen im gustatorischen NTS als proportionales Mengendiagramm. Die Kreise stellen die auf die jeweiligen Bitterstimuli ansprechenden Zellen dar, die Schnittmengen Zellen, die auf mehr als einen Bitterstimulus reagieren. **C:** Die Vereinigung aller drei Mengendiagramme veranschaulicht die Zellpopulationen, die auf Cycloheximid, Chinin oder Cucurbitacin oder mehrere Bitterstimuli ansprechen. Auf Unterschiede wurde mittels *t*-Test geprüft (** $p \leq 0,01$). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte der zweimal aktivierten Zellen pro mm² NTS und Standardfehler. $n = 6-9$

nachweisbar war. Folglich waren diese Zellen nur durch einen der Stimuli zur *Arc*-Expression angeregt worden. Weiterhin handelte es sich je nach Stimulus mal um den ersten und in anderen Fällen um den zweiten Stimulus, der zu mehr *Arc*-Expression führte (vgl. Abb. 4.17). Geht man davon aus, dass nur jene Zellen *Arc* exprimieren, die durch den jeweiligen Stimulus aktiviert wurden, ist die Dichte der *Arc* exprimierenden Zellen ein Maß für die Potenz des Stimulus. Treten mehr Zellen mit *Arc*-RNA im Zytoplasma auf, so war der erste Stimulus potenter, zeigen dagegen mehr Zellen *Arc*-RNA im Nukleus, war der zweite Stimulus stärker. Um die Stärken zwischen den Stimuluspaaren besser vergleichen zu können, wurde das Verhältnis von den Zellen, die durch den ersten Stimulus aktiviert wurden (Z und $N+Z$), und den Zellen, die durch den zweiten Stimulus aktiviert wurden (N und $N+Z$), gebildet. Der dekadische Logarithmus dieses Verhältnisses wurde in Abbildung 4.22 aufgetragen. Positive Werte bedeuten, dass der erste Stimulus stärker war, bei negativen Werten führte der zweite Stimulus zu mehr *Arc*-Expression. Bei einem Betrag von 0,18 war der entsprechende Stimulus 1,5-fach stärker, bei 0,30 2-fach und bei 0,48 3-fach.

Betrachtet man den gesamten NTS, so war die Stimulusstärke bei zweimaliger Applikation des gleichen Stimulus etwa gleich groß. Nur bei Chinin war der erste Stimulus etwa 1,5-fach potenter als der zweite. Betrachtet man die Kombinationen von Cycloheximid und Chinin sowie Cycloheximid und Cucurbitacin, so führte jeweils der Cycloheximid-Stimulus zu einer stärkeren *Arc*-Expression. Dies stimmt mit den bisherigen Beobachtungen überein, dass Cycloheximid in den meisten Fällen eine höhere *Arc*-Expression hervorrief als die übrigen Bitterstimuli. Bei den Qui/Cuc-Kombinationen ist das Ergebnis weniger deutlich. Hier scheint Cucurbitacin der etwas potentere Stimulus zu sein, jedoch ist der Standardfehler

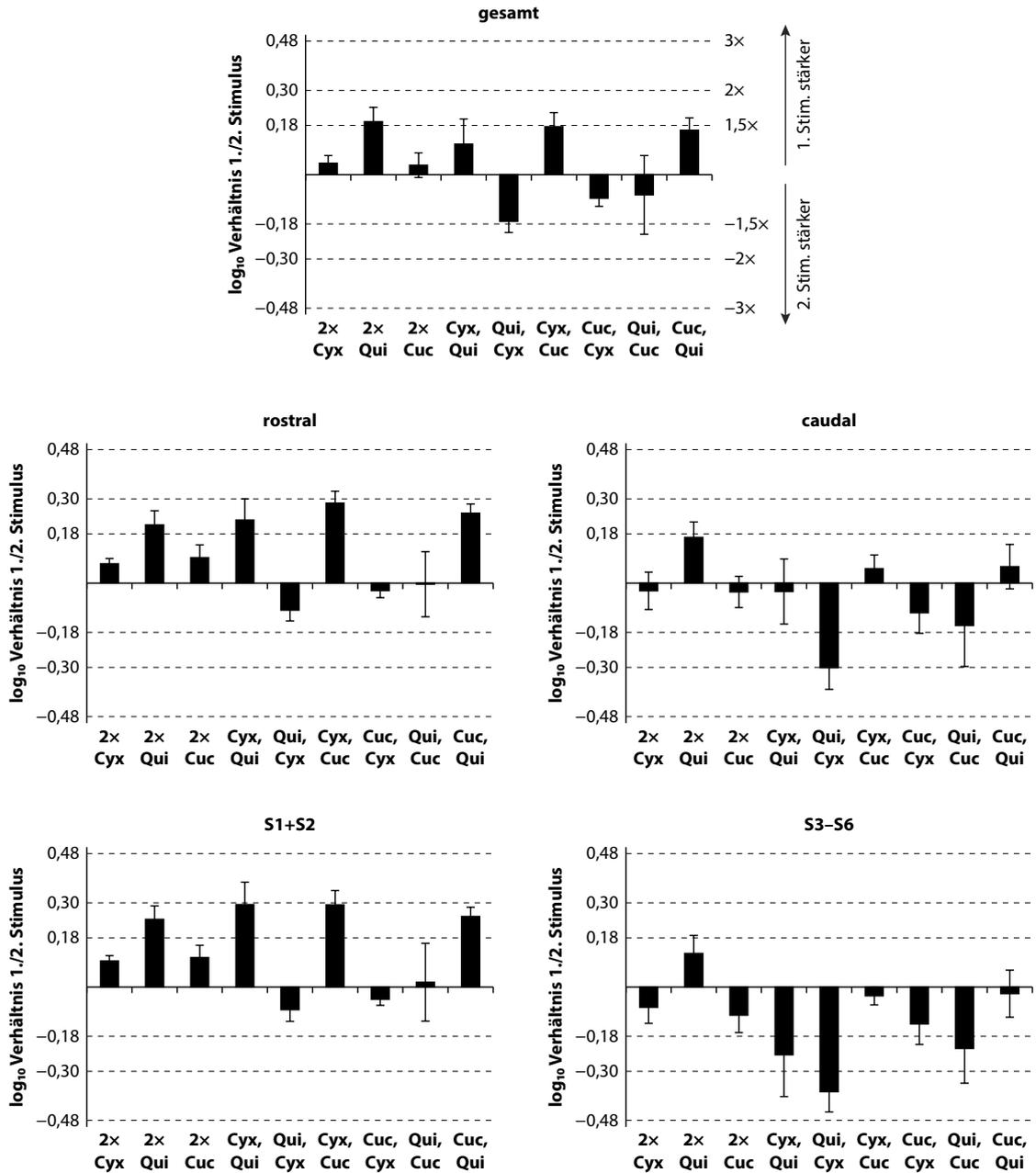


Abbildung 4.22: Vergleich der Stärke des ersten und zweiten Stimulus. Der dekadische Logarithmus des Verhältnisses der durch den ersten bzw. den zweiten Stimulus hervorgerufenen Signale zeigt, welcher der beiden Stimuli zu einer höheren Arc-Expression führte. Positive Werte bedeuten, dass der erste Stimulus stärker war, negative entsprechend das Gegenteil. Bei Betrachtung des gesamten NTS (oben) führte tendenziell der erste Stimulus zu einer stärkeren Arc-Expression als der zweite. Bei den Bitterstimuluskombinationen spiegelt sich die Potenz des Bitterstimulus wider. Wie zuvor gezeigt führte Cycloheximid (Cyx) zur stärksten Arc-Expression unter den drei Bitterstimuli. Entsprechend ist auch bei den Kombinationen jener Stimulus stärker, bei dem Cyx appliziert wurde. Vergleicht man die NTS-Unterteilungen (Mitte und unten) fällt auf, dass in beiden Fällen im gustatorischen NTS (rostral bzw. S1+S2) tendenziell der erste Stimulus stärker war als der zweite. Im nichtgustatorischen NTS (caudal bzw. S3-S6) war tendenziell der zweite Stimulus stärker. Dies unterstreicht die funktionelle Teilung des NTS, die wiederum bei der neuen Methode deutlicher zutage tritt. n = 6–9

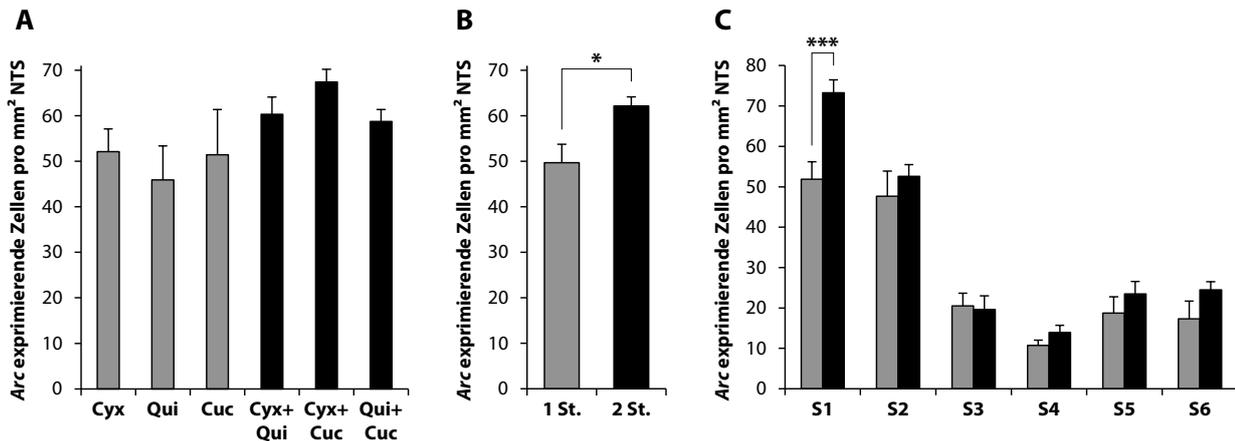


Abbildung 4.23: Vergleich der Arc-Expression nach Applikation von einem bzw. dem Gemisch aus zwei Bitterstoffen. **A:** Nach Applikation von einem Bitterstimulus (Cyx, Qui, Cuc) kam es zu einer geringeren Arc-Expression im gustatorischen NTS als wenn ein Gemisch aus zwei dieser Bitterstoffe appliziert wurde. $n = 4-5$ **B:** Im Durchschnitt war die Arc-Expression nach Applikation der Gemische um 25 % erhöht. $n = 12-14$ **C:** Der größte Anstieg Arc exprimierender Zellen ist im rostro-medialen Feld S1 zu beobachten, was für eine Aktivierung zusätzlicher gustatorischer Neurone spricht. Auf Unterschiede wurde mittels *t*-Test getestet (* $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$). $n = 12-14$. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte der Arc exprimierenden Zellen pro mm² NTS und Standardfehler.

bei der Reihenfolge „Qui,Cuc“ recht hoch.

Interessant ist die Betrachtung der gustatorischen gegenüber den nichtgustatorischen Unterteilungen des NTS. Bei beiden Methoden war in den gustatorischen Anteilen (rostral und S1+S2) der erste Stimulus gegenüber dem Gesamt-NTS tendenziell stärker, was sich in einer Verschiebung des Verhältnisses zu höheren Werten äußerte. Das Gegenteil war in den nichtgustatorischen Anteilen (caudal und S3–S6) der Fall. Hier waren die Verhältnisse tendenziell kleiner. Dies weist darauf hin, dass Zellen in den gustatorischen Anteilen auf den zweiten Stimulus weniger stark reagierten als auf den ersten, während in den nichtgustatorischen das Gegenteil der Fall war. Auch in diesem Fall tritt der Unterschied mit der neuartigen Unterteilung etwas deutlicher zutage.

Ein Kontrollexperiment wurde durchgeführt, um den Einfluss einer Bitterstoffmischung auf die Arc-Expression zu untersuchen. Wenn distinkte Subpopulationen im NTS existieren, die nicht auf alle Bittersubstanzen reagieren, dann sollte die Stimulation mit einem Gemisch aus mehreren Bitterstoffen mehr Zellen aktivieren als nur ein Bitterstoff. Um dies zu überprüfen, wurden Tiere zum Zeitpunkt –5 min mit einer Mischung von zwei der verwendeten Bittersubstanzen stimuliert. Alle möglichen Mischungen kamen zum Einsatz: Cycloheximid mit Chinin, Cycloheximid mit Cucurbitacin sowie Chinin mit Cucurbitacin. Die resultierende „relevante“ Arc-Expression (vgl. Abschnitt 4.2, S 44) in den rostro-medialen Feldern S1 und S2 wurde mit der durch Einzelbitterstimulation hervorgerufenen relevanten Arc-Expression verglichen (s. Abb. 4.23). In allen Fällen führte die Applikation einer Bittermischung zu einer stärkeren Arc-Expression als die Applikation eines einzelnen Bitterstimulus (Abb. 4.23 A). Nach Zusammenfassung der Tiere, die einen Bitterstimulus bzw. ein Gemisch bekamen, wird dieser Unterschied noch deutlicher. Im Durchschnitt wurden 25 % mehr Zellen durch Applikation der Gemische aktiviert (Abb. 4.23 B). Die Verteilung der aktivierten Zellen auf die NTS-Unterregionen offenbarte, dass die Zunahme an Arc-Signalen vorwiegend im Feld S1, also im gustatorischen NTS auftrat (Abb. 4.23 C).

5 Diskussion

In diesem Abschnitt sollen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diskutiert und in den Kontext des aktuellen Forschungsstands gestellt werden. Zunächst werden Fragen diskutiert, die die Methodik betreffen, anschließend werden die Ergebnisse bereits publizierten Daten gegenübergestellt. Schließlich wird die Bedeutung der Ergebnisse für die Frage der Bitterdiskriminierung erörtert.

5.1 Stimulation und Geschmacksstimuli

5.1.1 Wahl der Geschmacksstimuli

Bei der Wahl der Geschmacksstimuli waren bereits veröffentlichte Studien ausschlaggebend, die die Weiterleitung von Geschmacksinformation untersuchen. Die meisten Publikationen verwenden die beim Menschen bekannten Geschmacks-kategorien und wählen die Stimuli entsprechend aus. Auch in dieser Arbeit wurde auf diese Weise vorgegangen, wobei die in der Einleitung dargestellten Vorbehalte stets beachtet werden sollten (s. Abschnitt 1.1, S. 1). Jede der fünf allgemein akzeptierten Grundgeschmacks-richtungen sollte mit mindestens einem Stimulus vertreten sein. In einigen Fällen wurden mehrere Stimuli pro Geschmacksqualität eingesetzt. Die einzelnen Geschmacksstimuli werden im folgenden dargestellt. Eine Übersicht mit zugehörigen Referenzen findet sich in Tabelle 2.7 auf Seite 20.

Für umami kam neben 0,1 M Natriumglutamat die Kombination von 1 M Natriumglutamat mit 0,5 mM Inosinmonophosphat (IMP) und 30 μ M Amilorid zum Einsatz. Der zweite Stimulus sollte eine Art Maximalstimulus darstellen. IMP verstärkt die Geschmacksintensität von Natriumglutamat bei Nagern und Menschen.^{19,148} Amilorid diente zur Blockierung des epithelialen Natriumkanals, der in Nagern eine spezifische Natriumwahrnehmung vermittelt.⁸⁰ So sollte der Einfluss des Na^+ -Gegenions ausgeschlossen werden. Eine andere Möglichkeit, den Natriumeinfluss auszuschließen, wäre die Stimulation mit Kaliumglutamat, das ebenfalls eine synergistische Verstärkung mit IMP aufweist.¹⁴⁰

Für die Qualität süß wurde mit 0,5 M Saccharose stimuliert. Zusätzlich wurden bei zweimaliger Stimulation die sehr hohen Konzentrationen von 1 M und 1,5 M eingesetzt (siehe Abschnitt 4.3, S. 52). Zuckerlösungen dieser Konzentrationen sind hyperton und entziehen damit umliegendem Gewebe Flüssigkeit. Während der Experimente kam es in wenigen Fällen dazu, dass Stimulationslösungen in die Atemwege der Versuchstiere gelangte. In diesen Fällen mussten die Tiere aus dem Versuch ausgeschlossen werden. Als Alternative zu hochkonzentrierten Zuckerlösungen wären Süßstoffe denkbar, von denen einige beim Menschen bereits in sehr geringen Konzentrationen intensiv süß schmecken. Jedoch scheint sich diese Wahrnehmung bei Nagern anders zu verhalten. In Verhaltensexperimenten führen künstliche Süßstoffe nur zu Präferenzen, die mit denen von verdünnten Zuckerlösungen vergleichbar sind.²⁰ Zudem sind viele Süßstoffe mit einem Beigeschmack behaftet, der sich ebenfalls auf die Ergebnisse auswirken könnte.¹⁵

Als Salzstimuli wurden eine hypotone (0,1 M) und eine hypertone (0,8 M) Natriumchloridlösung eingesetzt. Niedrigkonzentrierte NaCl-Lösungen sind für Nager attraktiv, lösen jedoch zunehmend

¹⁹X. Li u. a., *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), Nr. 7, S. 4692–4696.

¹⁴⁸S. Yamaguchi und K. Ninomiya, *J Nutr* 130 (2000), Nr. 4S Suppl, 921S–926S.

⁸⁰M. E. Frank, R. F. Lundy Jr. und R. J. Contreras, *Prog Neurobiol* 86 (2008), Nr. 3, S. 245–263.

¹⁴⁰G. Q. Zhao u. a., *Cell* 115 (2003), Nr. 3, S. 255–266.

²⁰J. D. Fernstrom u. a., *J Nutr* 142 (2012), Nr. 6, 1134S–1141S.

¹⁵N. Roudnitzky u. a., *Hum Mol Genet* 20 (2011), Nr. 17, S. 3437–3449.

Aversion aus, wenn die Konzentration in hypertone Bereiche steigt.⁷⁵ Wie bei den hochkonzentrierten Saccharoselösungen kam es in wenigen Fällen dazu, dass Versuchstiere ausgeschlossen werden mussten, weil Stimulationslösung in die Atemwege gelangte.

Citronensäure wurde als Repräsentant für die Qualität sauer zunächst mit einer Konzentration von 30 mM und bei den zweimal stimulierten Tieren mit einer Konzentration von 100 mM eingesetzt (s. Abschnitt 4.3, S. 52).

Als Bitterstimuli wurden mit Cycloheximid und Chininhydrochlorid zwei etablierte Bitterstimuli gewählt. Es handelt sich dabei zudem um je einen Vertreter der „ionischen“ (Chinin) und „nichtionischen“ (Cycloheximid) Bitterstoffe (s. Abschnitt 1.2.1, S. 9). Der dritte Bitterstimulus, Cucurbitacin I, gehört zur Familie der Cucurbitacine, die durch einen für den Menschen extrem intensiven Bittergeschmack charakterisiert¹⁴⁹ und für Mäuse stark aversiv sind (Sabine Frenzel, unveröffentlichte Daten). Überdies handelt es sich um einen Bitterstoff, der in unserem Labor bereits breite Verwendung findet.

Zusätzlich zu den Stimuli für die fünf Grundgeschmacksrichtungen wurde 0,1 M Ammoniumchlorid eingesetzt. Dabei handelt es sich um einen Standardstimulus in elektrophysiologischen Experimenten, der häufig zur Normalisierung der Nervenaktivität herangezogen wird.^{104,140,150}

Die Konzentrationen der eingesetzten Geschmacksstimuli wurden so gewählt, dass eine starke Aktivierung der Nerven zu erwarten wäre. In den meisten Fällen lag die gewählte Konzentration im oberen Bereich der in Elektrophysiologie- und FLI-Studien üblicherweise eingesetzten Konzentrationen. So wurden beispielsweise für Cycloheximid Konzentrationen bis 1 mM (hier 0,5 mM) und für Chinin bis 30 mM (hier 10 mM) eingesetzt.^{77,104,140,141} Im Falle von Cucurbitacin waren Ergebnisse von Präferenztests und Ableitungen der Geschmacksnerven aus unserem Labor ausschlaggebend (Sabine Frenzel und Masataka Narukawa, unveröffentlichte Daten). Als Lösungsmittel für die Geschmacksstimuli wurde eine wässrige Lösung von 25 mM Kaliumchlorid und 2,5 mM Natriumhydrogencarbonat eingesetzt, die als für Menschen geschmackfrei beschrieben wurde.¹³⁹ Dieselbe Lösung wurde auch als Kontrollstimulus verwendet. Vom Einsatz von destilliertem Wasser als Lösungsmittel und Kontrollstimulus wurde abgesehen, da eine Wasserstimulation in FLI-Studien bereits zu erhöhter *Fos*-Expression führte.^{57,89,151} Leitungswasser schied ebenfalls aus, da die Zusammensetzung je nach Standort stark variiert und Versuche sich so schwer replizieren lassen.

