

Neurobiologische und behaviorale Merkmale des Alterns im Rattenmodell

Inaugural - Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Daniela Schulz

aus Bielefeld

Düsseldorf

2005

Aus dem Institut für Physiologische Psychologie
der Heinrich-Heine-Universität

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. J.P. Huston

Koreferent: Prof. Dr. H.L. Haas

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2005

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J.P. Huston für die Möglichkeit, an seinem Institut arbeiten zu dürfen, für einen neuen Horizont, der sich aufgrund unserer Zusammenarbeit eröffnet hat, für die Freiheit, neuen und ungewöhnlichen Ideen nachzugehen, für die vielen Interaktionen, die mich beruflich und persönlich bereichert haben und für die hervorragende Betreuung während meiner gesamten Zeit am Institut.

Bei Herrn Prof. Dr. H.L. Haas möchte ich mich für die erfolgreichen Kooperationen bedanken und für die Übernahme des Koreferates.

Bei Herrn Prof. Dr. H.J. Luhmann möchte ich mich ebenfalls für eine erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken.

Allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Physiologische Psychologie möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und viele anregende Diskussionen danken.

Zusammenfassung

Sowohl Rodentien als auch Menschen weisen im Alter interindividuelle Differenzen auf, die im Vergleich zu jüngeren Populationen stark ausgeprägt sind und sich in Lern- und Gedächtnistests wie dem Wasserlabyrinth von relativ unbeeinträchtigt bis hin zu stark beeinträchtigt erstrecken. Diese Varianz wurde schon oft erfolgreich dazu genutzt, den Erhalt von Funktionen sowie Funktionsdefiziten mit der Varianz in den Ausprägungen neurobiologischer Marker zu korrelieren. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden sieben bessere und sieben schlechtere Lerner aufgrund ihrer Verhaltensleistung im Wasserlabyrinth aus einer Stichprobe von 40 alten Ratten ausgewählt und Zusammenhänge zwischen der Performanz im Wasserlabyrinth, dem inhibitorischen Vermeidungslerntest, dem Offenfeld und dem Expressionsgrad der *in vitro* Kurz- und Langzeitpotenzierung (STP und LTP) im Hippocampus (Projekt I) sowie der STP und LTP und der mRNA von Cholin Acetyltransferase (ChAT), dem Synthese-Enzym des Botenstoffs Acetylcholin, und den glutamatergen NMDA Rezeptor Untereinheiten NR2A-C im Striatum (Projekt II) untersucht, Variablen, die im Zusammenhang mit Lern- und Gedächtnisprozessen diskutiert werden. Die besseren Wasserlabyrinthlerner zeigten eine bessere Kurzzeitretention im inhibitorischen Vermeidungslerntest und mehr ChAT mRNA im Striatum, unterschieden sich jedoch nicht von den schlechteren Lernern im Explorationsverhalten oder im Level an STP und LTP im Hippocampus und Striatum. Korrelationsanalysen ergaben bedeutsame Korrelationen zwischen einer besseren Performanz im Wasserlabyrinth, in der Aufgabe mit verborgener Plattform, mehr Aufrichtungen im Offenfeld und STP und LTP im Hippocampus und Striatum, allerdings nur in der Gruppe der besseren Lerner. Ebenfalls in der Gruppe der besseren Lerner korrelierte mehr ChAT mRNA mit einer schlechteren Performanz im Wasserlabyrinth, in einer Aufgabe mit sichtbarer Plattformposition. In der Gruppe der schlechteren Lerner korrelierte hingegen mehr NMDA-NR2A und NR2B mRNA mit einer besseren Performanz in der Aufgabe mit verborgener Plattform und in einem Retentionstest ohne Plattform. Die Ergebnisse weisen daraufhin, dass die Zusammenhänge zwischen den Gruppen im Einklang mit den bekannten Funktionen der untersuchten Hirnareale waren, jedoch heterogen für die jeweiligen Gruppen. Diese Heterogenität ist möglicherweise auf Einflüsse dritter Variablen auf die Korrelationen zurückzuführen und deutet daraufhin, dass die besseren und