5.1.2 Stimulation

Die Versuche wurden an wachen Mäusen durchgeführt. Für die Stimulation wurden die Tiere nicht narkotisiert, sondern lediglich manuell fixiert, während die Stimulationslösungen über einen Zeitraum von 2 min in die Mundhöhle appliziert wurden. Die Stimulation von wachen Mäusen erlaubt die Beobachtung des Verhaltens während und nach der Stimulation und schließt Einflüsse des Narkosemittels und schwankender Narkosetiefe aus (vgl. Abschnitt 1.2, S. 7).

Während der Stimulation zeigten die Mäuse rege Bewegungen der Kiefer- und Zungenmuskulatur und leckten an der Sonde, über die die Lösungen appliziert wurden. Während im anästhetisierten Tier die adäquate Stimulation im hinteren Bereich der Zunge, die den Großteil der Geschmacksknospen und insbesondere der Bitterrezeptor exprimierenden Geschmackssinneszellen enthält, sehr aufwendig

⁷⁵L. C. Geran und S. P. Travers, *J Neurophysiol* 101 (2009), Nr. 3, S. 1598–1612.

¹⁴⁹R. L. Metcalf, R. A. Metcalf und A. M. Rhodes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 77 (1980), Nr. 7, S. 3769–3772.

¹⁰⁴V. Danilova und G. Hellekant, *BMC Neurosci* 4 (2003), S. 5.

¹⁵⁰M. E. Frank und D. A. Blizard, *Physiol Behav* 67 (1999), Nr. 2, S. 287–297.

⁷⁷M. E. Frank, R. J. Contreras und T. P. Hettinger, *J Neurophysiol* 50 (1983), Nr. 4, S. 941–960.

¹⁴¹Y. Oka u. a., *Nature* 494 (2013), Nr. 7438, S. 472–475.

¹³⁹I. E. de Araujo u. a., *J Neurophysiol* 90 (2003), Nr. 3, S. 1865–1876.

⁵⁷S. P. Travers, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282 (2002), Nr. 6, R1798–1810.

⁸⁹J. B. Travers u. a., *Chem Senses* 32 (2007), Nr. 2, S. 129–137.

¹⁵¹J. M. Stratford und T. E. Finger, *J Neurosci* 31 (2011), Nr. 25, S. 9101–9110.

ist,^{29,142} gewährleiten diese Bewegungen eine vergleichbare Benetzung wie im sich frei verhaltenden Tier. Nach der Stimulation war spezifisch bei den mit Bittersubstanzen stimulierten Tieren ein als *chin rubs* bezeichnetes Verhalten zu beobachten. Dabei senken die Tiere ihren Kopf und schieben die Einstreu mit ihrer Schnauze über den Boden. Dieses Verhalten ist typisch nach Bitterstimulation, tritt aber nicht bei Stimulation mit anderen Geschmacksqualitäten auf.^{89,152} Das ebenfalls für Bitterstimulation beschriebene *gaping*, bei dem die Tiere das Maul weit aufreißen, wurde nur in einigen Fällen beobachtet. Dieses Verhalten tritt früher als die *chin rubs* und in unserem Fall bereits während des Stimulationsvorgangs auf und war daher schwer von den übrigen Bewegungen des Tieres zu unterscheiden.

Die Stimulationsdauer in anderen Experimenten hängt stark von der eingesetzten Methode ab. Bei elektrophysiologischen Ableitungen wird in der Regel nur über einen Zeitraum von einigen Sekunden stimuliert, wobei der Zeitraum bei Ableitung ganzer Nerven tendenziell etwas länger zu sein scheint.^{104,153–156} Bei der Untersuchung von *Fos*-Expression hingegen wird über einen deutlich längeren Zeitraum stimuliert. Häufig wird dabei der Stimulus nicht kontinuierlich sondern in mehreren Wiederholungen appliziert.¹⁵⁷ Die Arbeitsgruppe um Susan Travers nutzt hierfür eine Technik, bei der die Applikation von Geschmacksstimuli über in die Mundhöhle chirurgisch implantierte Kanülen erfolgt.^{57,68,87,89,106} Diese Methode, die im Labor von Ralph Norgren entwickelt wurde, erlaubt es, wachen Tieren über einen langen Zeitraum Geschmacksstimuli zu präsentieren, ohne diese dabei handhaben zu müssen.¹⁵⁸ Ein anderer Ansatz ist, das natürliche Trinkverhalten der Tiere zur Stimulusgabe auszunutzen. Um die Tiere ausreichend zu motivieren, wird ihnen hierzu vor dem Experiment über einige Stunden der Zugang zu Trinkwasser verwehrt. Anschließend wird ihnen die Testlösung vorgesetzt, die sie 30 min lang nach Belieben aufnehmen können.¹⁵¹ Allerdings wurden hierfür bislang nur attraktive Stimuli verwendet. Eine zuverlässige und konstante Stimulation mit stark aversiven Lösungen, etwa von Bitterstoffen, durch freiwillige Aufnahme dürfte auf diese Weise nicht möglich sein.

Bei *Arc*-catFISH-Experimenten ist der experimentelle Ablauf der beschränkende Faktor der Stimuluslänge. Es muss gewährleistet sein, dass die Stimulation der Geschmackssinneszellen abgeschlossen ist, bevor ein Transport der induzierten *Arc*-RNA ins Zytoplasma stattfindet und dann keine eindeutige Aussage über den auslösenden Stimulus mehr möglich wäre. Hierbei ist auch zu bedenken, dass nach der Stimulation unter Umständen noch Stimulationslösung in der Mundhöhle verbleibt, die ebenfalls zur Aktivierung von Rezeptoren in den Geschmacksknospen führen kann. Dies ist umso wichtiger, da kein Auswaschen des Stimulus erfolgte. Für die Experimente in dieser Arbeit wurde eine Stimulationsdauer von 2 min gewählt. Aus mehreren Gründen stellte sich dies als geeigneter Zeitraum heraus. Typischerweise verhielten sich die Mäuse während der ersten 60 bis 90 Sekunden relativ ruhig und fingen erst danach an, sich stärker zu bewegen. Dies kann als Zeichen gewertet werden, dass mit zunehmender Stimulationsdauer der Stress für das Tier steigt. Zudem ist es einem geübten Experimentator leicht möglich, das Tier über einen Zeitraum von 2 min mit einer Hand sicher zu fixieren und gleichzeitig mit der anderen Hand den Stimulus zu applizieren. Nur wenn sich die Maus stark bewegte, war es in einigen Fällen nötig, den Griff zu korrigieren. Da die Tötung fünf Minuten nach Beginn des letzten Stimulus erfolgte, blieben mindestens drei Minuten, um das Verhalten des Tieres zu beobachten.

²⁹M. E. Frank, *J Neurophysiol* 65 (1991), Nr. 6, S. 1452–1463.

¹⁴²C. B. Halsell, J. B. Travers und S. P. Travers, *Brain Res* 632 (1993), Nr. 1-2, S. 161–173.

¹⁵²H. J. Grill und R. Norgren, *Brain Res* 143 (1978), Nr. 2, S. 263–279.

¹⁵³C. Pfaffmann, *Am Psychol* 14 (1959), Nr. 5, S. 226–232.

¹⁵⁴M. E. Frank, S. L. Bieber und D. V. Smith, *J Gen Physiol* 91 (1988), Nr. 6, S. 861–896.

¹⁵⁵R. Norgren, H. Nishijo und S. P. Travers, *Ann N Y Acad Sci* 575 (1989), S. 246–263, 246–263.

¹⁵⁶V. Danilova, T. Roberts und G. Hellekant, *Chem Senses* 24 (1999), Nr. 3, S. 301–316.

¹⁵⁷Y. Kwak u. a., *Korean J Physiol Pharmacol* 15 (2011), Nr. 6, S. 437–443.

⁶⁸S. P. Travers und H. Hu, *J Comp Neurol* 427 (2000), Nr. 1, S. 124–138.

⁸⁷M. I. Harrer und S. P. Travers, *Brain Res* 711 (1996), Nr. 1-2, S. 125–137.

¹⁰⁶C. Y. Chan, J. E. Yoo und S. P. Travers, *Chem Senses* 29 (2004), Nr. 7, S. 573–581.

¹⁵⁸M. I. Phillips und R. E. Norgren, *Behav Res Meth & Instru* 2 (1970), Nr. 3, S. 124–124.

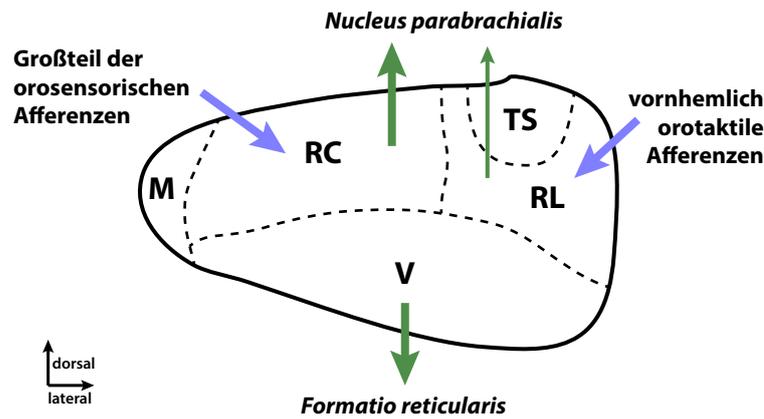


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung eines coronalen Schnitts durch den rostralen NTS der Ratte. Die vier beschriebenen Subregionen mit den prominentesten Afferenzen (blaue Pfeile) und Efferenzen (grüne Pfeile) sowie der *Tractus solitarius* (TS) sind dargestellt. M: mediale Subregion. RC: rostro-centrale Subregion. Sie erhält den Großteil der orosensorischen Afferenzen, insbesondere Geschmacksinformation, und von hier geht der Großteil der Efferenzen in die aufsteigende Geschmacksbahn. RL: rostro-mediale Subregion. Hier enden vornehmlich orotaktile Fasern und nur wenig Efferenzen in den *Nucleus parabrachialis* sind beschrieben. V: ventrale Subregion. Hier entspringt ein Großteil der Efferenzen in die oromotorischen Kerne der *Formatio reticularis*. Adaptiert von Bradley u. a. [54].

5.2 Evaluierung der Sechsfelder Methode zur NTS-Unterteilung

Zur Auswertung der *Arc*-Expression nach Stimulation mit Geschmacksstoffen wurde im Zuge dieser Arbeit eine neuartige Unterteilung des NTS eingeführt (siehe Abschnitt 3.5.3, S. 32). In diesem Abschnitt soll nun die neuartige Methode der klassischen Unterteilung in einen rostralen und einen caudalen Teil gegenübergestellt werden, die parallel zur Analyse herangezogen wurde.

Der Grund für eine Unterteilung des NTS liegt darin, dass dieser Hirnnervenkern funktionell heterogen aufgebaut ist (s. Abschnitt 1.1.3, S. 5). Im rostralen NTS treffen gustatorische und andere sensorische Afferenzen aus der Mundhöhle und dem Nasenrachenraum ein und von hier entspringen die aufsteigende Geschmacksbahn sowie Efferenzen in oromotorische Hirnstammkerne.⁵⁴ Der caudale NTS hingegen ist in der Verarbeitung viszeraler Information involviert.¹⁵⁹ Trotz dieser funktionellen Trennung ist keine klare Grenze von rostralem und caudalem NTS mit histologischen Mitteln auszumachen. Aus diesem Grund hat man die Trennlinie zwischen rostralem und caudalem NTS traditionell an der Stelle gezogen, an der sich der NTS vom vierten Ventrikel löst. Dies spiegelt die funktionelle Teilung jedoch nur bedingt wider. Tatsächlich gehen die orosensorischen Projektionsfelder relativ weit über diese Linie hinaus.⁵⁴ Dennoch wurde bislang keine andere Art der Unterteilung des NTS eingeführt.

Zusätzlich zu unterschiedlichen Funktionen von rostralem und caudalem NTS, sind funktionelle Unterschiede auch entlang der medio-lateralen und dorso-ventralen Achsen zu beobachten (vgl. Abb. 5.1 und Abschnitt 1.1.3, S. 5). So projiziert der ventrale Teil des rostralen NTS (V) vorwiegend innerhalb des Hirnstamms, während der Großteil der Efferenzen des dorsalen NTS in die nächste Station der aufsteigenden Geschmacksbahn ziehen, den *Nucleus parabrachialis* (PbN).⁵⁴ Im dorsalen NTS wiederum werden zwei Unterteilungen unterschieden. Während die lateral gelegenen Neurone vornehmlich orotaktil innerviert werden, gelangt der Großteil der gustatorischen Afferenzen zu weiter medial gelegenen Neuronen.⁵⁴ Insbesondere die funktionellen Unterschiede zwischen lateral und medial gelegenen Neuronen werden durch die grobe klassische Einteilung in rostral und caudal außer Acht gelassen.

Um die für den rostralen NTS beschriebenen Subregionen entsprechend Abbildung 5.1 darzustellen, sind histologische Färbungen notwendig, die die Zytoarchitektur des Gewebes verdeutlichen, wie etwa

⁵⁴R. M. Bradley u. a. *The Role of the Nucleus of the Solitary Tract in Gustatory Processing*. Frontiers in Neuroscience. Boca Raton (FL), 2007. ISBN: 978-0-8493-4200-4

¹⁵⁹M. C. Andresen und D. L. Kunze, *Annu Rev Physiol* 56 (1994), S. 93–116.

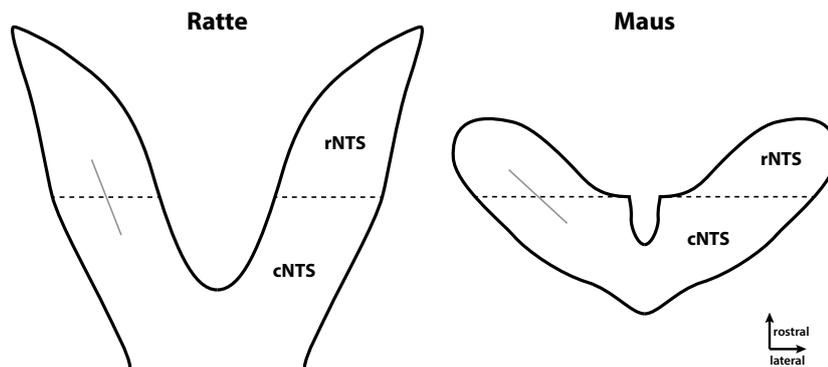


Abbildung 5.2: Vergleich der rostral/caudal-Unterteilung des NTS zwischen Ratte und Maus. Im Vergleich zur Ratte ist die typische V-Form des Maus-NTS deutlich gestaucht. Dies wirkt sich auch auf die klassische Definition von rostralem (rNTS) und caudalem (cNTS) aus. In grau ist die Längsachse des NTS angedeutet. Umriss des Ratten-NTS adaptiert von Travers [57].

Nissl- oder Faserfärbungen.^{64,160} Zudem wurden diese Unterteilungen bislang nur für Coronalsschnitte beschrieben. Aus diesen Gründen wurde eine Unterteilung nach rein topologischen Gesichtspunkten in sechs Subfelder durchgeführt. Die Methode und die resultierende Gliederung sind in Abschnitt 3.5.3 auf Seite 32 beschrieben. So ist eine rasche Unterteilung möglich ohne die Notwendigkeit einer zusätzlichen Färbung oder Gegenfärbung. Insbesondere der Zeitaspekt war anhand der Vielzahl der zu untersuchenden Gewebeschnitte ausschlaggebend. Eine ähnliche Methode, die ebenfalls auf rein topologischer Unterteilung basiert, wurde bereits für coronale Schnitte durch den rostralen NTS beschrieben und mehrfach angewendet.^{57,89,106,151,161}

Beim Vergleich der neuartigen mit der klassischen Unterteilung zeigte sich in nahezu allen Fällen eine deutlichere Trennung der Signaldichte zwischen „gustatorischen“ (rostral bzw. S1+S2) und „nichtgustatorischen“ (caudal bzw. S3–S6) Unterteilungen (vgl. Abb. 4.12 B, 4.13, 4.19 B, 4.20, 4.22 ab S. 50). Diese Unterschiede treten insbesondere bei den mit Chinin stimulierten Tieren auf.

Ein Grund hierfür dürfte in der feineren Unterteilung liegen, statt zwei werden nun sechs Felder unterschieden. Zudem scheinen diese sechs Felder genauer mit den tatsächlichen anatomischen Begebenheiten übereinzustimmen. So entspricht die Teilung entlang der Mittellinie etwa der Grenze zwischen rostro-centraler und rostro-lateraler Unterregion, die den rostralen NTS in Coronalsschnitten etwa halbiert (vgl. Abb. 5.1). Auch ragen die „gustatorischen“ Felder S1 und S2 über die Trennlinie in den caudalen Bereich hinein und erfassen so wahrscheinlich mehr der gustatorischen Afferenzen, insbesondere des IX. Hirnnervs, als der rostrale Teil.

Ein weiteres Problem der rostral/caudal-Unterteilung ist, dass in der Maus die typische V-Form des NTS im Vergleich zur Ratte und zum Hamster deutlich abgeflacht ist.^{49,57,162} Für jene Spezies aber wurde die klassische Unterteilung ursprünglich beschrieben, da ein Großteil der frühen Geschmacksforschung an Ratte und Hamster durchgeführt wurde. Die unterschiedliche Form wirkt sich auf die Definition von rostralem und caudalem NTS aus (vgl. Abb. 5.2). Während die Trennlinie (gestrichelt) in der Ratte nahezu rechtwinklig zur Längsachse (graue Linie) verläuft, ist sie in der Maus stark angewinkelt. In der Folge enthält der als rostral definierte Anteil in der Maus weniger laterale Anteile und der Flächenanteil

⁶⁴F. N. Zaidi u. a., *J Comp Neurol* 511 (2008), Nr. 6, S. 753–772.

¹⁶⁰M. C. Whitehead, *J Comp Neurol* 276 (1988), Nr. 4, S. 547–572.

⁵⁷S. P. Travers, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282 (2002), Nr. 6, R1798–1810.

⁸⁹J. B. Travers u. a., *Chem Senses* 32 (2007), Nr. 2, S. 129–137.

¹⁰⁶C. Y. Chan, J. E. Yoo und S. P. Travers, *Chem Senses* 29 (2004), Nr. 7, S. 573–581.

¹⁵¹J. M. Stratford und T. E. Finger, *J Neurosci* 31 (2011), Nr. 25, S. 9101–9110.

¹⁶¹C. T. King u. a., *J Neurosci* 19 (1999), Nr. 8, S. 3107–3121.

⁴⁹R. B. Hamilton und R. Norgren, *J Comp Neurol* 222 (1984), Nr. 4, S. 560–577.

¹⁶²R. D. Sweazey und D. V. Smith, *Brain Res* 408 (1987), Nr. 1-2, S. 173–184.

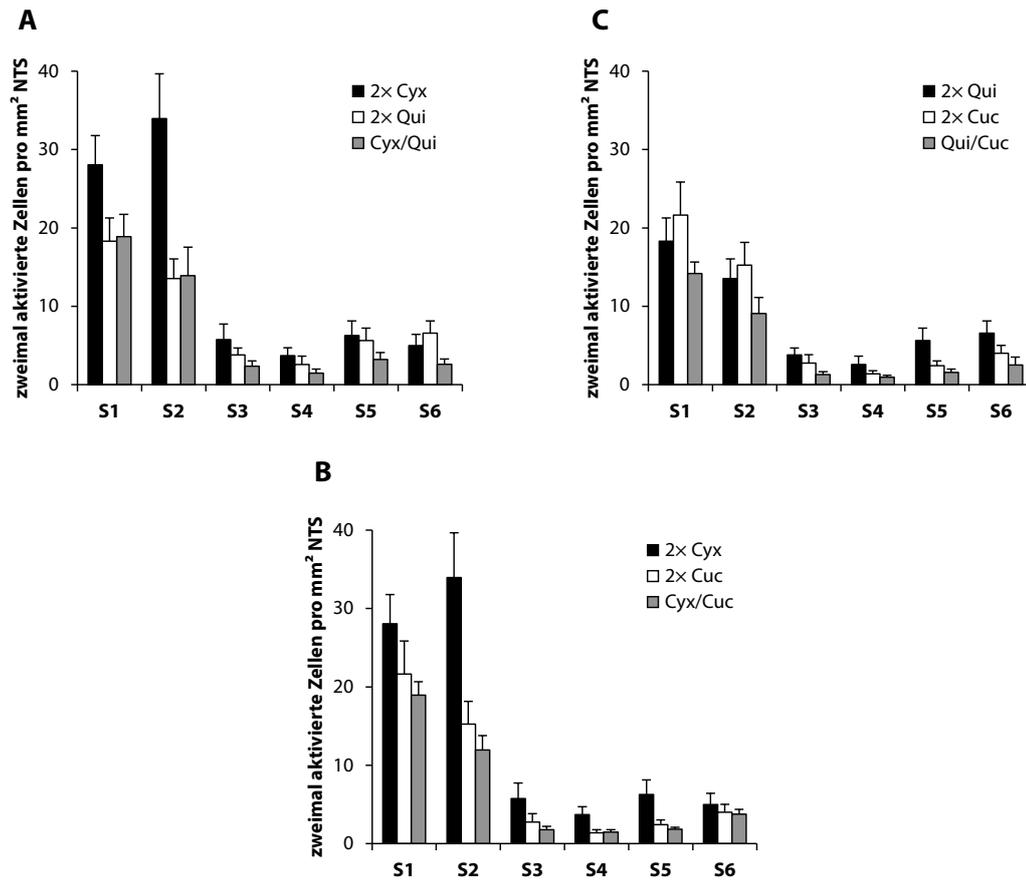


Abbildung 5.3: Alternative Darstellung der Daten aus Abbildung 4.18. Verteilung der durch beide Stimuli aktivierten Zellen auf die sechs Subfelder des NTS. Die Fälle zweimaliger Applikation desselben Bitterstoffs sind den jeweiligen Kombinationen zweier Bitterstoffe gegenübergestellt. **A:** 2x Cyx und 2x Qui vs. Cyx/Qui **B:** 2x Cyx und 2x Cuc vs. Cyx/Cuc **C:** 2x Qui und 2x Cuc vs. Qui/Cuc. n = 6–9. Cyx: Cycloheximid, Qui: Chinin, Cuc: Cucurbitacin. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der durch beide Stimuli aktivierten Zellen pro mm² NTS und Standardfehler.

am Gesamt-NTS ist geringer. Dadurch werden vermutlich zusätzliche Signale gustatorischen Ursprungs dem caudalen NTS zugerechnet.

Die Sechsfelder Methode erlaubt bei der Auswertung der zweimal stimulierten Tiere zudem eine recht genaue Lokalisierung der aktivierten Zellen. Dies wird deutlich, wenn man die Daten aus Abbildung 4.18, S. 56, in anderer Weise aufträgt. Dabei wird die Dichte der durch beide Stimuli aktivierten Zellen nach zweimaliger Applikation desselben Bitterstoffs und nach Applikation der Kombination dieser beiden Bitterstoffen gegenübergestellt (s. Abb. 5.3). Hier wird deutlich, dass die Erhöhung der auf beide Stimuli reagierenden Zellen nach zweimaliger Applikation desselben Stimulus (schwarze und weiße Balken) gegenüber den Kombinationen (graue Balken) vor allem in den Feldern S1 und S2, also dem gustatorischen Anteil des NTS auftritt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die in dieser Arbeit eingeführte, neuartige Methode der NTS-Unterteilung für Horizontalschnitte an mehreren Beispielen als der traditionellen Methode überlegen dargestellt hat. Wie die traditionelle Methode beruht die neuartige auf topologischen Merkmalen und nicht auf den anatomischen und funktionalen Unterschieden der NTS-Subregionen und ist so rasch und ohne zusätzliche Färbungen einsetzbar. Ob sich diese Art der Unterteilung auch bei anderen Spezies bewährt, deren NTS eine andere Form aufweist, muss durch zukünftige Experimente geklärt werden.

5.3 Die Arc-catFISH-Methode zur Untersuchung der Geschmacksverarbeitung

Auf den folgenden Seiten soll die Eignung der Arc-catFISH-Methode zur Untersuchung der Geschmacksverarbeitung erörtert werden. Hierzu werden Fragen diskutiert, die die Ergebnisse dieser Arbeit aufgeworfen haben, und die Ergebnisse in den Kontext bereits veröffentlichter Studien und unveröffentlichter Experimente unserer Abteilung gestellt.

5.3.1 Identität der Arc exprimierenden Zellen

Wie in Abschnitt 1.1.4 auf S. 6 dargestellt, sind die Zellen des NTS in Bezug auf ihre Funktion sehr heterogen. Es stellt sich also die Frage, welche Funktion die Zellen besitzen, die nach Bitterstimulation Arc exprimieren.

Die Arc exprimierenden Zellen wiesen stets einen relativ großen, runden und heterogen gefärbten Zellkern auf. Die ebenfalls zu beobachtenden kleineren, intensiv gefärbten Zellkerne, die vermutlich zu Gliazellen gehören,¹¹⁴ zeigten in keinem Fall Arc-RNA. Um den Zelltyp genau zu bestimmen, könnten immunhistochemische Färbungen mit geeigneten Antikörpern eingesetzt werden, die auf Markerproteine für verschiedene Zelltypen ansprechen. Auch die Form und Größe des Zellkörpers und der Dendriten kann Hinweise auf die Funktion einer NTS-Zelle liefern.⁵⁴ Allerdings dürfte es sehr aufwendig sein, die für die entsprechenden Färbungen nötigen Techniken mit einer Arc-catFISH-Analyse zu verbinden.

Es ist unwahrscheinlich, dass es sich um Neurone handelt, die auf Temperaturänderungen in der Mundhöhle reagieren, da alle Geschmacksstimuli dieselbe Temperatur aufwiesen, aber nicht alle Stimuli eine erhöhte Arc-Expression hervorriefen. Auch Neurone, die auf taktile Stimulation reagieren, sind unwahrscheinlich, da taktile Reize während der Stimulation unabhängig vom Geschmacksstoff erfolgten. Wenn es sich um Neurone handelte, die auf Schmerzreize reagieren, wäre bei den hochkonzentrierten Natriumchlorid- und Citronensäurelösungen eine starke Aktivierung zu erwarten gewesen. Dies war jedoch nicht der Fall.

Die Lokalisierung des Großteils der Zellen in den rostro-medialen Teilen des dorsalen NTS spricht dafür, dass es sich um gustatorische Neurone handelt. Dieser Teil des NTS erhält den Großteil der gustatorischen Afferenzen (vgl. Abb. 5.1). Auch die durch Bitterstimulation angeregte Fos-Expression tritt gehäuft in diesem Teil des NTS auf.^{57,89,106} Um zu untermauern, dass es sich um Neurone handelt, die auf Geschmacksreize reagieren, könnte man die Arc-Expression bei Tieren untersuchen, denen entweder die Geschmacksnerven durchtrennt wurden oder denen durch genetische Manipulation bestimmte Teile der Bittergeschmacks-kaskade fehlen.

5.3.2 Warum führen nur Bittersubstanzen zu erhöhter Arc-Expression?

Die einmalige Stimulation zur Etablierung der Methode ergab, dass nur die Stimulation mit Bitterstoffen zu einer erhöhten Arc-Expression führt. Dies war bei allen drei eingesetzten Bitterstimuli der Fall. Bei allen anderen Geschmacksstoffen war, unabhängig von der Geschmacksqualität und davon, ob es sich um einen attraktiven oder aversiven Stimulus handelte, kein Unterschied zum Kontrollstimulus feststellbar (s. Abb. 4.10, S. 48). Eine mögliche Ursache dafür könnte im Mechanismus der Arc-Induktion begründet sein. Im Hippocampus ist eine hochfrequente Stimulation nötig, um die Arc-Expression

¹¹⁴J. F. Guzowski, *Hippocampus* 12 (2002), Nr. 1, S. 86–104.

⁵⁴R. M. Bradley u. a. *The Role of the Nucleus of the Solitary Tract in Gustatory Processing*. Frontiers in Neuroscience. Boca Raton (FL), 2007. ISBN: 978-0-8493-4200-4

⁵⁷S. P. Travers, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282 (2002), Nr. 6, R1798–1810.

⁸⁹J. B. Travers u. a., *Chem Senses* 32 (2007), Nr. 2, S. 129–137.

¹⁰⁶C. Y. Chan, J. E. Yoo und S. P. Travers, *Chem Senses* 29 (2004), Nr. 7, S. 573–581.

anzustoßen.^{121,122,126} Die Frequenzen, die zur künstlichen *Arc*-Induktion mittels elektrischer Stimulation eingesetzt werden, liegen mit 200–400 Hz deutlich über den Frequenzen, die man in den afferenten gustatorischen Fasern beobachtet. Diese liegen im unteren bis mittleren zweistelligen Bereich und überschreiten selten 50 Hz.^{24,103,154,163}

Bradley und Kollegen berichten, dass im NTS zwei Typen von Neuronen vorkommen. Zum einen solche, die eine Alles-oder-Nichts-Antwort liefern. Sobald ein bestimmter Reizschwellwert erreicht ist, zeigen diese Neurone einen exzitatorischen postsynaptischen Strom (EPSC) mit konstanter Amplitude. Zum anderen solche, bei denen der EPSC in Abhängigkeit der Stärke der afferenten Signale kontinuierlich bis zu einem Plateau ansteigt (s. Abschnitt 1.1.4, S. 6). Erstere treten vorwiegend im Projektionsgebiet der *Chorda tympani* auf, haben ein kleines rezeptives Feld und projizieren in die aufsteigende Geschmacksbahn. Letztere hingegen integrieren viele Afferenzen, besitzen ein großes rezeptives Feld und sind so in der Lage, einkommende Signale zu verstärken und zu modulieren. Sie projizieren vorwiegend in die oromotorischen Kerne der *Formatio reticularis*.^{66,71} Es ist denkbar, dass eine ausreichende Aktivierung der Zelle, die für *Arc*-Expression notwendig ist, nur in den Neuronen mit gestaffelter Antwort vorkommt. Durch das große rezeptive Feld könnten mehr ankommende Signale in einem Neuron zusammenlaufen und gemeinsam die *Arc*-Expression auslösen. Das würde bedeuten, dass die *Arc* exprimierenden Zellen vorwiegend in die Auslösung der Abwehrreflexe involviert sind. Da diese Abwehrreflexe insbesondere bei bitteren Geschmacksstoffen auftreten,^{106,152} würde das auch erklären, warum nur Bitterstimuli zur *Arc*-Expression führen. Wie in Abschnitt 5.3.6 dargestellt, spricht dies dafür, dass es sich bei den *Arc* exprimierenden Zellen um dieselben handelt, die auch bitterinduzierte *Fos*-Expression zeigen.

Ein weiterer möglicher Grund leitet sich aus dem Mechanismus der *Arc*-Induktion ab. Wie in Abschnitt 1.3.1 auf Seite 12 beschrieben, sind mehrere Signaltransduktionswege an der *Arc*-Induktion beteiligt. Auch wenn diese im Detail noch nicht bekannt sind, wurde berichtet, dass der zeitliche Verlauf der Induktion von den beteiligten Rezeptoren abhängt. Werden Glutamatrezeptoren vom NMDA-Typ und spannungsabhängige Calciumkanäle aktiviert, kommt es zu einer raschen *Arc*-Transkription. Werden hingegen metabotrope Glutamatrezeptoren aktiviert, tritt *Arc*-Expression erst mit einer Verzögerung von ein bis zwei Stunden auf.¹²⁰ Es ist denkbar, dass nicht bittere Geschmacksstoffe zu einer Aktivierung von Zellen im NTS führen, in denen eine verzögerte *Arc*-Expression auftritt. Da der längste Zeitraum zwischen Stimulation und Tötung der Tiere 30 Minuten betrug, wäre eine verzögerte *Arc*-Expression mit dem hier verwendeten Protokoll verborgen geblieben. Zur Überprüfung dieser Theorie wäre ein einfaches Experiment mit einem Intervall von ein bis zwei Stunden zwischen Stimulation und Tötung geeignet. Es ist jedoch zweifelhaft, ob sich eine eventuelle verzögerte *Arc*-Expression für catFISH-Experimente eignen würde, da alle bislang publizierten Studien auf der schnellen *Arc*-Expression basieren.

Auch die FLI-Methode scheint nicht für alle Geschmacksstimuli gleichermaßen gut geeignet zu sein. So führte die Stimulation mit 0,3 M Saccharose oder 0,3 M Natriumchlorid nicht zu einer veränderten *Fos*-Expression gegenüber Stimulation mit Wasser.^{57,89} Außerdem tritt bei FLI-Experimenten häufig eine relativ starke *Fos*-Expression bereits ohne Stimulus oder nur bei Wasserstimulation auf. Die Stimulation mit Geschmacksstoffen führte in einigen Fällen nur zu wenig zusätzlicher Expression.^{87,89,106} Auch ist die *Fos*-Expression nicht spezifisch für gustatorische Stimuli. Bereits orotaktile Stimulation durch natürliches

¹²¹G. L. Lyford u. a., *Neuron* 14 (1995), Nr. 2, S. 433–445.

¹²²W. Link u. a., *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995), Nr. 12, S. 5734–5738.

¹²⁶D. E. Moga u. a., *Neuroscience* 125 (2004), Nr. 1, S. 7–11.

²⁴J. Miller I. J., *J Gen Physiol* 57 (1971), Nr. 1, S. 1–25.

¹⁰³M. Dahl, R. P. Erickson und S. A. Simon, *Brain Res* 756 (1997), Nr. 1-2, S. 22–34.

¹⁵⁴M. E. Frank, S. L. Bieber und D. V. Smith, *J Gen Physiol* 91 (1988), Nr. 6, S. 861–896.

¹⁶³S. I. Sollars und D. L. Hill, *J Physiol* 564 (2005), Nr. Pt 3, S. 877–893.

⁶⁶M. Wang und R. M. Bradley, *Brain Res* 1328 (2010), S. 71–78.

⁷¹T. Suwabe und R. M. Bradley, *J Neurophysiol* 102 (2009), Nr. 1, S. 546–555.

¹⁵²H. J. Grill und R. Norgren, *Brain Res* 143 (1978), Nr. 2, S. 263–279.

¹²⁰J. D. Shepherd und M. F. Bear, *Nat Neurosci* 14 (2011), Nr. 3, S. 279–284.

⁸⁷M. I. Harrer und S. P. Travers, *Brain Res* 711 (1996), Nr. 1-2, S. 125–137.

Verhalten, wie Putzen, kann zu *Fos*-Expression im NTS führen.⁸⁹

Arc-Expression scheint also spezifisch nur nach Bitterstimulation aufzutreten. Über die Gründe lässt sich bislang nur spekulieren. Wie in Abschnitt 1.3.2 auf Seite 13 dargestellt, gibt es mittlerweile jedoch eine Reihe von Varianten der catFISH-Methode und zumindest eine alternative Technik. Diese beruhen teils auf der Expression anderer *Immediate-early*-Gene, wie *Homer1a*, *Egr1* und *Fos*. Möglicherweise eignen sich diese Methoden zur Untersuchung der Verarbeitung nicht bitterer Geschmacksstoffe. Da das Hauptaugenmerk bei der Charakterisierung von *Immediate-early*-Genen bislang auf dem Vorderhirn und speziell dem Hippocampus lag,¹¹⁶ wäre es lohnend, direkt in den Gebieten der Geschmacksverarbeitung nach rasch induzierten Genen zu suchen, die sich als Aktivitätsmarker eignen. Durch moderne Technologien wie Laser-Mikrodissektion und DNA-Microarrays sind Kosten und Aufwand für solche Experimente stark gesunken.

5.3.3 Aktivierung von Bitterzellen durch hochkonzentrierte Salzstimuli

Eine kürzlich erschienene Publikation zeigt, dass hohe Konzentrationen von Natriumchlorid Bitterrezeptorzellen aktivieren und dabei dieselben Signalkomponenten eine Rolle spielen wie beim Bittergeschmack. Die Autoren vermuten, dass die Aversion gegenüber hochkonzentrierten Salzlösungen durch den Bittersignalweg hervorgerufen wird.¹⁴¹ Die verwendete NaCl-Konzentration lag mit 500 mM etwas unterhalb jener, die in dieser Arbeit als aversiver Stimulus eingesetzt wurde. Hieraus ergibt sich die Frage, warum bei den *Arc*-catFISH-Experimenten nach Applikation der hochkonzentrierten Salzlösung kein Unterschied in der *Arc*-Expression im Vergleich zum Kontrollstimulus beobachtet wurde.

Elektrophysiologische Studien haben gezeigt, dass die Neuronentypen in Geschmacksfasern und NTS, die am stärksten durch Bitterstoffe aktiviert werden, auch auf salzige und saure Stimuli ansprechen. Allerdings ist die durch Bitterstimulation hervorgerufene Aktivität deutlich stärker.⁶⁵ Von einer Neuronenpopulation im NTS, die gleichermaßen auf bitter und hochkonzentrierte Salz- und Sauerstimuli reagiert, wurde bisher nicht berichtet. Bislang wurde nur eine Studie veröffentlicht, die *Fos*-Expression im NTS nach Applikation hochkonzentrierter Salzlösungen untersucht. Die Stimulation mit 1000 mM NaCl, nicht jedoch mit 600 mM NaCl oder darunter, führte zur signifikanten Erhöhung der *Fos*-Expression im NTS. Vergleicht man jedoch die Verteilung *Fos* exprimierender Neurone nach Salz- und Chininstimulation, zeigt sich, dass die Erhöhung der *Fos*-Expression nur teilweise in denselben Unterteilungen des NTS auftritt. Nach Chininstimulation ist sie fast ausschließlich im dorsomedialen Feld zu beobachten,^{57,89,106} während sie nach Salzstimulation auf mehrere Felder verteilt ist. Eine Erhöhung trat zudem nur in einzelnen coronalen Ebenen auf.¹⁵⁷ Dies weist darauf hin, dass durch Stimulation mit Bitterstoffen und hochkonzentrierten Salzstimuli nicht die gleiche Zellpopulation im NTS aktiviert wird. Da das Muster der *Fos* exprimierenden Zellen bei beiden Stimuli Überlappungen zeigte, ist es möglich, dass ein geringer Anteil von NTS-Neuronen auf beide Stimuli reagiert.

Bedauerlicherweise beschränkten sich beide Experimente mit hochkonzentrierten Salzlösungen auf das Innervationsgebiet der *Chorda tympani*. Oka *et al.* arbeiteten an Rezeptorzellen der Pilzpapillen und Kwak *et al.* stimulierten nur die vordere Zunge. Bei der Ausprägung von Abwehrverhalten scheint jedoch vor allem die hintere Zunge von Bedeutung zu sein. In den Blätterpapillen und der Wallpapille befinden sich der Großteil der Bitterrezeptoren und der *N. glossopharyngeus*, der sie innerviert, ist entscheidend für Abwehrreflexe.^{75,161,164}

¹¹⁶E. Nedivi u. a., *Nature* 363 (1993), Nr. 6431, S. 718–722.

¹⁴¹Y. Oka u. a., *Nature* 494 (2013), Nr. 7438, S. 472–475.

⁶⁵S. P. Travers und L. C. Geran, *Physiol Behav* 97 (2009), Nr. 5, S. 592–603.

¹⁵⁷Y. Kwak u. a., *Korean J Physiol Pharmacol* 15 (2011), Nr. 6, S. 437–443.

⁷⁵L. C. Geran und S. P. Travers, *J Neurophysiol* 101 (2009), Nr. 3, S. 1598–1612.

¹⁶¹C. T. King u. a., *J Neurosci* 19 (1999), Nr. 8, S. 3107–3121.