schlechteren Lerner Subgruppen einer alten Population darstellen, denen unterschiedliche Eigenschaften inhärent sind. In Projekt III wurde diesen Überlegungen weiter nachgegangen und die Sliding Window Correlation (SWC) Methode entwickelt, um systematisch nach möglichen Heterogenitäten in den Zusammenhängen zwischen Variablen zu suchen. Die SWC-Methode sieht vor, die Individuen einer Stichprobe nach den Werten einer Variable zu rangieren und diese Werte mit den zugehörigen Datenpunkten einer Co-Variante für aufeinanderfolgende, teilweise überlappende Segmente oder Fenster der Rangordnung zu korrelieren. Zur Illustration wurden alte Ratten dem Lernen im Wasserlabyrinth nach rangiert und Segmente dieser Rangordnung mit der Exploration im Offenfeld und Angst in einer Black/White Box korreliert. Die resultierenden Korrelationskoeffizienten (R_s) fluktuierten über die Rangfolge hinweg und variierten nicht nur im Grad, sondern auch in ihrer Valenz, d.h. rangierten von positiv bis negativ. Im Bereich der besseren Wasserlabyrinthlerner deuteten die höchsten R_s auf Zusammenhänge zwischen einem besseren Wasserlabyrinthlernen, mehr Exploration im Offenfeld und weniger Angst in der Black/White Box hin, wohingegen die höchsten R_s im Bereich der mittleren Lerner Zusammenhänge zwischen einem besseren Wasserlabyrinthlernen, weniger Exploration im Offenfeld und mehr Angst in der Black/White Box aufwiesen. Korrelationen zwischen diesen Variablen über die gesamte Stichprobe waren hingegen unbedeutsam. Demnach können mit Hilfe der SWC-Methode Subgruppen einer Population aufgedeckt werden, die sich aus nicht-monotonen Zusammenhängen zwischen Variablen ergeben und in üblichen Korrelationsanalysen über die gesamte Stichprobe maskiert werden. In Projekt IV wurde neben dem Lernen im Wasserlabyrinth auch die Extinktion in alten und adulten Ratten untersucht, die induziert wurde, indem der negative Verstärker, die Plattform, nach der Akquisition mit verborgener Plattform, dem Labyrinth entnommen und mehrere Schwimmdurchgänge ohne eine Plattform durchgeführt wurden. Der Erwartung entsprechend, dass die Extinktion ein negatives Befinden induziert, zeigten beide Altersgruppen eine Art Bewegungslosigkeit oder Immobilität, die sonst bei depressiven Tieren beobachtet wird und mit den Extinktionsdurchgängen anstieg. Alte Tiere, die allgemein stärker auf Stress reagieren als jüngere Tiere, wiesen mehr Immobilität als die adulten Tiere auf, wobei die Lerndefizite in den schlechteren Wasserlabyrinthlernern einen Vulnerabilitätsfaktor für das Ausmaß an Immobilität, das die alte Gruppe entwickelte, darstellte. Die Varianz im Ausmaß an

Bewegungslosigkeit korrelierte bei alten Ratten mit dem Botenstoffgehalt, der post-mortem mittels HPLC-EC gemessen wurde, des Neurotransmitters Dopamin und dessen Metabolit DOPAC sowie Acetylcholin im ventralen Striatum, einer Region, die schon oft mit Verstärkungsprozessen in Verbindung gebracht wurde. Norepinephrin, dessen Konzentration nach unkontrollierbarem Stress absinkt, korrelierte hingegen mit der Immobilität in den adulten Tieren. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Extinktion eine Art Depression auslöst und die extinktions-induzierte Depression ein neues konzeptionelles und empirisches Depressionsmodell darstellen könnte, das besonders relevant für Altersdepressionen ist.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	12
1.1	Das normale Altern	12
1.1.1	Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse	12
1.1.2	Der Einfluss freier Radikale auf das Altern	13
1.1.3	Die Neurotoxizität.....	14
1.1.4	Die cholinerge Hypothese des Gedächtnisverlustes.....	15
1.1.5	Altersbedingte Abnahmen im Verhalten.....	16
1.2	Interindividuelle Differenzen im Alter.....	18
1.2.1	Korrelationsanalysen	18
1.2.2	Subgruppenvergleiche	25
1.3	Das Wasserlabyrinth.....	29
1.3.1	Versuchsaufbau	30
1.3.2	Versuchsabläufe	31
1.3.3	Messvariablen.....	33
1.3.4	Schwimmstrategien.....	34
1.3.5	Altersbedingte Defizite	35
1.3.6	Beteiligte Hirnstrukturen.....	36
2	Der Rahmen der empirischen Arbeiten	38
2.1	Projekt I: Das Lernen im Wasserlabyrinth, die Offenfeldexploration, das inhibitorische Vermeidungslernen und die Kurz- und Langzeitpotenzierung in Hippocampuschnitten bei alten besseren und schlechteren Lernern	38
2.2	Projekt II: Korrelationen zwischen Verhaltensparametern bei alten Ratten und STP und LTP sowie der Genexpression von ChAT und den NMDA-NR2 Untereinheiten im Striatum	40
2.3	Projekt III: Die „Sliding Window Correlation“ Methode zur Aufdeckung verborgener Korrelationen: Die Existenz von Subgruppen in alten Ratten	41
2.4	Projekt IV: Die extinktions-induzierte Hoffnungslosigkeit im Wasserlabyrinth und deren neurochemische Korrelate in alten und adulten Ratten	42