¹⁶⁴C. T. King, M. Garcea und A. C. Spector, *J Neurosci* 20 (2000), Nr. 22, S. 8426–8434.

5.3.4 Warum reagiert nur ein Teil der Zellen auf beide Stimuli?

Eine der offensichtlichsten Fragen, die sich aus den Ergebnissen der *Arc*-catFISH-Experimente ergibt, ist, warum nur etwa ein Drittel der *Arc* exprimierenden Zellen durch beide Stimuli zur *Arc*-Expression angeregt wurde. Man könnte annehmen, dass stets dieselben Zellen reagieren, wenn derselbe Stimulus präsentiert wird. Um diese Frage zu klären, sollten zunächst andere Publikationen zum Vergleich herangezogen werden, die die *Arc*-catFISH-Methode eingesetzt haben. Jedoch wurde nur in wenigen Studien ein Stimulationsprotokoll eingesetzt, bei dem zu beiden Stimulationszeitpunkten auch derselbe Stimulus verwendet wurde. In der ersten Studie, bei der die *Arc*-catFISH-Methode zur Anwendung kam, wurden Neurone des Hippocampus untersucht. Als Stimuli dienten unbekannte Umgebungen, in die die Versuchstiere zu den betreffenden Zeitpunkten gesetzt wurden. Handelte es sich zweimal um dieselbe Umgebung, trat bei etwa 70–75 % der Neurone *Arc*-RNA in Nukleus und Zytoplasma auf.¹²⁴ Bei drei weiteren Studien kam eine catFISH-Variante zum Einsatz, die auf der Expression der beiden IEGs *Arc* und *Homer1a* beruht (s. Abschnitt 1.3.2, S. 13), die in denselben Neuronen exprimiert werden.¹³⁶ Die *Homer1a*-RNA tritt später im Nukleus auf als *Arc*-RNA und wird so als Indikator für den früheren der beiden Stimuli genutzt. Bei dieser Technik lag der Anteil doppelmarkierter Zellen nach Applikation desselben Stimulus zu beiden Zeitpunkten bei etwa 65 %, ¹³³ 37–47 %¹⁶⁵ oder etwa 50 %.¹³⁰ Es scheint also ein der Methode inhärentes Phänomen zu sein, dass nur ein Teil der Neurone auf zwei gleiche Applikationen mit *Immediate-early*-Gen-Expression reagiert.

Dennoch liegen die in dieser Studie beobachteten Anteile tendenziell unterhalb den zuvor publizierten. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass es sich bei der beobachteten *Arc*-Expression nicht um einen physiologischen Prozess handelt. Alle bisherigen *Arc*-catFISH-Experimente wurden in Strukturen des Vorderhirns durchgeführt, vorwiegend im Hippocampus und der Amygdala,^{124,133–135} aber auch in Teilen des Neocortex.^{130,132} Diese Regionen zeigen bereits in unstimulierten Tieren eine basale *Arc*-Expression. Im Hirnstamm dagegen ist die Expression von *Arc* insgesamt sehr gering. Demnach scheint das *Arc*-Protein unter physiologischen Umständen im Hirnstamm nicht von großer Bedeutung zu sein, oder zumindest eine andere Rolle zu spielen als in den vorgenannten Hirnbereichen, wo auch normales Verhalten zu einer relativ großen Zahl von Neuronen mit starker *Arc*-Expression führt. Wie in Abschnitt 5.1.1 beschrieben, wurden die Konzentrationen der applizierten Bitterstoffe in Bereichen maximaler Nervenaktivierung gewählt und waren damit um Größenordnungen über der Wahrnehmungsschwelle. Auch eine Stimulation über den Zeitraum von zwei Minuten dürfte bei derart hohen Konzentrationen aversiver Substanzen in der Natur nicht vorkommen. Es ist also denkbar, dass es sich bei der hier beobachteten *Arc*-Expression um einen Prozess handelt, der unter natürlichen Umständen nicht vorkommt, sondern nur durch die vergleichsweise starke Stimulation mit Bitterstoffen hervorgerufen werden kann. Zusätzlich spielen möglicherweise Sensitivierungs- und Desensitivierungseffekte eine Rolle. Möglicherweise werden manche Neurone zwar durch den ersten Stimulus zur *Arc*-Expression angeregt, reagieren in der Folge jedoch weniger sensibel auf weitere Stimuli. Umgekehrt könnte in anderen Neuronen zwar der erste Stimulus für eine *Arc*-Expression nicht ausreichen, das Neuron aber in einen angeregten Zustand versetzen, bei dem ein zweiter Stimulus gleicher Intensität zur *Arc*-Expression führt.

Eine weitere mögliche Erklärung für den hohen Anteil an Zellen, die bei zweimaliger Applikation desselben Stimulus nur auf einen der Stimuli reagierten, ist, dass es sich bei den beobachteten *Arc* exprimierenden Zellen um verschiedene Neuronentypen mit unterschiedlicher Funktion handelt. Für diese Theorie spricht, dass die Zellen, die nur auf den ersten Stimulus reagierten, tendenziell in einem

¹²⁴J. F. Guzowski u. a., *Nat Neurosci* 2 (1999), Nr. 12, S. 1120–1124.

¹³⁶A. Vazdarjanova u. a., *J Neurosci* 22 (2002), Nr. 23, S. 10067–10071.

¹³³A. Vazdarjanova und J. F. Guzowski, *J Neurosci* 24 (2004), Nr. 29, S. 6489–6496.

¹⁶⁵R. Nalloor, K. M. Bunting und A. Vazdarjanova, *Front Behav Neurosci* 6 (2012), S. 27.

¹³⁰M. P. Sadoris, P. C. Holland und M. Gallagher, *J Neurosci* 29 (2009), Nr. 49, S. 15386–15396.

¹³⁴S. K. Barot u. a., *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008), Nr. 52, S. 20959–20963.

¹³⁵B. Desgranges u. a., *PLoS One* 5 (2010), Nr. 4, e10097.

¹³²E. P. Carpenter-Hyland u. a., *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010), Nr. 33, S. 14828–14832.

anderen Teil des NTS vorkamen, als die Zellen, die nur auf den zweiten Stimulus reagierten (vgl. Abb. 4.22, S. 60). Diese Auftrennung scheint dabei den Grenzen zwischen gustatorischem und nichtgustatorischem NTS zu folgen, die sich wie in Abschnitt 1.1.3 auf Seite 5 dargestellt, in Konnektivität und Funktion unterscheiden.

In den folgenden Abschnitten soll näher auf die Funktion der Arc exprimierenden Zellen im gustatorischen und nichtgustatorischen NTS eingegangen werden.

5.3.5 Funktion der Arc exprimierenden Neurone im nichtgustatorischen NTS

Beim Vergleich der Stärke der beiden Stimuli (vgl. Abb. 4.22) fiel auf, dass im nichtgustatorischen NTS tendenziell der zweite Stimulus zu mehr Arc-Expression führte als der erste. Da der caudale NTS Afferenzen aus dem Gastrointestinaltrakt erhält, liegt die Vermutung nahe, dass die vermehrte nukleäre Arc-Expression durch eine verzögerte Stimulation von Sensoren im Gastrointestinaltrakt herrühren könnte. Bitterrezeptoren wurden in vielen Abschnitten des Verdauungstrakts gefunden, angefangen vom Magen bis zum Colon.¹⁶⁶ Die Verzögerung wäre in diesem Fall dadurch zu erklären, dass die Stimulationslösungen zunächst zu den Sensoren, etwa im Dünndarm gelangen müssen. Auch wäre es möglich, dass die Bittersubstanzen in den Blutkreislauf gelangen. So könnten sie direkt auf Neurone im NTS wirken, da der caudale NTS in direkter Nachbarschaft zur *Area postrema* liegt, die nicht durch die Blut-Hirn-Schranke geschützt wird.

Wäre eine solche verzögerte Aktivierung für die beobachteten Unterschiede verantwortlich, so müsste sie auch bei den einmalig zum Zeitpunkt -30 min stimulierten Tieren auftreten. Auch hier würde ausreichend Zeit bis zur Tötung vergehen, um eine zeitversetzte Antwort zu beobachten. Dies ist jedoch nicht der Fall. Wie in Abbildung 4.10 A auf Seite 48 zu sehen, tritt bei keinem der drei Bitterstimuli eine Erhöhung der nukleären Arc-Signale auf, wenn zum Zeitpunkt -30 min stimuliert wurde. Sie liegt im Gegenteil auf einem vergleichbaren Niveau wie die zytoplasmatischen Arc-Signale beim Stimulationszeitpunkt -5 min und ist somit als Hintergrund zu betrachten.

Eine andere Erklärung für die stärkere Aktivierung der Zellen im caudalen NTS durch den zweiten Stimulus liegt im Blutdruck der Tiere. Mäuse sind Fluchttiere. Das Entfernen aus dem Käfig, die Fixierung und die forcierte Stimulation mit stark aversiven Substanzen stellen einen Stressor für das Tier dar. Es ist also denkbar, dass der Stress durch den Stimulationsvorgang eine akute Erhöhung des Blutdrucks zur Folge hat. Der caudale NTS enthält Neurone, die Information von Barorezeptoren erhalten, und den Blutdruck überwachen und regulieren. Es ist ebenfalls bekannt, dass Veränderungen im Blutdruck die Expression von *Fos* im caudalen NTS auslösen können.^{167,168} Möglicherweise ist die beobachtete Arc-Expression eine Folge des angestiegenen Blutdrucks. Bei zweimaliger Stimulation würde die zweite Stimulation einen größeren Stressor darstellen, da die Maus bereits erfahren hat, was sie erwartet. Das könnte zu einem stärkeren oder schnelleren Anstieg des Blutdrucks und stärkerer Aktivierung der barosensitiven Zellen des caudalen NTS führen. Vergleicht man die prozentuale Verteilung der gesamten Arc exprimierenden Zellen auf die sechs Unterregionen zwischen Tieren, die einmal oder zweimal mit Bittersubstanzen stimuliert wurden, zeigt sich der Trend, dass der Anteil Arc exprimierender Zellen nach zweimaliger Stimulation insbesondere in den caudal gelegenen Feldern S5 und S6 steigt, während er in den übrigen Feldern gleich bleibt oder sinkt (s. Abb. 5.4). Dies würde die Vermutung stützen, dass es sich um einen Effekt des wiederholten Stimulationsvorgangs handelt. Ob tatsächlich der Blutdruck die Ursache ist, müsste durch zusätzliche Experimente untersucht werden.

¹⁶⁶M. Behrens und W. Meyerhof, *Physiol Behav* 105 (2011), Nr. 1, S. 4–13.

¹⁶⁷C. Dean und J. L. Seagard, *Neuroscience* 69 (1995), Nr. 1, S. 249–257.

¹⁶⁸C. D. Shih, S. H. Chan und J. Y. Chan, *Brain Res* 738 (1996), Nr. 1, S. 39–47.

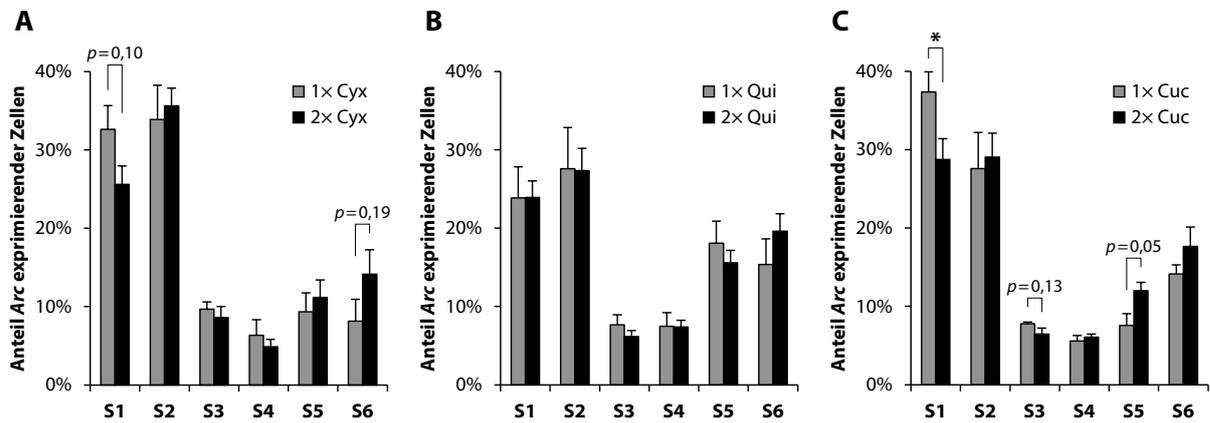


Abbildung 5.4: Verteilung der *Arc* exprimierenden Zellen auf die sechs Felder S1–S6 nach ein- oder zweimaliger Stimulation mit demselben Bitterstoff. **A:** Verteilung nach einmaliger bzw. zweimaliger Stimulation mit Cycloheximid. n = 5–6 **B:** Desgleichen für Chinin. n = 5–9 **C:** Desgleichen für Cucurbitacin. n = 4–9. Auf Unterschiede wurde mittels t-Test getestet (* $p \leq 0,05$). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte des Anteils *Arc* exprimierender Zellen im jeweiligen Feld und Standardfehler.

5.3.6 Funktion der *Arc* exprimierenden Neurone im gustatorischen NTS

Wie in Abschnitt 5.3.1 auf Seite 69 dargestellt, handelt es sich bei den *Arc* exprimierenden Zellen wahrscheinlich um gustatorische Neurone. Wie aber werden diese Neurone innerviert und was sind ihre Projektionsgebiete? Auch wenn der Großteil der *Arc*-Expression in den Feldern S1 und S2 zu beobachten ist, weist der am weitesten rostral gelegene Teil von Feld S1 typischerweise nicht sehr viele *Arc* exprimierende Neurone auf. Die meisten dieser Zellen in Feld S1 waren etwas weiter caudal gelegen (vgl. Abb. 4.11, S. 49 und 4.14, S. 53). Dies weist darauf hin, dass hauptsächlich Afferenzen des *N. glossopharyngeus* die *Arc* exprimierenden Zellen erreichen.

Camille King und Kollegen haben gezeigt, dass in der Ratte die durch Chinin induzierte *Fos*-Expression im rostro-medialen Teil des dorsalen NTS stark abnimmt, wenn der *N. glossopharyngeus* durchtrennt wird. Damit einhergehend nimmt die Anzahl der sogenannten *gapes* stark ab, die zu den typischen Abwehrreflexen gehören.¹⁶¹ Bei Reinnervierung der Papillen durch den *N. glossopharyngeus* werden sowohl *Fos*-Expression als auch Abwehrverhalten wiederhergestellt.¹⁶⁴ Travers und Kollegen schließen aus den Ergebnissen von King *et al.* und einer Reihe weiterer Ergebnisse, dass die Rolle des *N. glossopharyngeus* nicht in der Geschmacksdiskriminierung, sondern vor allem in der Ausprägung der Abwehrreflexe besteht.^{161,164,169,170} Die Unterscheidung zwischen verschiedenen Geschmackslösungen war nur in den Fällen gestört, in denen einer oder beide Facialisäste durchtrennt wurden, nicht jedoch bei Durchtrennung des *N. glossopharyngeus*.^{13,171} Entsprechend besteht die Funktion der nach Chinin-Stimulation beobachteten *Fos* exprimierenden Zellen vor allem in der Ausprägung des Abwehrverhaltens und nicht in der Geschmacksdiskriminierung. Die Lokalisierung und das Verteilungsmuster der *Arc*-Expression nach Bitterstimulation ist dem der *Fos*-Expression sehr ähnlich.^{57,89,106} Es ist daher wahrscheinlich, dass die *Arc* exprimierenden Zellen im gustatorischen NTS ebenso wie die *Fos* exprimierenden Zellen eine Rolle in der Ausbildung der Abwehrreflexe spielt. Dies ließe sich durch *Arc*-catFISH-Analysen von Mäusen, denen der IX. Hirnnerv durchtrennt wurde, überprüfen.

5.3.7 Vergleich der Anzahl *Arc* und *Fos* exprimierender Zellen im NTS

Wie verhalten sich die Zahlen durch Bitterstimulation aktivierter Zellen, die mit der *Arc*-catFISH-Methode beobachtet wurden, im Vergleich zu anderen experimentellen Ergebnissen? Der Vergleich zu

¹⁶⁹ J. B. Travers, H. J. Grill und R. Norgren, *Behav Brain Res* 25 (1987), Nr. 3, S. 233–246.

¹⁷⁰ S. P. Travers und J. B. Travers, *Chem Senses* 30 Suppl 1 (2005), S. i180–181.

¹³ A. C. Spector und S. P. Travers, *Behav Cogn Neurosci Rev* 4 (2005), Nr. 3, S. 143–191.

¹⁷¹ S. J. St John und A. C. Spector, *J Neurosci* 18 (1998), Nr. 11, S. 4353–4362.

Ergebnissen aus FLI-Experimenten ist nicht einfach zu ziehen, da der überwiegende Teil an Ratten durchgeführt wurde, die ein größeres Gehirn haben als Mäuse. Die wenigen Studien, die geschmacksinduzierte *Fos*-Expression in der Maus untersucht haben, haben meist coronale Schnitte verwendet und die *Fos*-Expression auf eine andere Weise quantifiziert als in der vorliegenden Arbeit. Eine Studie zeigt Zahlen *Fos* exprimierender Zellen nur für einen Gewebeschnitt im rostralen NTS, der auf der Höhe der maximalen *Fos*-Expression in der Ratte liegt.⁸⁹ Hier wurden nach Stimulation mit Chinin etwa 260 *Fos* exprimierende Zellen gezählt, davon etwa 130 im dorsalen NTS. Allerdings wurde *Fos*-Expression auch nach Stimulation mit Wasser in etwa 200 Zellen nachgewiesen, davon etwa 100 im dorsalen NTS. Eine vorsichtige Hochrechnung unter Berücksichtigung der größeren Schnittdicke (30–40 µm im Vergleich zu 14 µm in dieser Arbeit) kann mit einem Faktor von 10 erfolgen, um auf die *Fos*-Expression im gesamten NTS zu schließen. Dann stünden im dorsalen NTS nach Chinin-Stimulation etwa 1300 *Fos* exprimierende Zellen etwa 860 *Arc* exprimierenden Zellen gegenüber (vgl. Tab. 4.2, S. 51). Es ist aber zu bedenken, dass die *Fos*-Expression nach Bitterstimulation nur um etwa 30 % gegenüber Wasserstimulation erhöht war. Die *Arc*-Expression nach Bitterstimulation hingegen war im Vergleich zum Kontrollstimulus um etwa 500 % erhöht. Vermutlich ist also nur ein Bruchteil der in FLI-Experimenten beobachteten *Fos*-Expression auf die Stimulation mit Geschmacksstoffen zurückzuführen und der Großteil auf basale *Fos*-Expression oder durch andere Reize ausgelöste Aktivierung im NTS, beispielsweise durch taktile Stimulation.

Bei den übrigen Studien kamen keine Bittersubstanzen sondern nur Stimuli anderer Geschmacksqualitäten zum Einsatz. Nach Stimulation mit 150 mM Natriumglutamat bzw. 150 mM Natriumchlorid wurden etwa 680 bzw. 384 *Fos* exprimierende Neurone in neun Standardschnitten im dorsalen NTS beobachtet. Extrapoliert man anhand der Schnittdicke und des Abstands der Schnitte die Zahlen für den gesamten dorsalen NTS, ergeben sich etwa 2550 bzw. 1441 *Fos* exprimierende Zellen. Nach Wasserstimulation waren es etwa 130 Zellen, hochgerechnet etwa 486.¹⁵¹ Im Vergleich dazu wurden nach Bitterstimulation etwa 680–860 *Arc* exprimierende Zellen im dorsalen NTS beobachtet (vg. Tab. 4.2, S. 51). Da die Stimulation bei Stratford *et al.* durch freiwillige Aufnahme der Geschmackslösungen nach 23-stündigem Wasserentzug erfolgte, ist davon auszugehen, dass es zu einer bedeutenden Aufnahme der Stimulationslösung kam und ein Teil der beobachteten *Fos*-Expression, insbesondere in den weiter caudal gelegenen Bereichen des NTS, auf Aktivierung von Rezeptoren im Gastrointestinaltrakt oder andere postprandiale Effekte zurückzuführen ist.¹⁵¹

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Anzahl *Arc* exprimierender Zellen im NTS nach Bitterstimulation in derselben Größenordnung liegt wie die Anzahl *Fos* exprimierender Zellen nach Geschmacksstimulation. Dies weist darauf hin, dass *Arc*-Expression als Aktivitätsmarker ebenso gut oder gar besser geeignet ist als die vielfach eingesetzte *Fos*-Expression.