3	Die Forschungsarbeiten im Einzelnen	45
3.1	Das Lernen im Wasserlabyrinth, die Offenfeldexploration, das inhibitorische Vermeidungslernen und die Kurz- und Langzeitpotenzierung in Hippocampusschnitten bei alten besseren und schlechteren Lernern	45
3.1.1	Zusammenfassung	45
3.1.2	Einleitung	46
3.1.3	Materialien und Methoden	47
3.1.3.1	Die Versuchstiere.....	47
3.1.3.2	Das Wasserlabyrinth.....	48
3.1.3.3	Das Offenfeld	50
3.1.3.4	Der inhibitorische Vermeidungslerntest	50
3.1.3.5	<i>In vitro</i> elektrophysiologische Untersuchungen.....	51
3.1.3.6	Statistische Analysen.....	53
3.1.4	Ergebnisse.....	53
3.1.4.1	Das Wasserlabyrinth.....	53
3.1.4.2	Der inhibitorische Vermeidungslerntest	57
3.1.4.3	Das Offenfeld	58
3.1.4.4	Korrelationen zwischen dem Lernen im Wasserlabyrinth und der Offenfeldexploration.....	58
3.1.4.5	<i>In vitro</i> elektrophysiologische Untersuchungen.....	59
3.1.4.6	Korrelationen zwischen dem Verhalten im Wasserlaybrinth und STP und LTP	61
3.1.4.7	Korrelationen zwischen der Offenfeldexploration und STP und LTP	64
3.1.5	Diskussion	66
3.1.5.1	Unterschiede im Verhalten zwischen den besseren und schlechteren Wasserlabyrinthlernern	66
3.1.5.2	Korrelationen zwischen den Lernleistungen im Wasserlabyrinth und STP und LTP bei besser- und schlechterlernenden alten Ratten	69
3.1.5.3	Korrelationen zwischen der Offenfeldaktivität und STP und LTP bei besser- und schlechterlernenden alten Ratten	71

3.2	Korrelationen zwischen Verhaltensparametern bei alten Ratten und STP und LTP sowie der Genexpression von ChAT und den NMDA-NR2 Untereinheiten im Striatum	72
3.2.1	Zusammenfassung	72
3.2.2	Einleitung	72
3.2.3	Materialien und Methoden	74
3.2.3.1	Die Versuchstiere.....	74
3.2.3.2	Das Wasserlabyrinth.....	74
3.2.3.3	Das Offenfeld	77
3.2.3.4	<i>In vitro</i> elektrophysiologischen Untersuchungen.....	77
3.2.3.5	Die quantitative RT-PCR.....	79
3.2.3.6	Statistische Analysen	81
3.2.4	Ergebnisse	81
3.2.4.1	Das Wasserlabyrinth	81
3.2.4.2	Das Offenfeld	84
3.2.4.3	<i>In vitro</i> elektrophysiologische Untersuchungen.....	84
3.2.4.4	Die quantitative RT-PCR.....	86
3.2.4.5	Korrelationen zwischen STP, LTP, ChAT und den NMDA Untereinheiten NR2A, NR2B und NR2C	87
3.2.4.6	Korrelationen zwischen dem Verhalten im Wasserlabyrinth und STP, LTP, ChAT und den NMDA Untereinheiten NR2A, NR2B und NR2C	87
3.2.4.7	Korrelationen zwischen der Offenfeldexploration und STP, LTP, ChAT und den NMDA Untereinheiten NR2A, NR2B und NR2C	90
3.2.5	Diskussion	92
3.2.5.1	Eine höhere Gen Expression von ChAT im Striatum koinzidiert mit einer besseren Lernleistung in alten Ratten.....	93
3.2.5.2	Die NMDA-NR2 Rezeptor Untereinheiten mRNA im Striatum korreliert mit dem Verhalten der alten schlechteren Lerner	94
3.2.5.3	Die Langzeitpotenzierung im Striatum	96
3.2.5.4	Die Informationsverarbeitung im Striatum und Hippocampus verläuft parallel ..	97
3.3	Die „Sliding Window Correlation“ Methode zur Aufdeckung verborgener Korrelationen: Die Existenz von Subgruppen in alten Ratten	100