5.3.8 Vergleich der Anzahl *Arc* exprimierender Zellen im NTS und der Anzahl bitterverarbeitender Zellen in der Peripherie

Die Frage, wie sich die Zahlen *Arc* exprimierender Zellen im NTS gegenüber den Zahlen der bitterverarbeitenden Zellen im peripheren Geschmackssystem verhalten, stellte sich als kompliziert heraus, da keine Zahlen über Bitterrezeptorzellen oder bittertransportierende Nervenfasern in der Maus publiziert sind, die das gesamte periphere Geschmackssystem abdecken. Dies liegt vermutlich daran, dass der Großteil der Geschmacksforschung an Ratten oder Hamstern durchgeführt wurde, viele Studien nur den *N. facialis* und sein Versorgungsgebiet betrachten, und dass viele, vor allem elektrophysiologische, Studien nur eine kleine Zahl von Zellen untersuchen.^{64,75,84}

Anhand verschiedener publizierter Ergebnisse soll im folgenden der Versuch einer Hochrechnung erfolgen, um die Anzahl der bitterverarbeitenden Zellen im peripheren Geschmackssystem abzuschätzen.

¹⁵¹J. M. Stratford und T. E. Finger, *J Neurosci* 31 (2011), Nr. 25, S. 9101–9110.

⁶⁴F. N. Zaidi u. a., *J Comp Neurol* 511 (2008), Nr. 6, S. 753–772.

⁸⁴L. C. Geran und S. P. Travers, *J Neurophysiol* 96 (2006), Nr. 5, S. 2513–2527.

Die Anzahl der Geschmackssinneszellen, die einen bestimmten Bitterrezeptor exprimieren, den Tas2r131, wurde von Voigt *et al.* mit etwa 1335 ermittelt. In diese Zählung flossen die Geschmackspapillen der Zunge sowie die Geschmacksknospen in weichem Gaumen und *Papilla incisiva* ein. Voigt *et al.* gehen weiter davon aus, dass dieser Rezeptor in etwa der Hälfte aller Bitterrezeptorzellen exprimiert wird und schließen somit auf etwa 2600–2700 Bitterrezeptorzellen. Überdies geben sie die Anzahl der Geschmacksknospen, die diesen Rezeptor enthalten, mit etwa 517 an. Dies waren etwa 81 % aller Geschmacksknospen.¹⁷² Unter der Annahme, dass alle Geschmacksknospen, die Bitterrezeptoren enthalten, auch den Tas2r131 enthalten, kann die Anzahl der Nervenfasern abgeschätzt werden, die die Bitterinformation ins Gehirn weiterleiten. Zaidi und Kollegen berichten, dass in der Maus Pilzpapillen von durchschnittlich 4,1 Nervenfasern innerviert werden, die jeweils nur Information aus einer Geschmacksknospe weiterleiten.¹⁷³ Vorausgesetzt die Zahl der Nervenfasern pro Geschmacksknospe ist bei den anderen Nerven gleich, würden die 517 Bitterrezeptor exprimierenden Geschmacksknospen von etwa 2120 Nervenfasern versorgt. Geran und Travers berichten, dass bei Nagern etwa 30 % der Fasern im *N. glossopharyngeus* am stärksten auf Bitterstimuli reagieren.⁷⁵ Unter der Annahme, dass dieses Verhältnis bei den übrigen Nerven etwa gleich ist, liegen insgesamt also etwa 640 Fasern vor, die am stärksten auf Bitterstimuli reagieren. Nach dieser groben Abschätzung ist die Zahl der Bitterrezeptorzellen etwa um den Faktor 4 größer als die der bitter-sensitiven gustatorischen Nervenfasern. Deren Zahl wiederum liegt in derselben Größenordnung wie die der etwa 680–860 *Arc* exprimierenden Zellen im dorsalen NTS nach Bitterstimulation. Dies spricht für eine Konvergenz von Bittergeschmacksinformation von den Rezeptorzellen auf die gustatorischen Nervenfasern.

Über die Art der Verschaltung von afferenten Nerven auf die Neurone im NTS ist bislang nicht viel bekannt.⁶⁶ Die Arbeitsgruppe um Robert Erickson zeigte, dass die Aktivierung in NTS-Neuronen etwa vier bis fünffach stärker ausfällt als die Aktivität in den afferenten *Chorda-tympani*-Fasern.^{174,175} Auch Vogt und Mistretta berichteten, dass die Größe des rezeptiven Feldes von *Chorda-tympani*-Fasern zu NTS-Neuronen etwa um den Faktor 4 zunimmt, dies ebenfalls einhergehend mit einer höheren Aktivität in den NTS-Neuronen.¹⁷⁶ Diese Ergebnisse weisen auf Konvergenz der Geschmacksinformation auf NTS-Neurone hin. Gleichzeitig ist bekannt, dass einzelne Fasern der Geschmacksnerven sich im NTS aufspalten und Synapsen mit mehreren NTS-Neuronen ausbilden.^{177,178} In einer Studie, die Pseudowutviren als transneuronalen *Tracer* einsetzte, wurden pro angefärbter Zelle im *Ganglion geniculi* durchschnittlich zwölf angefärbte Zellen im rostro-centralen NTS beobachtet.⁶⁴ Bei der Verschaltung der afferenten Nerven mit NTS-Neuronen treten also sowohl Konvergenz als auch Divergenz auf.

Manche der oben aufgeführten Zahlen beruhen auf einer Reihe von Annahmen und sind daher mit Vorsicht zu betrachten. Da die genauen Zahlenverhältnisse von Rezeptorzellen, gustatorischen Fasern und gustatorischen NTS-Neuronen nicht bekannt sind, sind ein Vergleich zu der Anzahl *Arc* exprimierender Zellen und mögliche Schlüsse für die Verarbeitung von Geschmacksinformation schwer zu ziehen.

5.3.9 Die Arc-catFISH-Methode zur Untersuchung weiterer Stationen der Geschmacksverarbeitung

In den vorhergehenden Abschnitten wurde gezeigt, dass die *Arc*-Expression ein geeigneter Aktivitätsmarker für die Untersuchung bitterresponsiver Neurone im NTS ist. Wie steht es mit den nächsten Stationen der Geschmacksverarbeitung?

In Abschnitt 5.3.6 auf Seite 74 wurde dargelegt, dass die *Arc* exprimierenden Zellen vermutlich zu den NTS-Neuronen gehören, die oromotorische Zentren im Hirnstamm innervieren und somit eine Rolle

¹⁷²A. Voigt u. a., *Chem Senses* 37 (2012), Nr. 9, S. 897–911.

¹⁷³F. N. Zaidi und M. C. Whitehead, *J Neurosci* 26 (2006), Nr. 32, S. 8243–8253.

¹⁷⁴G. S. Doetsch und R. P. Erickson, *J Neurophysiol* 33 (1970), Nr. 4, S. 490–507.

¹⁷⁵J. R. Ganchrow und R. P. Erickson, *J Neurophysiol* 33 (1970), Nr. 6, S. 768–783.

¹⁷⁶M. B. Vogt und C. M. Mistretta, *J Neurosci* 10 (1990), Nr. 9, S. 3148–3157.

¹⁷⁷M. C. Whitehead und M. E. Frank, *J Comp Neurol* 220 (1983), Nr. 4, S. 378–395.

¹⁷⁸M. C. Whitehead, *J Comp Neurol* 244 (1986), Nr. 1, S. 72–85.

im Abwehrverhalten spielen. Eine interessante Fragestellung für zukünftige Experimente wäre daher, geschmacksinduzierte *Arc*-Expression in der *Formatio reticularis* des Hirnstamms zu untersuchen, mit hauptsächlichem Augenmerk auf jenen Strukturen, die durch Zellen des gustatorischen NTS innerviert werden, und die Expression in Zusammenhang mit dem Verhalten der Tiere während und nach der Stimulation zu setzen.

Die Zellen, die in die aufsteigende Geschmacksbahn projizieren, scheinen nach Stimulation mit Geschmacksstoffen nicht in größerem Maße *Arc* zu exprimieren. Daher stellt sich die Frage, ob die *Arc*-catFISH-Methode in höheren Hirnzentren der Geschmackverarbeitung eingesetzt werden kann. Bradley *et al.* argumentieren, dass die aufsteigend projizierenden Neurone im NTS in einer Alles-oder-Nichts-Weise reagieren und ein geringes rezeptives Feld aufweisen, also vornehmlich eine Relaisfunktion haben und nur wenig an der Integration von Information aus mehreren Geschmacksfasern beteiligt sind.^{66,71} Wenn dies der Fall ist, könnte die Untersuchung der nächsthöheren Station der Geschmackverarbeitung, die in der Maus der *Ncl. parabrachialis* (PbN) darstellt, ein lohnendes Ziel für künftige *Arc*-catFISH-Studien sein. *Arc* exprimierende Zellen im PbN wurden im Zuge dieser Arbeit bereits beobachtet, jedoch nicht systematisch untersucht. Im Nager stellt der PbN ebenfalls einen Scheidepunkt in der Geschmackverarbeitung dar. PbN-Neurone projizieren einerseits über den Thalamus in die gustatorischen Cortices und zum anderen entspringen hier Efferenzen in Strukturen des ventralen Vorderhirns, denen eine Rolle bei der Steuerung der Nahrungsaufnahme zukommt, wie den lateralen Hypothalamus, die Amygdala und den *Nucleus interstitialis striae terminalis*.^{179–181} Diese drei Regionen wurden bereits für catFISH-Experimente herangezogen, jedoch nicht mit dem Ziel die Verarbeitung verschiedener Geschmacksqualitäten zu untersuchen.^{130,134,135,137,182} Auch der gustatorische Cortex war bereits Gegenstand von catFISH-Experimenten.¹³⁰ Dabei wurde die *Arc/Homer1a*-catFISH-Variante eingesetzt (s. Abschnitt 1.3.2, S. 13). Diese erleichtert eine Automatisierung der Auswertung und reduziert so den Aufwand der Auswertung, der durch die Größe des Areals, die relativ hohe basale *Arc*-Expression und den großen Anteil *Arc* exprimierender Zellen, bei manueller Auswertung nicht praktikabel ist.

5.4 Implikationen der Ergebnisse für die Bitterverarbeitung

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass im gustatorischen NTS verschiedene, aber überlappende Populationen von Zellen existieren, die auf Bitterstimulation ansprechen. Unterschiedliche Populationen sind die Grundlage für die Unterscheidung verschiedener Bitterstoffe. Da die beobachteten Zellen vermutlich eine Rolle bei der Ausprägung von angeborenem Abwehrverhalten spielen (vgl. Abschnitt 5.3.6, S. 74), könnten sie eine Grundlage dafür bieten, verschiedenen Bittersubstanzen mit unterschiedlichem Verhalten zu begegnen. In Abschnitt 1.2.1 auf Seite 9 wurde dargestellt, dass nicht alle Bitterstoffe für den Organismus gleichermaßen schädlich sind, sondern sich auch vorteilhaft auswirken können. Es ist ebenfalls bekannt, dass das angeborene Abwehrverhalten durch erlernte Geschmackspräferenzen moduliert werden kann.¹⁸³ Die in dieser Arbeit identifizierten Populationen könnten eine Rolle in der Unterscheidung von schädlichen und förderlichen Bitterstoffen und der Anpassung der angeborenen Verhaltensantwort spielen. Ein geeignetes Experiment um diese Hypothese zu untersuchen, wäre, Vertreter dieser beiden Bitterstoffgruppen in einer *Arc*-catFISH-Studie gegenüberzustellen und zusätzlich zur *Arc*-Expression das Verhalten der Tiere zu beobachten. Bislang ist eine Unterscheidung von Bitterstoffen anhand ihrer Schädlichkeit für den Organismus nicht bekannt. Weder haben giftige Bitterstoffe eine geringere Wahrnehmungsschwelle als weniger giftige,¹⁰⁰ noch korreliert das Antwortverhalten

¹⁷⁹ C. B. Halsell, *J Comp Neurol* 317 (1992), Nr. 1, S. 57–78.

¹⁸⁰ T. Yamamoto, R. Matsuo und Y. Kawamura, *Neurosci Lett* 16 (1980), Nr. 1, S. 5–9.

¹⁸¹ R. Norgren, *Neuroscience* 3 (1978), Nr. 2, S. 207–218.

¹³⁷ D. Lin u. a., *Nature* 470 (2011), Nr. 7333, S. 221–226.

¹⁸² A. Chung u. a., *Learn Memory* 18 (2011), Nr. 6, S. 371–374.

¹⁸³ M. M. Galindo u. a., *Prog Mol Biol Transl Sci* 108 (2012), S. 383–426.

¹⁰⁰ J. I. Glendinning, *Physiol Behav* 56 (1994), Nr. 6, S. 1217–1227.

von bitterresponsiven Neuronen im NTS klar mit der Toxizität der Bitterstoffe.⁹⁹

Wie in Abschnitt 1.2.1 auf Seite 9 dargestellt, enthalten Bitterrezeptorzellen mehrere Bitterrezeptoren. Kollegen aus unserem Labor haben gentechnisch modifizierte Mäuse generiert, bei denen spezifisch jene Geschmacksrezeptorzellen absterben, die ein bestimmtes Bitterrezeptorgen, *Tas2r131*, exprimieren (Anja Voigt *et al.*, unveröffentlichte Daten). In diesen Mäusen ist die *Tas2r131*-Expression im gustatorischen Zungenepithel nahezu vollständig ausgeschaltet. Interessanterweise ist die Expression der übrigen Bitterrezeptoren in unterschiedlichem Maße beeinflusst. Während einzelne Rezeptoren vollständig fehlen, sind die meisten weniger stark exprimiert als in den Vergleichstieren. Allerdings ist die Expression mancher Rezeptoren scheinbar unverändert. Dies lässt auf eine heterogene Bitterrezeptorzellpopulation auf der Zunge schließen (Sandra Hübner *et al.*, unveröffentlichte Daten). Die Ausschaltung der *Tas2r131* exprimierenden Zellen hat weiterhin funktionelle Konsequenzen. Einige Bitterstoffe werden in Kurzzeitpräferenztests unverändert vermieden, während die Aversion gegenüber anderen reduziert oder nahezu gänzlich verschwunden ist (Sabine Frenzel *et al.*, unveröffentlichte Daten). Zusätzlich zu den in dieser Arbeit gezeigten Populationen im NTS scheint es also auch auf der Zunge verschiedene Populationen von Bitterrezeptor exprimierenden Geschmackssinneszellen zu geben, die sich folglich funktionell unterscheiden.

Im Hinblick auf die Frage nach der Kodierung der Geschmacksinformation weisen diese Ergebnisse auf eine Labeled-Line-Verschaltung innerhalb des bitterverarbeitenden Geschmackssystems hin. Es bleibt zu zeigen, dass die beobachteten Zellen im NTS notwendig und hinreichend für die Verarbeitung der Information des jeweiligen Bitterstoffs sind. Dies könnte durch die gezielte Ausschaltung der aktivierten Neurone nach Stimulation mit einem Bitterstoff und anschließende Verhaltensexperimente geschehen. Die Schwierigkeit dabei besteht vor allem darin, gezielt nur die aktivierten Neurone und zudem nur die im NTS aktivierten Neurone auszuschalten.

Alle drei in dieser Arbeit verwendeten Bitterstoffe werden teils durch denselben Bitterrezeptor detektiert. Durch *In-vitro-Calcium-imaging*-Experimente wurde Chinin als Ligand der Maus-Bitterrezeptoren Tas2r105, -108, -115, -126, -137, -140 und -144 identifiziert. Cucurbitacin I aktiviert die Rezeptoren Tas2r105 und -114 und Cycloheximid schließlich wurde nur als Ligand des Tas2r105 beschrieben. Alle drei Bittersubstanzen aktivieren also denselben Rezeptor, Tas2r105, wenn auch Cycloheximid zu einer deutlich stärkeren Aktivierung führt als die übrigen Substanzen. Chinin und Cucurbitacin aktivieren zusätzlich weitere Rezeptoren (Kristina Loßow, unveröffentlichte Daten). Dies ist insbesondere deshalb bemerkenswert, da Chinin, das im *In-vitro*-Experiment sieben Rezeptoren aktiviert, im NTS eine kleinere Population von Neuronen anspricht als Cycloheximid, das nur den Tas2r105 aktiviert (s. Abb. 4.21, S. 59). Zudem überlappte die Population der „Chinin-Neurone“ vollständig mit der der „Cycloheximid-Neurone“. Offensichtlich ist also die Betrachtung der Rezeptoren allein nicht ausreichend, um die Frage nach der Diskriminierung von Bitterstoffen zu klären.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass verschiedene Bittersubstanzen auf Ebene des NTS verschiedene, aber überlappende Neuronenpopulationen aktivieren. Diese Neurone sind vermutlich in die Steuerung der Abwehrreflexe involviert und könnten so die Grundlage für ein divergentes Verhalten gegenüber schädlichen und harmlosen oder nützlichen Bitterstoffen darstellen.

Die Erforschung einer möglichen Verbindung zwischen den Populationen bitterverarbeitender Zellen auf der Zunge und im NTS ist eines der wichtigsten Ziele zukünftiger Experimente. Für diesen Zweck lassen sich die gentechnisch modifizierten Mäuse mit ausgeschalteter *Tas2r131*-Zellpopulation heranziehen. Die Stimulation sollte mit Bitterstoffen erfolgen, deren Rezeptoren in diesem Mausmodell entweder unverändert, reduziert oder nicht mehr exprimiert werden bzw. gegenüber denen das Aversionsverhalten nicht, teils oder gänzlich reduziert ist. Die Charakterisierung der *Arc*-Expression nach entsprechender Stimulation könnte Aufschlüsse über die Bitterverarbeitung von der Zunge bis in den NTS liefern.

⁹⁹T. R. Scott und G. P. Mark, *Brain Res* 414 (1987), Nr. 1, S. 197–203.

Zusammenfassung

Intensive Forschung hat in den vergangenen Jahrzehnten zu einer sehr detaillierten Charakterisierung des Geschmackssystems der Säugetiere geführt. Dennoch sind mit den bislang eingesetzten Methoden wichtige Fragestellungen unbeantwortet geblieben. Eine dieser Fragen gilt der Unterscheidung von Bitterstoffen. Die Zahl der Substanzen, die für den Menschen bitter schmecken und in Tieren angeborenes Aversionsverhalten auslösen, geht in die Tausende. Diese Substanzen sind sowohl von der chemischen Struktur als auch von ihrer Wirkung auf den Organismus sehr verschieden. Während viele Bitterstoffe potente Gifte darstellen, sind andere in den Mengen, die mit der Nahrung aufgenommen werden, harmlos oder haben sogar positive Effekte auf den Körper. Zwischen diesen Gruppen unterscheiden zu können, wäre für ein Tier von Vorteil. Ein solcher Mechanismus ist jedoch bei Säugetieren nicht bekannt.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Verarbeitung von Geschmacksinformation in der ersten Station der Geschmacksbahn im Mausgehirn, dem *Nucleus tractus solitarii* (NTS), mit besonderem Augenmerk auf der Frage nach der Diskriminierung verschiedener Bitterstoffe. Zu diesem Zweck wurde eine neue Untersuchungsmethode für das Geschmackssystem etabliert, die die Nachteile bereits verfügbarer Methoden umgeht und ihre Vorteile kombiniert. Die *Arc*-catFISH-Methode (*cellular compartment analysis of temporal activity by fluorescent in situ hybridization*), die die Charakterisierung der Antwort großer Neuronengruppen auf zwei Stimuli erlaubt, wurde zur Untersuchung geschmacksverarbeitender Zellen im NTS angewandt.