3.3.1	Zusammenfassung	100
3.3.2	Einleitung	100
3.3.3	Materialien und Methoden	102
3.3.3.1	Die Versuchstiere.....	102
3.3.3.2	Das Wasserlabyrinth	102
3.3.3.3	Das Offenfeld	104
3.3.3.4	Die Black/White Box	104
3.3.3.5	Die Sliding Window Correlation Methode.....	105
3.3.3.6	Korrelationen über die gesamte Stichprobe	106
3.3.4	Ergebnisse	106
3.3.4.1	Zusammenhänge zwischen Exploration und Angst in Abhängigkeit von der Lernfähigkeit	112
3.3.5	Diskussion	114
3.3.5.1	Ergebnisse der Sliding Window Correlation Methode bezüglich der Zusammenhänge im Verhalten	115
3.3.5.2	Die Sliding Window Correlation Methode mit unterschiedlichen Intervallgrößen	117
3.3.5.3	Die mehrmalige Teilnahme eines Individuums bei der Sliding Window Correlation Methode	118
3.3.5.4	Die Sliding Window Correlation Methode ist ein deskriptives Instrument.....	119
3.3.6	Fazit	120
3.4	Die extinktions-induzierte Hoffnungslosigkeit im Wasserlabyrinth und deren neurochemische Korrelate in alten und adulten Ratten	121
3.4.1	Zusammenfassung	121
3.4.2	Einleitung	122
3.4.3	Materialien und Methoden	124
3.4.3.1	Die Versuchstiere.....	124
3.4.3.2	Das Wasserlabyrinth	124
3.4.3.3	Neurochemische Analysen	126
3.4.3.4	Statistische Analysen	127
3.4.4	Ergebnisse	127
3.4.4.1	Die Versuchstiere.....	127
3.4.4.2	Die Akquisition im Wasserlabyrinth	127

3.4.4.3	Die Extinktion im Wasserlabyrinth.....	132
3.4.4.4	Korrelationen zwischen der Immobilität und der Lernfähigkeit im Wasserlabyrinth	138
3.4.4.5	Korrelationen zwischen der Immobilität und post-mortem Neurotransmitterkonzentrationen.....	139
3.4.5	Diskussion	141
3.4.5.1	Akquisition im Wasserlabyrinth bei alten und adulten Ratten	141
3.4.5.2	Extinktion im Wasserlabyrinth bei alten und adulten Ratten	142
3.4.5.3	Die extinktions-induzierte Immobilität bei alten und adulten Ratten – Interaktion mit der Lernfähigkeit.....	143
3.4.5.4	Neurochemische Korrelate der Immobilität	144
3.4.5.5	Die extinktions-induzierte Immobilität als Depressionsmodell.....	146
4	Allgemeine Diskussion und Ausblick.....	148
5	Literatur.....	150

1 Einleitung

1.1 Das normale Altern

Im Allgemeinen bezieht sich das Altern auf einen Reifeprozess, der im Alter von mindestens 30 Jahren beginnt und bis ins hohe Alter von über 90 Jahren fortwährt. Die Seneszenz hingegen beschreibt einen Alterungsprozess, der von Debität und Tod gekennzeichnet ist, jedoch keine zwangsläufige Konsequenz des Alterns ist. Das normale Altern ist dennoch von physiologischen Veränderungen gekennzeichnet, die zur Vulnerabilität gesunder Individuen beitragen; aufgrund von Einbußen in Funktionen, die daran beteiligt sind, die Homöostase aufrecht zu erhalten, wird die Fähigkeit, Stressoren standzuhalten, herabgesetzt. Betroffen sind v.a. das Herz-Kreislauf-System, Lungen- und Nierenfunktionen sowie das Zentralnervensystem (ZNS).

1.1.1 Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse

Im ZNS wird die Reaktion auf Stress über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) vermittelt, wobei eine Aktivierung des hypothalamischen Nukleus paraventricularis (PVN) zur Synthese von Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) und Arginin Vasopressin (AVP) führt, die über ein Gefäßsystem zum Hypophysenvorderlappen gelangen und durch Anbindung an ihre Rezeptoren die Freisetzung von adrenocorticotrophem Hormon (ACTH) verursachen, welches in den Blutkreislauf abgegeben wird. In der Nebenniere stimuliert ACTH die Sekretion von Glucocorticoiden (CORT), d.h. Cortisol im Menschen bzw. Corticosteron in Tieren, welche den Organismus auf entsprechende Anforderungen im Umfeld vorbereiten (Akil und Morano, 1995). Akute Stress-Reaktionen sind lebensnotwendig, aber eine anhaltende Aktivierung der HPA-Achse stellt eine Gefahr für die Gesundheit von Mensch und Tier dar. CORT inhibieren den Transport von Glucose und die Bildung von Adenosintri-phosphat (ATP) und entziehen den Zellen somit die nötige Energie, um für einen geregelten Metabolismus zu sorgen (McLay et al., 1997). Eine negative Rückkopplung trägt normalerweise dazu bei, die Stress-Reaktion zu beenden, d.h., die Freisetzung von CORT selbst führt zur Unterdrückung von CRH und somit zur Inhibition der HPA-Achse. Die negative Rückkopplung wird u.a. über den Hippocampus vermittelt, dessen Aktivität die Produktion von CRH im PVN stoppt (Akil und Morano, 1995; Holsboer, 1999). Der Hippocampus ist eines