Im Zuge dieses Projekts wurde erstmals eine stimulusinduzierte *Arc*-Expression im NTS gezeigt. Die ersten Ergebnisse offenbarten, dass die *Arc*-Expression im NTS spezifisch nach Stimulation mit Bitterstoffen auftritt und sich die *Arc* exprimierenden Neurone vornehmlich im gustatorischen Teil des NTS befinden. Dies weist darauf hin, dass *Arc*-Expression ein Marker für bitterverarbeitende gustatorische Neurone im NTS ist. Nach zweimaliger Stimulation mit Bittersubstanzen konnten überlappende, aber verschiedene Populationen von Neuronen beobachtet werden, die unterschiedlich auf die drei verwendeten Bittersubstanzen Cycloheximid, Chininhydrochlorid und Cucurbitacin I reagierten. Diese Neurone sind vermutlich an der Steuerung von Abwehrreflexen beteiligt und könnten so die Grundlage für divergentes Verhalten gegenüber verschiedenen Bitterstoffen bilden.

Abstract

Intense research in the past decades has led to a detailed understanding of the mammalian taste system. Some important issues, however, have remained unanswered with the established methods that have been applied so far. One of these questions is whether different bitter substances can be distinguished. There are thousands of compounds which taste bitter to humans and elicit innate aversive behavior in animals. Moreover, these bitter substances are very heterogeneous regarding their structure as well as their effect on the organism. While many bitter tastants are potent poisons, others are harmless or even have beneficial effects in the amounts that are typically ingested. The ability to discriminate between those groups of bitter tastants could be an evolutionary advantage. Such a mechanism, however, is not known for mammals.

The aim of this thesis was to study the processing of taste information in the first station of gustatory processing in the mouse brain, the nucleus of the solitary tract (NTS). Of particular interest was the question concerning discrimination of bitter tastants. To this end a new method was established for the taste system combining the advantages of methods used before while circumventing their disadvantages. The *Arc* catFISH method (cellular compartment analysis of temporal activity by fluorescent *in situ* hybridization), which allows the characterization of responses of large neuron populations to two stimuli, was used to analyze taste-processing cells in the NTS.

In the course of this project a stimulus-induced *Arc* expression in the NTS was shown for the first time. The results demonstrated that *Arc* expression in the NTS appears specifically after stimulation with bitter tastants and that the *Arc* expressing neurons are located primarily in the gustatory part of the NTS. This indicates that *Arc* expression is a marker for bitter-processing gustatory neurons in the NTS. Upon stimulating twice with bitter compounds, distinct, yet overlapping neuron populations were identified, that reacted differently to the three bitter substances cycloheximide, quinine hydrochloride, and cucurbitacin I. Presumably these neurons are involved in the regulation of aversive reflexes and could form a basis for divergent behavior towards different bitter substances.

Literatur

- [1] K. YAMAMOTO, S. MATSUNAGA, M. MATSUI, N. TAKEDA und A. YAMATODANI. Pica in mice as a new model for the study of emesis. In: *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 24 (2002), Nr. 3, S. 135–138. PMID: 12087874
- [2] G. M. FELDMAN, A. MOGYOROSI, G. L. HECK, J. A. DESIMONE, C. R. SANTOS, R. A. CLARY und V. LYALL. Salt-evoked lingual surface potential in humans. In: *Journal of Neurophysiology*, 90 (2003), Nr. 3, S. 2060–2064. PMID: 12736236
- [3] K. SCOTT. Taste Recognition: Food for Thought. In: *Neuron*, 48 (2005), Nr. 3, S. 455–464. PMID: 16269362
- [4] R. P. ERICKSON. A study of the science of taste: on the origins and influence of the core ideas. In: *Behavioral and Brain Sciences*, 31 (2008), Nr. 1, S. 59–75, 59–75. PMID: 18394244
- [5] K. KURIHARA. Glutamate: from discovery as a food flavor to role as a basic taste (umami). In: *American Journal of Clinical Nutrition*, 90 (2009), Nr. 3, 719S–722S. PMID: 19640953
- [6] F. N. MCNAMARA, A. RANDALL und M. J. GUNTORPE. Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). In: *British Journal of Pharmacology*, 144 (2005), Nr. 6, S. 781–790. PMID: 15685214
- [7] D. GAILLARD, F. LAUGERETTE, N. DARCEL, A. EL-YASSIMI, P. PASSILLY-DEGRACE, A. HICHAMI, N. A. KHAN, J. P. MONTMAYEUR und P. BESNARD. The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. In: *FASEB Journal*, 22 (2008), Nr. 5, S. 1458–1468. PMID: 18162488
- [8] C. CARTONI, K. YASUMATSU, T. OHKURI, N. SHIGEMURA, R. YOSHIDA, N. GODINOT, J. LE COUTRE, Y. NINOMIYA und S. DAMAK. Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. In: *Journal of Neuroscience*, 30 (2010), Nr. 25, S. 8376–8382. PMID: 20573884
- [9] M. M. GALINDO, N. VOIGT, J. STEIN, J. VAN LENGERICH, J. D. RAGUSE, T. HOFMANN, W. MEYERHOF und M. BEHRENS. G protein-coupled receptors in human fat taste perception. In: *Chemical Senses*, 37 (2012), Nr. 2, S. 123–139. PMID: 21868624
- [10] Y. MARUYAMA, R. YASUDA, M. KURODA und Y. ETO. Kokumi substances, enhancers of basic tastes, induce responses in calcium-sensing receptor expressing taste cells. In: *PLoS One*, 7 (2012), Nr. 4, e34489. PMID: 22511946
- [11] N. CHAUDHARI und S. D. ROPER. The cell biology of taste. In: *Journal of Cell Biology*, 190 (2010), Nr. 3, S. 285–296. PMID: 20696704
- [12] A. M. ROSEN, A. T. ROUSSIN und P. M. DI LORENZO. Water as an independent taste modality. In: *Frontiers in Neuroscience*, 4 (2010), S. 175. PMID: 21048894
- [13] A. C. SPECTOR und S. P. TRAVERS. The representation of taste quality in the mammalian nervous system. In: *Behavioral & Cognitive Neuroscience Reviews*, 4 (2005), Nr. 3, S. 143–191. PMID: 16510892
- [14] B. BUFE, P. A. BRESLIN, C. KUHN, D. R. REED, C. D. THARP, J. P. SLACK, U. K. KIM, D. DRAYNA und W. MEYERHOF. The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception. In: *Current Biology*, 15 (2005), Nr. 4, S. 322–327. PMID: 15723792

- [15] N. ROUDNITZKY, B. BUFE, S. THALMANN, C. KUHN, H. C. GUNN, C. XING, B. P. CRIDER, M. BEHRENS, W. MEYERHOF und S. P. WOODING. Genomic, genetic and functional dissection of bitter taste responses to artificial sweeteners. In: *Human Molecular Genetics*, 20 (2011), Nr. 17, S. 3437–3449. PMID: 21672920
- [16] X. LI, W. LI, H. WANG, J. CAO, K. MAHASHI, L. HUANG, A. A. BACHMANOV, D. R. REED, V. LEGRAND-DEFRETIN, G. K. BEAUCHAMP und J. G. BRAND. Pseudogenization of a sweet-receptor gene accounts for cats' indifference toward sugar. In: *PLoS Genetics*, 1 (2005), Nr. 1, S. 27–35. PMID: 16103917
- [17] F. R. BELL. Aspects of ingestive behavior in cattle. In: *Journal of Animal Science*, 59 (1984), Nr. 5, S. 1369–1372. PMID: 6392276
- [18] G. NELSON, J. CHANDRASHEKAR, M. A. HOON, L. FENG, G. ZHAO, N. J. RYBA und C. S. ZUKER. An amino-acid taste receptor. In: *Nature*, 416 (2002), Nr. 6877, S. 199–202. PMID: 11894099
- [19] X. LI, L. STASZEWSKI, H. XU, K. DURICK, M. ZOLLER und E. ADLER. Human receptors for sweet and umami taste. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (2002), Nr. 7, S. 4692–4696. PMID: 11917125
- [20] J. D. FERNSTROM, S. D. MUNGER, A. SCLAFANI, I. E. DE ARAUJO, A. ROBERTS und S. MOLINARI. Mechanisms for sweetness. In: *Journal of Nutrition*, 142 (2012), Nr. 6, 1134S–1141S. PMID: 22573784
- [21] A. SCLAFANI. The sixth taste?. In: *Appetite*, 43 (2004), Nr. 1, S. 1–3. PMID: 15262010
- [22] P. A. BRESLIN und A. C. SPECTOR. Mammalian taste perception. In: *Current Biology*, 18 (2008), Nr. 4, R148–155. PMID: 18302913
- [23] S. P. TRAVERS, C. PFAFFMANN und R. NORGREN. Convergence of lingual and palatal gustatory neural activity in the nucleus of the solitary tract. In: *Brain Research*, 365 (1986), Nr. 2, S. 305–320. PMID: 3947995
- [24] J. MILLER I. J. Peripheral interactions among single papilla inputs to gustatory nerve fibers. In: *Journal of General Physiology*, 57 (1971), Nr. 1, S. 1–25. PMID: 5539336
- [25] L. H. CHENG und P. P. ROBINSON. The distribution of fungiform papillae and taste buds on the human tongue. In: *Archives of Oral Biology*, 36 (1991), Nr. 8, S. 583–589. PMID: 1781747
- [26] C. M. MISTRETTA, K. A. GOOSENS, I. FARINAS und L. F. REICHARDT. Alterations in size, number, and morphology of gustatory papillae and taste buds in BDNF null mutant mice demonstrate neural dependence of developing taste organs. In: *Journal of Comparative Neurology*, 409 (1999), Nr. 1, S. 13–24. PMID: 10363708
- [27] M. A. HOON, E. ADLER, J. LINDEMEIER, J. F. BATTEY, N. J. RYBA und C. S. ZUKER. Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. In: *Cell*, 96 (1999), Nr. 4, S. 541–551. PMID: 10052456
- [28] B. WHITESIDE. Nerve overlap in the gustatory apparatus of the rat. In: *Journal of Comparative Neurology*, 44 (1927), Nr. 2, S. 363–377. DOI: 10.1002/cne.900440204
- [29] M. E. FRANK. Taste-responsive neurons of the glossopharyngeal nerve of the rat. In: *Journal of Neurophysiology*, 65 (1991), Nr. 6, S. 1452–1463. PMID: 1875254
- [30] T. E. FINGER, B. BOTTGER, A. HANSEN, K. T. ANDERSON, H. ALIMOHAMMADI und W. L. SILVER. Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (2003), Nr. 15, S. 8981–8986. PMID: 12857948
- [31] W. LIN, T. OGURA, R. F. MARGOLSKEE, T. E. FINGER und D. RESTREPO. TRPM5-expressing solitary chemosensory cells respond to odorous irritants. In: *Journal of Neurophysiology*, 99 (2008), Nr. 3, S. 1451–1460. PMID: 18160424

- [32] E. ADLER, M. A. HOON, K. L. MUELLER, J. CHANDRASHEKAR, N. J. RYBA und C. S. ZUKER. A novel family of mammalian taste receptors. In: *Cell*, 100 (2000), Nr. 6, S. 693–702. PMID: 10761934
- [33] H. MATSUNAMI, J. P. MONTMAYEUR und L. B. BUCK. A family of candidate taste receptors in human and mouse. In: *Nature*, 404 (2000), Nr. 6778, S. 601–604. PMID: 10766242
- [34] G. NELSON, M. A. HOON, J. CHANDRASHEKAR, Y. ZHANG, N. J. RYBA und C. S. ZUKER. Mammalian sweet taste receptors. In: *Cell*, 106 (2001), Nr. 3, S. 381–390. PMID: 11509186
- [35] D. DONG, G. JONES und S. ZHANG. Dynamic evolution of bitter taste receptor genes in vertebrates. In: *BMC Evolutionary Biology*, 9 (2009), S. 12. PMID: 19144204
- [36] M. BEHRENS und W. MEYERHOF. Mammalian bitter taste perception. In: *Results and Problems in Cell Differentiation*, 47 (2009), S. 203–220. PMID: 19145413
- [37] C. KUHN, B. BUFE, C. BATRAM und W. MEYERHOF. Oligomerization of TAS2R bitter taste receptors. In: *Chemical Senses*, 35 (2010), Nr. 5, S. 395–406. PMID: 20212011
- [38] J. CHANDRASHEKAR, C. KUHN, Y. OKA, D. A. YARMOLINSKY, E. HUMMLER, N. J. P. RYBA und C. S. ZUKER. The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. In: *Nature*, 464 (2010), Nr. 7286, S. 297–301. PMID: 20107438
- [39] D. V. SMITH und C. A. OSSEBAARD. Amiloride suppression of the taste intensity of sodium chloride: evidence from direct magnitude scaling. In: *Physiology & Behavior*, 57 (1995), Nr. 4, S. 773–777. PMID: 7777616
- [40] B. P. HALPERN. Amiloride and vertebrate gustatory responses to NaCl. In: *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 23 (1998), Nr. 1, S. 5–47. PMID: 9861611
- [41] A. L. HUANG, X. CHEN, M. A. HOON, J. CHANDRASHEKAR, W. GUO, D. TRANKNER, N. J. RYBA und C. S. ZUKER. The cells and logic for mammalian sour taste detection. In: *Nature*, 442 (2006), Nr. 7105, S. 934–938. PMID: 16929298
- [42] N. HORIO, R. YOSHIDA, K. YASUMATSU, Y. YANAGAWA, Y. ISHIMARU, H. MATSUNAMI und Y. NINOMIYA. Sour taste responses in mice lacking PKD channels. In: *PLoS One*, 6 (2011), Nr. 5, e20007. PMID: 21625513
- [43] J. CHANDRASHEKAR, M. A. HOON, N. J. RYBA und C. S. ZUKER. The receptors and cells for mammalian taste. In: *Nature*, 444 (2006), Nr. 7117, S. 288–294. PMID: 17108952
- [44] C. M. MISTRETTA. Aging effects on anatomy and neurophysiology of taste and smell. In: *Gerodontology*, 3 (1984), Nr. 2, S. 131–136. PMID: 6595203
- [45] T. YAMAMOTO und Y. KAWAMURA. Dual innervation of the foliate papillae of the rat: an electrophysiological study. In: *Chemical Senses*, 1 (1975), Nr. 3, S. 241–244. DOI: 10.1093/chemse/1.3.241
- [46] K. YAMAMOTO, Y. ISHIMARU, M. OHMOTO, I. MATSUMOTO, T. ASAKURA und K. ABE. Genetic tracing of the gustatory neural pathway originating from Pkd113-expressing type III taste cells in circumvallate and foliate papillae. In: *Journal of Neurochemistry*, 119 (2011), Nr. 3, S. 497–506. PMID: 21883212
- [47] S. J. HENDRICKS, S. I. SOLLARS und D. L. HILL. Injury-induced functional plasticity in the peripheral gustatory system. In: *Journal of Neuroscience*, 22 (2002), Nr. 19, S. 8607–8613. PMID: 12351734
- [48] E. R. LALONDE und J. A. EGLITIS. Number and distribution of taste buds on the epiglottis, pharynx, larynx, soft palate and uvula in a human newborn. In: *Anatomical Record*, 140 (1961), S. 91–95. PMID: 13928206
- [49] R. B. HAMILTON und R. NORGREN. Central projections of gustatory nerves in the rat. In: *Journal of Comparative Neurology*, 222 (1984), Nr. 4, S. 560–577. PMID: 6199385

- [50] R. J. CONTRERAS, R. M. BECKSTEAD und R. NORNGREN. The central projections of the trigeminal, facial, glossopharyngeal and vagus nerves: an autoradiographic study in the rat. In: *Journal of the Autonomic Nervous System*, 6 (1982), Nr. 3, S. 303–322. PMID: 7169500
- [51] T. HANAMORI und D. V. SMITH. Gustatory innervation in the rabbit: central distribution of sensory and motor components of the chorda tympani, glossopharyngeal, and superior laryngeal nerves. In: *Journal of Comparative Neurology*, 282 (1989), Nr. 1, S. 1–14. PMID: 2708588
- [52] M. MCPHEETERS, T. P. HETTINGER, S. C. NUDING, L. D. SAVOY, M. C. WHITEHEAD und M. E. FRANK. Taste-responsive neurons and their locations in the solitary nucleus of the hamster. In: *Neuroscience*, 34 (1990), Nr. 3, S. 745–758. PMID: 2352650
- [53] H. YOSHIMURA, T. SUGAI, N. SEGAMI und N. ONODA. Chemotopic arrangement for taste quality discrimination in the cortical taste area. In: *Chemical Senses*, 30 Suppl 1 (2005), S. i164–165. PMID: 15738093
- [54] R. M. BRADLEY, D. L. HILL, M. KIM, M. S. KING, C. H. LEMON, O. L. MAY und D. V. SMITH. *The Role of the Nucleus of the Solitary Tract in Gustatory Processing*. Frontiers in Neuroscience. Boca Raton (FL), 2007. ISBN: 978-0-8493-4200-4
- [55] T. V. SEWARDS und M. A. SEWARDS. Cortical association areas in the gustatory system. In: *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25 (2001), Nr. 5, S. 395–407. PMID: 11566478
- [56] D. M. SMALL und T. R. SCOTT. Symposium overview: What Happens to the pontine processing? Repercussions of interspecies differences in pontine taste representation for tasting and feeding. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1170 (2009), S. 343–346. PMID: 19686158
- [57] S. P. TRAVERS. Quinine and citric acid elicit distinctive Fos-like immunoreactivity in the rat nucleus of the solitary tract. In: *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 282 (2002), Nr. 6, R1798–1810. PMID: 12010763
- [58] M. TREPEL. *Neuroanatomie. Struktur und Funktion*. 3. Aufl. München: Elsevier, 2006. ISBN: 978-3-437-41297-4
- [59] H. OGAWA, T. IMOTO und T. HAYAMA. Responsiveness of solitario-parabrachial relay neurons to taste and mechanical stimulation applied to the oral cavity in rats. In: *Experimental Brain Research*, 54 (1984), Nr. 2, S. 349–358. PMID: 6723854
- [60] H. OGAWA, T. HAYAMA und Y. YAMASHITA. Thermal sensitivity of neurons in a rostral part of the rat solitary tract nucleus. In: *Brain Research*, 454 (1988), Nr. 1-2, S. 321–331. PMID: 3409015
- [61] S. P. TRAVERS und R. NORNGREN. Organization of orosensory responses in the nucleus of the solitary tract of rat. In: *Journal of Neurophysiology*, 73 (1995), Nr. 6, S. 2144–2162. PMID: 7666129
- [62] A. T. ROUSSIN, A. E. D'AGOSTINO, A. M. FOODEN, J. D. VICTOR und P. M. DI LORENZO. Taste coding in the nucleus of the solitary tract of the awake, freely licking rat. In: *Journal of Neuroscience*, 32 (2012), Nr. 31, S. 10494–10506. PMID: 22855799
- [63] M. S. KING und R. M. BRADLEY. Relationship between structure and function of neurons in the rat rostral nucleus tractus solitarii. In: *Journal of Comparative Neurology*, 344 (1994), Nr. 1, S. 50–64. PMID: 8063955
- [64] F. N. ZAIDI, K. TODD, L. ENQUIST und M. C. WHITEHEAD. Types of taste circuits synaptically linked to a few geniculate ganglion neurons. In: *Journal of Comparative Neurology*, 511 (2008), Nr. 6, S. 753–772. PMID: 18925565
- [65] S. P. TRAVERS und L. C. GERAN. Bitter-responsive brainstem neurons: characteristics and functions. In: *Physiology & Behavior*, 97 (2009), Nr. 5, S. 592–603. PMID: 19303890
- [66] M. WANG und R. M. BRADLEY. Synaptic characteristics of rostral nucleus of the solitary tract neurons with input from the chorda tympani and glossopharyngeal nerves. In: *Brain Research*, 1328 (2010), S. 71–78. PMID: 20214892

- [67] C. B. HALSELL, S. P. TRAVERS und J. B. TRAVERS. Ascending and descending projections from the rostral nucleus of the solitary tract originate from separate neuronal populations. In: *Neuroscience*, 72 (1996), Nr. 1, S. 185–197. PMID: 8730716
- [68] S. P. TRAVERS und H. HU. Extranuclear projections of rNST neurons expressing gustatory-elicited Fos. In: *Journal of Comparative Neurology*, 427 (2000), Nr. 1, S. 124–138. PMID: 11042595
- [69] P. S. LASITER und D. L. KACHELE. Organization of GABA and GABA-transaminase containing neurons in the gustatory zone of the nucleus of the solitary tract. In: *Brain Research Bulletin*, 21 (1988), Nr. 4, S. 623–636. PMID: 3208150
- [70] B. J. DAVIS und T. JANG. The gustatory zone of the nucleus of the solitary tract in the hamster: light microscopic morphometric studies. In: *Chemical Senses*, 11 (1986), Nr. 2, S. 213–228. DOI: 10.1093/chemse/11.2.213
- [71] T. SUWABE und R. M. BRADLEY. Characteristics of rostral solitary tract nucleus neurons with identified afferent connections that project to the parabrachial nucleus in rats. In: *Journal of Neurophysiology*, 102 (2009), Nr. 1, S. 546–555. PMID: 19439671
- [72] Y. ZOTTERMAN. Action potentials in the glossopharyngeal nerve and in the chorda tympani. In: *Skandinavisches Archiv Für Physiologie*, 72 (1935), Nr. 2, S. 73–77. DOI: 10.1111/j.1748-1716.1935.tb00412.x
- [73] C. PFAFFMANN. Gustatory afferent impulses. In: *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 17 (1941), Nr. 2, S. 243–258. DOI: 10.1002/jcp.1030170209
- [74] R. P. ERICKSON. The evolution of neural coding ideas in the chemical senses. In: *Physiology & Behavior*, 69 (2000), Nr. 1–2, S. 3–13. PMID: 10854913
- [75] L. C. GERAN und S. P. TRAVERS. Bitter-responsive gustatory neurons in the rat parabrachial nucleus. In: *Journal of Neurophysiology*, 101 (2009), Nr. 3, S. 1598–1612. PMID: 19129294
- [76] S. M. TOMCHIK, S. BERG, J. W. KIM, N. CHAUDHARI und S. D. ROPER. Breadth of tuning and taste coding in mammalian taste buds. In: *Journal of Neuroscience*, 27 (2007), Nr. 40, S. 10840–10848. PMID: 17913917
- [77] M. E. FRANK, R. J. CONTRERAS und T. P. HETTINGER. Nerve fibers sensitive to ionic taste stimuli in chorda tympani of the rat. In: *Journal of Neurophysiology*, 50 (1983), Nr. 4, S. 941–960. PMID: 6631471
- [78] H. OGAWA und T. HAYAMA. Receptive fields of solitario-parabrachial relay neurons responsive to natural stimulation of the oral cavity in rats. In: *Experimental Brain Research*, 54 (1984), Nr. 2, S. 359–366. PMID: 6723855
- [79] S. HERNESS. Coding in taste receptor cells. The early years of intracellular recordings. In: *Physiology & Behavior*, 69 (2000), Nr. 1–2, S. 17–27. PMID: 10854914
- [80] M. E. FRANK, R. F. LUNDY Jr. und R. J. CONTRERAS. Cracking taste codes by tapping into sensory neuron impulse traffic. In: *Progress in Neurobiology*, 86 (2008), Nr. 3, S. 245–263. PMID: 18824076
- [81] P. M. DI LORENZO, R. M. HALLOCK und D. P. KENNEDY. Temporal coding of sensation: mimicking taste quality with electrical stimulation of the brain. In: *Behavioral Neuroscience*, 117 (2003), Nr. 6, S. 1423–1433. PMID: 14674860
- [82] V. LAWHERN, A. A. NIKONOV, W. WU und R. J. CONTRERAS. Spike rate and spike timing contributions to coding taste quality information in rat periphery. In: *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 5 (2011), S. 18. PMID: 21617730
- [83] P. M. DI LORENZO und J. D. VICTOR. Taste response variability and temporal coding in the nucleus of the solitary tract of the rat. In: *Journal of Neurophysiology*, 90 (2003), Nr. 3, S. 1418–1431. PMID: 12966173

- [84] L. C. GERAN und S. P. TRAVERS. Single neurons in the nucleus of the solitary tract respond selectively to bitter taste stimuli. In: *Journal of Neurophysiology*, 96 (2006), Nr. 5, S. 2513–2527. PMID: 16899635
- [85] K. NAKAMURA und R. NORGREN. Gustatory responses of neurons in the nucleus of the solitary tract of behaving rats. In: *Journal of Neurophysiology*, 66 (1991), Nr. 4, S. 1232–1248. PMID: 1761982
- [86] K. NAKAMURA und R. NORGREN. Taste responses of neurons in the nucleus of the solitary tract of awake rats: an extended stimulus array. In: *Journal of Neurophysiology*, 70 (1993), Nr. 3, S. 879–891. PMID: 8229176
- [87] M. I. HARRER und S. P. TRAVERS. Topographic organization of Fos-like immunoreactivity in the rostral nucleus of the solitary tract evoked by gustatory stimulation with sucrose and quinine. In: *Brain Research*, 711 (1996), Nr. 1-2, S. 125–137. PMID: 8680855
- [88] S. P. TRAVERS und J. B. TRAVERS. Taste-evoked Fos expression in nitroergic neurons in the nucleus of the solitary tract and reticular formation of the rat. In: *Journal of Comparative Neurology*, 500 (2007), Nr. 4, S. 746–760. PMID: 17154256
- [89] J. B. TRAVERS, K. HERMAN, J. YOO und S. P. TRAVERS. Taste reactivity and Fos expression in GAD1-EGFP transgenic mice. In: *Chemical Senses*, 32 (2007), Nr. 2, S. 129–137. PMID: 17082515
- [90] M. G. TORDOFF, L. K. ALARCON und M. P. LAWLER. Preferences of 14 rat strains for 17 taste compounds. In: *Physiology & Behavior*, 95 (2008), Nr. 3, S. 308–332. PMID: 18639567
- [91] J. I. GLENDINNING. Preference and aversion for deterrent chemicals in two species of *Peromyscus* mouse. In: *Physiology & Behavior*, 54 (1993), Nr. 1, S. 141–150. PMID: 8327593
- [92] K. MAEHASHI, M. MATANO, H. WANG, L. A. VO, Y. YAMAMOTO und L. HUANG. Bitter peptides activate hTAS2Rs, the human bitter receptors. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 365 (2008), Nr. 4, S. 851–855. PMID: 18037373
- [93] J. UPADHYAYA, S. P. PYDI, N. SINGH, R. E. ALUKO und P. CHELIKANI. Bitter taste receptor T2R1 is activated by dipeptides and tripeptides. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398 (2010), Nr. 2, S. 331–335. PMID: 20599705
- [94] W. MEYERHOF, C. BATRAM, C. KUHN, A. BROCKHOFF, E. CHUDOBA, B. BUFE, G. APPENDINO und M. BEHRENS. The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. In: *Chemical Senses*, 35 (2010), Nr. 2, S. 157–170. PMID: 20022913
- [95] S. K. VITAZKOVA, E. LONG, A. PAUL und J. I. GLENDINNING. Mice suppress malaria infection by sampling a ‘bitter’ chemotherapy agent. In: *Animal Behaviour*, 61 (2001), Nr. 5, S. 887–894. DOI: 10.1006/anbe.2000.1677
- [96] M. A. HUFFMAN. Animal self-medication and ethno-medicine: exploration and exploitation of the medicinal properties of plants. In: *Proceedings of the Nutrition Society*, 62 (2003), Nr. 2, S. 371–381. PMID: 14506884
- [97] D. M. WILSON, J. BOUGHTER J. D. und C. H. LEMON. Bitter taste stimuli induce differential neural codes in mouse brain. In: *PLoS One*, 7 (2012), Nr. 7, e41597. PMID: 22844505
- [98] J. I. GLENDINNING, A. DAVIS und S. RAMASWAMY. Contribution of different taste cells and signaling pathways to the discrimination of “bitter” taste stimuli by an insect. In: *Journal of Neuroscience*, 22 (2002), Nr. 16, S. 7281–7287. PMID: 12177223
- [99] T. R. SCOTT und G. P. MARK. The taste system encodes stimulus toxicity. In: *Brain Research*, 414 (1987), Nr. 1, S. 197–203. PMID: 3620922
- [100] J. I. GLENDINNING. Is the bitter rejection response always adaptive?. In: *Physiology & Behavior*, 56 (1994), Nr. 6, S. 1217–1227. PMID: 7878094

- [101] J. I. GLENDINNING, A. DAVIS und M. RAI. Temporal coding mediates discrimination of "bit-tertaste stimuli by an insect. In: *Journal of Neuroscience*, 26 (2006), Nr. 35, S. 8900–8908. PMID: 16943545
- [102] A. CAICEDO und S. D. ROPER. Taste receptor cells that discriminate between bitter stimuli. In: *Science*, 291 (2001), Nr. 5508, S. 1557–1560. PMID: 11222863
- [103] M. DAHL, R. P. ERICKSON und S. A. SIMON. Neural responses to bitter compounds in rats. In: *Brain Research*, 756 (1997), Nr. 1-2, S. 22–34. PMID: 9187310
- [104] V. DANILOVA und G. HELLEKANT. Comparison of the responses of the chorda tympani and glossopharyngeal nerves to taste stimuli in C57BL/6J mice. In: *BMC Neuroscience*, 4 (2003), S. 5. PMID: 12617752
- [105] T. P. HETTINGER, B. K. FORMAKER und M. E. FRANK. Cycloheximide: no ordinary bitter stimulus. In: *Behavioural Brain Research*, 180 (2007), Nr. 1, S. 4–17. PMID: 17400304
- [106] C. Y. CHAN, J. E. YOO und S. P. TRAVERS. Diverse bitter stimuli elicit highly similar patterns of Fos-like immunoreactivity in the nucleus of the solitary tract. In: *Chemical Senses*, 29 (2004), Nr. 7, S. 573–581. PMID: 15337683
- [107] X. CHEN, M. GABITTO, Y. PENG, N. J. RYBA und C. S. ZUKER. A gustotopic map of taste qualities in the mammalian brain. In: *Science*, 333 (2011), Nr. 6047, S. 1262–1266. PMID: 21885776
- [108] M. E. FRANK, B. P. BOUVERAT, B. I. MACKINNON und T. P. HETTINGER. The distinctiveness of ionic and nonionic bitter stimuli. In: *Physiology & Behavior*, 80 (2004), Nr. 4, S. 421–431. PMID: 14741226
- [109] A. C. SPECTOR und S. L. KOPKA. Rats fail to discriminate quinine from denatonium: implications for the neural coding of bitter-tasting compounds. In: *Journal of Neuroscience*, 22 (2002), Nr. 5, S. 1937–1941. PMID: 11880524
- [110] B. LINDEMANN. Receptors and transduction in taste. In: *Nature*, 413 (2001), Nr. 6852, S. 219–225. PMID: 11557991
- [111] M. SHENG und M. E. GREENBERG. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. In: *Neuron*, 4 (1990), Nr. 4, S. 477–485. PMID: 1969743
- [112] T. FOWLER, R. SEN und A. L. ROY. Regulation of primary response genes. In: *Molecular Cell*, 44 (2011), Nr. 3, S. 348–360. PMID: 22055182
- [113] B. PEREZ-CADAHIA, B. DROBIC und J. R. DAVIE. Activation and function of immediate-early genes in the nervous system. In: *Biochemistry and Cell Biology*, 89 (2011), Nr. 1, S. 61–73. PMID: 21326363
- [114] J. F. GUZOWSKI. Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. In: *Hippocampus*, 12 (2002), Nr. 1, S. 86–104. PMID: 11918292
- [115] A. M. BECKMANN und P. A. WILCE. Egr transcription factors in the nervous system. In: *Neurochemistry International*, 31 (1997), Nr. 4, S. 477–510, 477–510. PMID: 9307998
- [116] E. NEDIVI, D. HEVRONI, D. NAOT, D. ISRAELI und Y. CITRI. Numerous candidate plasticity-related genes revealed by differential cDNA cloning. In: *Nature*, 363 (1993), Nr. 6431, S. 718–722. PMID: 8515813
- [117] S. P. HUNT, A. PINI und G. EVAN. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. In: *Nature*, 328 (1987), Nr. 6131, S. 632–634. PMID: 3112583
- [118] J. F. GUZOWSKI, J. A. TIMLIN, B. ROYSAM, B. L. MCNAUGHTON, P. F. WORLEY und C. A. BARNES. Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression. In: *Current Opinion in Neurobiology*, 15 (2005), Nr. 5, S. 599–606. PMID: 16150584

- [119] K. J. KOVACS. Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. In: *Journal of Neuroendocrinology*, 20 (2008), Nr. 6, S. 665–672. PMID: 18601687
- [120] J. D. SHEPHERD und M. F. BEAR. New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. In: *Nature Neuroscience*, 14 (2011), Nr. 3, S. 279–284. PMID: 21278731
- [121] G. L. LYFORD, K. YAMAGATA, W. E. KAUFMANN, C. A. BARNES, L. K. SANDERS, N. G. COPELAND, D. J. GILBERT, N. A. JENKINS, A. A. LANAHAN und P. F. WORLEY. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. In: *Neuron*, 14 (1995), Nr. 2, S. 433–445. PMID: 7857651
- [122] W. LINK, U. KONIETZKO, G. KAUSELMANN, M. KRUG, B. SCHWANKE, U. FREY und D. KUHL. Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (1995), Nr. 12, S. 5734–5738. PMID: 7777577
- [123] D. LIU, D. BEI, H. PARMAR und A. MATUS. Activity-regulated, cytoskeleton-associated protein (Arc) is essential for visceral endoderm organization during early embryogenesis. In: *Mechanisms of Development*, 92 (2000), Nr. 2, S. 207–215. PMID: 10727859
- [124] J. F. GUZOWSKI, B. L. MCNAUGHTON, C. A. BARNES und P. F. WORLEY. Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. In: *Nature Neuroscience*, 2 (1999), Nr. 12, S. 1120–1124. PMID: 10570490
- [125] O. STEWARD, C. S. WALLACE, G. L. LYFORD und P. F. WORLEY. Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. In: *Neuron*, 21 (1998), Nr. 4, S. 741–751. PMID: 9808461
- [126] D. E. MOGA, M. E. CALHOUN, A. CHOWDHURY, P. WORLEY, J. H. MORRISON und M. L. SHAPIRO. Activity-regulated cytoskeletal-associated protein is localized to recently activated excitatory synapses. In: *Neuroscience*, 125 (2004), Nr. 1, S. 7–11. PMID: 15051140
- [127] C. SMITH-HICKS, B. XIAO, R. DENG, Y. JI, X. ZHAO, J. D. SHEPHERD, G. POSERN, D. KUHL, R. L. HUGANIR, D. D. GINTY, P. F. WORLEY und D. J. LINDEN. SRF binding to SRE 6.9 in the Arc promoter is essential for LTD in cultured Purkinje cells. In: *Nature Neuroscience*, 13 (2010), Nr. 9, S. 1082–1089. PMID: 20694003
- [128] M. MONTAG-SALLAZ und N. BUONVISO. Altered odor-induced expression of c-fos and arg 3.1 immediate early genes in the olfactory system after familiarization with an odor. In: *Journal of Neurobiology*, 52 (2002), Nr. 1, S. 61–72. PMID: 12115894
- [129] M. MONTAG-SALLAZ und D. MONTAG. Learning-induced arg 3.1/arc mRNA expression in the mouse brain. In: *Learning and Memory*, 10 (2003), Nr. 2, S. 99–107. PMID: 12663748
- [130] M. P. SADDORIS, P. C. HOLLAND und M. GALLAGHER. Associatively learned representations of taste outcomes activate taste-encoding neural ensembles in gustatory cortex. In: *Journal of Neuroscience*, 29 (2009), Nr. 49, S. 15386–15396. PMID: 20007463
- [131] C. L. MCCURRY, J. D. SHEPHERD, D. TROPEA, K. H. WANG, M. F. BEAR und M. SUR. Loss of Arc renders the visual cortex impervious to the effects of sensory experience or deprivation. In: *Nature Neuroscience*, 13 (2010), Nr. 4, S. 450–457. PMID: 20228806
- [132] E. P. CARPENTER-HYLAND, T. K. PLUMMER, A. VAZDARJANOVA und D. T. BLAKE. Arc expression and neuroplasticity in primary auditory cortex during initial learning are inversely related to neural activity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (2010), Nr. 33, S. 14828–14832. PMID: 20675582
- [133] A. VAZDARJANOVA und J. F. GUZOWSKI. Differences in hippocampal neuronal population responses to modifications of an environmental context: evidence for distinct, yet complementary,

- functions of CA3 and CA1 ensembles. In: *Journal of Neuroscience*, 24 (2004), Nr. 29, S. 6489–6496. PMID: 15269259
- [134] S. K. BAROT, Y. KYONO, E. W. CLARK und I. L. BERNSTEIN. Visualizing stimulus convergence in amygdala neurons during associative learning. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (2008), Nr. 52, S. 20959–20963. PMID: 19091953
- [135] B. DESGRANGES, V. RAMIREZ-AMAYA, I. RICANO-CORNEJO, F. LEVY und G. FERREIRA. Flavor preference learning increases olfactory and gustatory convergence onto single neurons in the basolateral amygdala but not in the insular cortex in rats. In: *PLoS One*, 5 (2010), Nr. 4, e10097. PMID: 20404918
- [136] A. VAZDARJANOVA, B. L. MCNAUGHTON, C. A. BARNES, P. F. WORLEY und J. F. GUZOWSKI. Experience-dependent coincident expression of the effector immediate-early genes arc and Homer 1a in hippocampal and neocortical neuronal networks. In: *Journal of Neuroscience*, 22 (2002), Nr. 23, S. 10067–10071. PMID: 12451105
- [137] D. LIN, M. P. BOYLE, P. DOLLAR, H. LEE, E. S. LEIN, P. PERONA und D. J. ANDERSON. Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. In: *Nature*, 470 (2011), Nr. 7333, S. 221–226. PMID: 21307935
- [138] A. CHAUDHURI, J. NISSANOV, S. LAROCQUE und L. RIOUX. Dual activity maps in primate visual cortex produced by different temporal patterns of zif268 mRNA and protein expression. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (1997), Nr. 6, S. 2671–2675. PMID: 9122254
- [139] I. E. DE ARAUJO, M. L. KRINGELBACH, E. T. ROLLS und F. MCGLONE. Human cortical responses to water in the mouth, and the effects of thirst. In: *Journal of Neurophysiology*, 90 (2003), Nr. 3, S. 1865–1876. PMID: 12773496
- [140] G. Q. ZHAO, Y. ZHANG, M. A. HOON, J. CHANDRASHEKAR, I. ERLÉN BACH, N. J. RYBA und C. S. ZUKER. The receptors for mammalian sweet and umami taste. In: *Cell*, 115 (2003), Nr. 3, S. 255–266. PMID: 14636554
- [141] Y. OKA, M. BUTNARU, L. VON BUCHHOLTZ, N. J. RYBA und C. S. ZUKER. High salt recruits aversive taste pathways. In: *Nature*, 494 (2013), Nr. 7438, S. 472–475. PMID: 23407495
- [142] C. B. HALSELL, J. B. TRAVERS und S. P. TRAVERS. Gustatory and tactile stimulation of the posterior tongue activate overlapping but distinctive regions within the nucleus of the solitary tract. In: *Brain Research*, 632 (1993), Nr. 1-2, S. 161–173. PMID: 8149226
- [143] P. CHOMCZYNSKI und N. SACCHI. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Analytical Biochemistry*, 162 (1987), Nr. 1, S. 156–159. PMID: 2440339
- [144] W. W. WILFINGER, K. MACKEY und P. CHOMCZYNSKI. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. In: *BioTechniques*, 22 (1997), Nr. 3, S. 474–476. PMID: 9067025
- [145] K. B. J. FRANKLIN und G. PAXINOS. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 3. Aufl. Amsterdam: Elsevier, 2007. ISBN: 978-0-12-369460-7
- [146] U. HERZIG, C. CADENAS, F. SIECKMANN, W. SIERRALTA, C. THALLER, A. VISEL und G. EICHELE. Development of high-throughput tools to unravel the complexity of gene expression patterns in the mammalian brain. In: *Novartis Foundation Symposium*, 239 (2001), S. 129–146. PMID: 11529308
- [147] M. N. BOBROW, T. D. HARRIS, K. J. SHAUGHNESSY und G. J. LITT. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. In: *Journal of Immunological Methods*, 125 (1989), Nr. 1-2, S. 279–285. PMID: 2558138

- [148] S. YAMAGUCHI und K. NINOMIYA. Umami and food palatability. In: *Journal of Nutrition*, 130 (2000), Nr. 4S Suppl, 921S–926S. PMID: 10736353
- [149] R. L. METCALF, R. A. METCALF und A. M. RHODES. Cucurbitacins as kairomones for diabroticite beetles. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77 (1980), Nr. 7, S. 3769–3772. PMID: 16592849
- [150] M. E. FRANK und D. A. BLIZARD. Chorda tympani responses in two inbred strains of mice with different taste preferences. In: *Physiology & Behavior*, 67 (1999), Nr. 2, S. 287–297. PMID: 10477061
- [151] J. M. STRATFORD und T. E. FINGER. Central representation of postingestive chemosensory cues in mice that lack the ability to taste. In: *Journal of Neuroscience*, 31 (2011), Nr. 25, S. 9101–9110. PMID: 21697361
- [152] H. J. GRILL und R. NORNGREN. The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. In: *Brain Research*, 143 (1978), Nr. 2, S. 263–279. PMID: 630409
- [153] C. PFAFFMANN. The afferent code for sensory quality. In: *American Psychologist*, 14 (1959), Nr. 5, S. 226–232. DOI: 10.1037/h0049324
- [154] M. E. FRANK, S. L. BIEBER und D. V. SMITH. The organization of taste sensibilities in hamster chorda tympani nerve fibers. In: *Journal of General Physiology*, 91 (1988), Nr. 6, S. 861–896. PMID: 3047313
- [155] R. NORNGREN, H. NISHIJO und S. P. TRAVERS. Taste responses from the entire gustatory apparatus. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, 575 (1989), S. 246–263, 246–263. PMID: 2699190
- [156] V. DANILOVA, T. ROBERTS und G. HELLEKANT. Responses of single taste fibers and whole chorda tympani and glossopharyngeal nerve in the domestic pig, *Sus scrofa*. In: *Chemical Senses*, 24 (1999), Nr. 3, S. 301–316. PMID: 10400449
- [157] Y. KWAK, M. R. RHYU, S. J. BAI, Y. H. SA, M. J. KWON und B. H. LEE. c-Fos Expression in the Nucleus of the Solitary Tract in Response to Salt Stimulation in Rats. In: *Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 15 (2011), Nr. 6, S. 437–443. PMID: 22359483
- [158] M. I. PHILLIPS und R. E. NORNGREN. A rapid method for permanent implantation of an intraoral fistula in rats. In: *Behavior Research Methods & Instrumentation*, 2 (1970), Nr. 3, S. 124–124. DOI: 10.3758/BF03211020
- [159] M. C. ANDRESEN und D. L. KUNZE. Nucleus tractus solitarius–gateway to neural circulatory control. In: *Annual Review of Physiology*, 56 (1994), S. 93–116. PMID: 7912060
- [160] M. C. WHITEHEAD. Neuronal architecture of the nucleus of the solitary tract in the hamster. In: *Journal of Comparative Neurology*, 276 (1988), Nr. 4, S. 547–572. PMID: 2461969
- [161] C. T. KING, S. P. TRAVERS, N. E. ROWLAND, M. GARCEA und A. C. SPECTOR. Glossopharyngeal nerve transection eliminates quinine-stimulated fos-like immunoreactivity in the nucleus of the solitary tract: implications for a functional topography of gustatory nerve input in rats. In: *Journal of Neuroscience*, 19 (1999), Nr. 8, S. 3107–3121. PMID: 10191326
- [162] R. D. SWEAZEY und D. V. SMITH. Convergence onto hamster medullary taste neurons. In: *Brain Research*, 408 (1987), Nr. 1-2, S. 173–184. PMID: 3297247
- [163] S. I. SOLLARS und D. L. HILL. In vivo recordings from rat geniculate ganglia: taste response properties of individual greater superficial petrosal and chorda tympani neurones. In: *Journal of Physiology*, 564 (2005), Nr. Pt 3, S. 877–893. PMID: 15746166
- [164] C. T. KING, M. GARCEA und A. C. SPECTOR. Glossopharyngeal nerve regeneration is essential for the complete recovery of quinine-stimulated oromotor rejection behaviors and central patterns of neuronal activity in the nucleus of the solitary tract in the rat. In: *Journal of Neuroscience*, 20 (2000), Nr. 22, S. 8426–8434. PMID: 11069950

- [165] R. NALLOOR, K. M. BUNTING und A. VAZDARJANOVA. Encoding of emotion-paired spatial stimuli in the rodent hippocampus. In: *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6 (2012), S. 27. PMID: 22712009
- [166] M. BEHRENS und W. MEYERHOF. Gustatory and extragustatory functions of mammalian taste receptors. In: *Physiology & Behavior*, 105 (2011), Nr. 1, S. 4–13. PMID: 21324331
- [167] C. DEAN und J. L. SEAGARD. Expression of c-fos protein in the nucleus tractus solitarius in response to physiological activation of carotid baroreceptors. In: *Neuroscience*, 69 (1995), Nr. 1, S. 249–257. PMID: 8637623
- [168] C. D. SHIH, S. H. CHAN und J. Y. CHAN. Participation of Fos protein at the nucleus tractus solitarius in inhibitory modulation of baroreceptor reflex response in the rat. In: *Brain Research*, 738 (1996), Nr. 1, S. 39–47. PMID: 8949925
- [169] J. B. TRAVERS, H. J. GRILL und R. NORNGREN. The effects of glossopharyngeal and chorda tympani nerve cuts on the ingestion and rejection of sapid stimuli: an electromyographic analysis in the rat. In: *Behavioural Brain Research*, 25 (1987), Nr. 3, S. 233–246. PMID: 3689570
- [170] S. P. TRAVERS und J. B. TRAVERS. Reflex topography in the nucleus of the solitary tract. In: *Chemical Senses*, 30 Suppl 1 (2005), S. i180–181. PMID: 15738102
- [171] S. J. ST JOHN und A. C. SPECTOR. Behavioral discrimination between quinine and KCl is dependent on input from the seventh cranial nerve: implications for the functional roles of the gustatory nerves in rats. In: *Journal of Neuroscience*, 18 (1998), Nr. 11, S. 4353–4362. PMID: 9592112
- [172] A. VOIGT, S. HÜBNER, K. LOSSOW, I. HERMANS-BORGMEYER, U. BOEHM und W. MEYERHOF. Genetic Labeling of Tas1r1 and Tas2r131 Taste Receptor Cells in Mice. In: *Chemical Senses*, 37 (2012), Nr. 9, S. 897–911. PMID: 23010799
- [173] F. N. ZAIDI und M. C. WHITEHEAD. Discrete innervation of murine taste buds by peripheral taste neurons. In: *Journal of Neuroscience*, 26 (2006), Nr. 32, S. 8243–8253. PMID: 16899719
- [174] G. S. DOETSCH und R. P. ERICKSON. Synaptic processing of taste-quality information in the nucleus tractus solitarius of the rat. In: *Journal of Neurophysiology*, 33 (1970), Nr. 4, S. 490–507. PMID: 4317290
- [175] J. R. GANCHROW und R. P. ERICKSON. Neural correlates of gustatory intensity and quality. In: *Journal of Neurophysiology*, 33 (1970), Nr. 6, S. 768–783. PMID: 5485403
- [176] M. B. VOGT und C. M. MISTRETTA. Convergence in mammalian nucleus of solitary tract during development and functional differentiation of salt taste circuits. In: *Journal of Neuroscience*, 10 (1990), Nr. 9, S. 3148–3157. PMID: 2398375
- [177] M. C. WHITEHEAD und M. E. FRANK. Anatomy of the gustatory system in the hamster: central projections of the chorda tympani and the lingual nerve. In: *Journal of Comparative Neurology*, 220 (1983), Nr. 4, S. 378–395. PMID: 6643734
- [178] M. C. WHITEHEAD. Anatomy of the gustatory system in the hamster: synaptology of facial afferent terminals in the solitary nucleus. In: *Journal of Comparative Neurology*, 244 (1986), Nr. 1, S. 72–85. PMID: 3950091
- [179] C. B. HALSELL. Organization of parabrachial nucleus efferents to the thalamus and amygdala in the golden hamster. In: *Journal of Comparative Neurology*, 317 (1992), Nr. 1, S. 57–78. PMID: 1374087
- [180] T. YAMAMOTO, R. MATSUO und Y. KAWAMURA. The pontine taste area in the rabbit. In: *Neuroscience Letters*, 16 (1980), Nr. 1, S. 5–9. PMID: 6189001
- [181] R. NORNGREN. Projections from the nucleus of the solitary tract in the rat. In: *Neuroscience*, 3 (1978), Nr. 2, S. 207–218. PMID: 733004

Literatur

- [182] A. CHUNG, S. K. BAROT, J. J. KIM und I. L. BERNSTEIN. Biologically predisposed learning and selective associations in amygdalar neurons. In: *Learning and Memory*, 18 (2011), Nr. 6, S. 371–374. PMID: 21576517
- [183] M. M. GALINDO, N. Y. SCHNEIDER, F. STÄHLER, J. TÖLE und W. MEYERHOF. Taste preferences. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 108 (2012), S. 383–426. PMID: 22656385

A Anhang

A.1 Programm der Fixierung und Acetylierung mittels Färbeautomat

Tabelle A.1: Ablauf der Fixierung und Acetylierung

Reagens	Zeit
4 % PFA in PBS	10 min
0,9 % NaCl	2 min
0,9 % NaCl	2 min
<i>manuelle Acetylierung</i>	
PBS	2 min
0,9 % NaCl	2 min
30 % Ethanol	2 min
50 % Ethanol	2 min
70 % Ethanol	2 min
80 % Ethanol	2 min
95 % Ethanol	2 min
100 % Ethanol	2 min
100 % Ethanol	2 min

Die Zusammensetzung der Lösungen finden sich in Abschnitt 2.8.2 auf Seite 21.

A.2 Anordnung auf der Arbeitsfläche des Pipettierautomaten

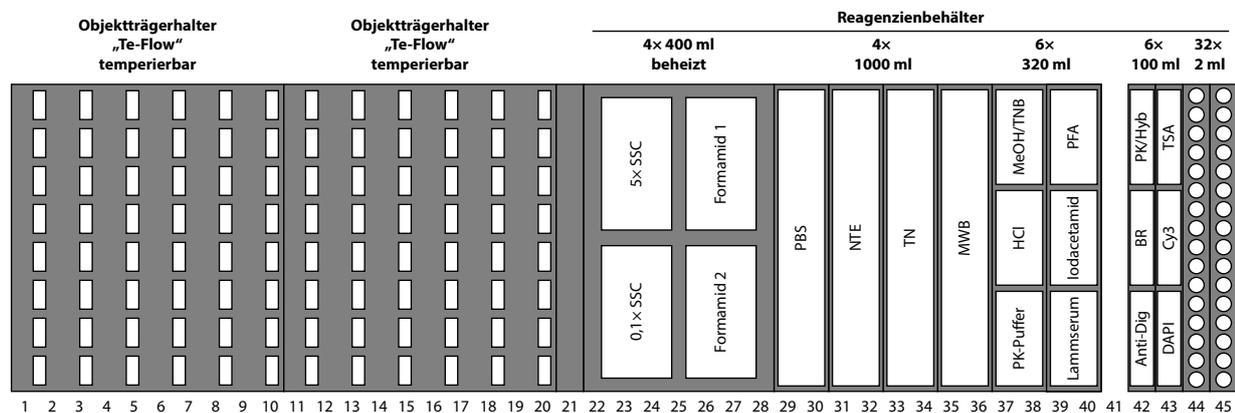


Abbildung A.1: Anordnung auf der Arbeitsfläche des Pipettierautomaten. vgl. Tab. A.2 Formamid 1: 2x SSC, 50 % Formamid; Formamid 2: 1x SSC, 50 % Formamid; BR: Blockierreagens in MWB; MeOH: 0,6 % H₂O₂ in Methanol; Anti-Dig: Anti-Dig-POD in TNB; PK: Proteinase K in PK-Puffer; Hyb: Hybridisierungspuffer; Cy3: Avidin-Cy3 in TN; TSA: Tyramid-Biotin in Amplification Diluent.

A.3 Programm der automatischen *In-situ*-Hybridisierung

Tabelle A.2: Ablauf der *In-situ*-Hybridisierung

Volumen in μl	Reagens	Anzahl Zyklen	Zeit pro Zyklus	Temperatur
300	0,6 % H_2O_2 in Methanol	5	5 min	25 °C
300	PBS	7	5 min	25 °C
300	0,2 M HCl	2	5 min	25 °C
300	PBS	4	5 min	25 °C
400	PK-Puffer	1	5 min	25 °C
300	Proteinase K in PK-Puffer	2	10 min	25 °C
300	PBS	7	5 min	25 °C
300	4 % PFA in PBS	2	5 min	25 °C
300	PBS	7	5 min	25 °C
300	Hybridisierungspuffer	2	15 min	25 °C
	<i>Aufheizen auf 64 °C</i>			
300	RNA-Sonde in Hybridisierungspuffer	2	180 min	64 °C
300	5× SSC	5	5 min	62 °C
350	2× SSC, 50 % Formamid	5	5 min	62 °C
350	1× SSC, 50 % Formamid	5	5 min	62 °C
300	0,1× SSC	4	5 min	62 °C
	<i>Abkühlen auf 24 °C</i>			
300	NTE	4	5 min	24 °C
300	20 mM Iodacetamid in NTE	6	5 min	24 °C
300	NTE	4	5 min	24 °C
300	TN	2	5 min	24 °C
300	4 % Lammserum in TN	6	5 min	24 °C
200	TN	4	5 min	24 °C
300	TNB	2	10 min	24 °C
200	TN	2	5 min	24 °C
300	MWB	2	5 min	24 °C
350	Blockierreagens in MWB	2	10 min	24 °C
300	MWB	2	5 min	24 °C
200	TN	4	5 min	24 °C
300	TNB	4	10 min	24 °C
350	Anti-Dig-POD 1:500 in TNB	2	30 min	24 °C
200	TN	6	5 min	24 °C
250	Tyramid-Biotin in <i>Amplification Diluent</i>	1	30 min	24 °C
200	TN	4	5 min	24 °C
300	Avidin-Cy3 1:1000 in TN	2	30 min	24 °C
200	TN	4	5 min	24 °C
300	0,3 μM DAPI in TN	2	5 min	24 °C
200	TN	4	5 min	24 °C
400	deionisiertes Wasser	3	5 min	24 °C

Die Zusammensetzung der Lösungen finden sich in Abschnitt 2.8.3 auf Seite 21.

A.4 Rohdaten

Tabelle A.3: Rohdaten der einmal stimulierten Tiere

Stimulus	Zeitpunkt	Anzahl Tiere	Schnitte analysiert	Fläche in mm ²	Arc exprimierende Zellen			
					gesamt	N	Z	N+Z
Kontr.	-5 min	3	29	37,6	204	167	32	5
	-30 min	3	30	40,3	232	20	196	16
NH ₄ Cl	-5 min	2	6	9,3	78	66	11	1
	-30 min	2	8	9,1	39	5	33	1
NaGlu	-5 min	2	7	9,5	79	65	14	0
	-30 min	2	7	6,8	22	2	20	0
NaGlu +I +A	-5 min	2	8	10,1	49	49	0	0
	-30 min	2	7	9,1	38	12	26	0
Sacc	-5 min	2	5	7,2	52	41	10	1
	-30 min	2	9	10,2	43	11	31	1
NaCl niedrig	-5 min	2	6	7,1	50	35	11	4
	-30 min	2	9	11,6	39	22	16	1
NaCl hoch	-5 min	3	13	14,0	132	90	36	6
	-30 min	2	9	8,4	85	19	63	3
Citr	-5 min	2	8	11,7	103	84	14	5
	-30 min	2	8	9,9	75	31	43	1
Cyx	-5 min	3	30	39,6	1 063	980	70	13
	-30 min	2	17	21,1	617	39	566	12
Qui	-5 min	2	15	21,5	751	637	90	24
	-30 min	3	32	39,0	1 468	155	1 201	112
Cuc	-5 min	2	25	31,0	719	666	41	12
	-30 min	2	15	17,6	519	28	483	8
Cyx+Qui	-5 min	4	38	46,8	1 549	4 505	40	4
Cyx+Cuc	-5 min	4	44	48,9	1 872	1 777	84	11
Qui+Cuc	-5 min	4	43	46,1	1 539	1 464	72	3
gesamt		61	428	523,3	11 522			

Tabelle A.4: Rohdaten der zweimal stimulierten Tiere

Stimulus	Anzahl Tiere	Schnitte analysiert	Fläche in mm ²	Arc exprimierende Zellen			
				gesamt	N	Z	N+Z
2× Kontr.	6	85	86,6	672	444	159	69
2× 1 M Sacc	2	7	11,1	119	77	29	13
2× 1,5 M Sacc	2	5	9,6	98	65	23	10
2× 0,1 M Citr	2	5	9,4	144	90	43	11
2× Cyx	6	68	83,7	3 924	1 273	1 455	1 196
2× Qui	9	82	106,1	3 995	927	2 164	904
2× Cuc	9	87	118,1	3 926	1 351	1 656	919
Cyx, Qui	4	35	44,5	1 702	555	785	362
Qui, Cyx	5	55	64,3	2 017	1 045	584	388
Cyx, Cuc	4	39	50,1	2 032	645	1 058	329
Cuc, Cyx	4	35	47,3	1 645	761	572	312
Qui, Cuc	4	38	52,3	1 607	781	585	241
Cuc, Qui	5	52	70,2	2 447	784	1 305	358
gesamt	62	568	753,3	24 328			

Danksagung

Für die Betreuung meiner Doktorarbeit möchte mich herzlich bei Prof. Wolfgang Meyerhof bedanken. Er hat mir während dieser Zeit viel Vertrauen entgegengebracht und mir große Freiheiten bei der Durchführung des Projekts gelassen. Gleichzeitig hatte er bei Problemen und Fragen stets ein offenes Ohr und hat durch manchen hilfreichen Impuls diese Arbeit vorangetrieben.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern des Max-Rubner-Labors für die Pflege und Bereitstellung der Versuchstiere. Besonderer Dank gebührt dabei Elke Thom, die den Großteil der Stimulationsversuche durchgeführt hat, und von der ich viel über die Handhabung von Mäusen und die Gehirnpräparation lernen konnte.

Ich möchte mich weiterhin bei Fabian Haake und Svenja Nierwetberg bedanken, die als studentische Hilfskräfte eine große Unterstützung bei der Anfertigung der Gefrierschnitte und Bedienung des Pipetierautomaten waren. Ohne sie wäre die Menge der Analysen in dieser Zeit nicht möglich gewesen.

Frauke Stähler und Katja Riedel möchte ich für ihre Betreuung und Hilfe, insbesondere in der Anfangszeit dieses Projekts, danken. Von ihnen habe ich neben wichtigen Grundfertigkeiten im Labor und vor dem Projektor eine (für Molekularbiologen) gesunde „RNase-Phobie“ mitbekommen. Zudem haben sie es manches Mal geschafft, mich trotz kritischen Dickschädels eines Besseren zu belehren.

Ich danke meinen Kollegen von der der „Maus-AG“, insbesondere Stefanie Demgensky, Sabine Frenzel, Sandra Hübner, Kristina Loßow und Anja Voigt. Sie haben mich freundlich in ihrem Labor aufgenommen und brachten mir Geduld und Toleranz entgegen, auch wenn ich von Zeit zu Zeit meine eigenen Wege hatte. Sie standen nicht nur in wissenschaftlichen Belangen hilfreich zur Seite, sondern haben durch ihre Art innerhalb wie außerhalb des Labors die Doktorandenzeit bereichert.

Mein Dank gilt auch den übrigen Kollegen der Abteilung Molekulare Genetik für die angenehme, hilfsbereite und produktive Arbeitsatmosphäre und die oft erheiternden Runden am Mittagstisch, die auch nach der Arbeit in Berliner und Brandenburger Lokalen ihre Fortsetzung fanden.

Nicht zuletzt gebührt an dieser Stelle ein besonderer Dank meiner Familie und Nadine, deren uneingeschränkte Unterstützung mir gerade in der Schreibphase großen Rückhalt und Freiraum gegeben hat.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Die Arbeit wurde noch an keiner anderen Hochschule zur Begutachtung eingereicht.

Potsdam, den 26. September 2013