der Areale, die sich früh mit dem Alter verändern. Berichtet wurde von Verlusten im Volumen, in der Neuronendichte und in synaptischen Verbindungen, von veränderten Botenstoff- und Rezeptorkonzentrationen sowie von Abnahmen in plastischen Prozessen (Barnes, 1979; Coleman & Flood, 1987; Lupien et al., 1998; Van der Zee & Luiten, 1999). Es wird spekuliert, dass chronisch erhöhte CORT Level zu pathologischen Veränderungen im Hippocampus führen, die einen Funktionsverlust in der negativen Rückkopplung bewirken. Suboptimale Rückkopplungsprozesse kurbeln wiederum die Zirkulation von CORT an, wodurch es zu weiteren Aberrationen in Struktur und Funktion des Hippocampus kommt, ein Kreislauf, der sich bis zur Seneszenz fortsetzen könnte (McLay et al., 1997; Lupien, 1998; Porter & Landfield, 1998). Es wird hypothetisiert, dass pathologische Veränderungen im Hippocampus den alterstypischen Störungen im Lernen und Gedächtnis (siehe unten) teilweise unterliegen (Morris et al., 1982).

1.1.2 Der Einfluss freier Radikale auf das Altern

Eine weitere Theorie vertritt die Ansicht, dass das Altern auf die Aktivität von reaktiven Sauerstoffmolekülen (ROS) oder freien Radikalen zurückzuführen ist (Harman, 1956). Die Elektronentransportkette der Atmung, die in den Mitochondrien stattfindet, führt zur Reduktion von Sauerstoff (O_2) zu Wasser (H_2O). Die Atmungskette ist insofern unvollkommen, als dass Nebenprodukte generiert werden, die zellschädigend sind. O_2 wird mit Hilfe von Enzymen, die oft Metalle enthalten, zu Superoxidradikal (O_2^-) und dann zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reduziert. In Gegenwart von Metallen können O_2^- und H_2O_2 zusammen ein extrem reaktives Radikal erzeugen, Hydroxylradikal (OH), von welchem angenommen wird, dass es Makromoleküle, d.h. Fette, Nukleinsäuren und Proteine, zerstört (Beckman & Ames, 1998a). O_2^- kann ebenso mit Stickoxid (NO), welches in plastischen behavioralen und neuronalen Prozessen eine Rolle spielt, zu Peroxynitrat ($ONOO^-$) reagieren, einem reaktiven Molekül. Zum Schutz gegen ROS existieren endogene Abwehrmechanismen; z.B. kann die Produktion von ROS umgangen werden, indem O_2 reduziert wird, ohne dass Zwischenprodukte wie O_2^- entstehen. Andere Mittel, z.B. Superoxiddismutasen (SODs), beschleunigen die Konvertierung von O_2^- zu H_2O_2 , wohingegen Katalasen und Peroxidasen H_2O_2 eliminieren (Fridovich, 1999). Trotz der verschiedenen Abwehrmechanismen werden Zellschäden durch ROS nicht komplett verhindert. Zellen können zwar oxidierte Fette, Nukleinsäuren und Proteine

reparieren, aber mit dem Alter nehmen Schäden durch ROS dennoch zu. Man spekuliert, dass das Gleichgewicht zwischen Generierung und Beseitigung von ROS bzw. der Reparatur oxidierter Zellbestandteile mit dem Alter verloren geht. Malfunktionen der Zellbestandteile durch kontinuierliches „Auslaufen“ von toxischen O₂ Produkten führen ebenfalls zur Generierung dieser Produkte, so dass man davon ausgeht, dass ein Kreislauf entsteht, der die Zellfunktionen soweit unterminiert, dass der Zelltod eintritt (Beckman & Ames, 1998b). Im ZNS scheinen bestimmte Areale besonders anfällig für die Aktivität freier Radikale und für die damit assoziierten Zellschäden zu sein. Marker für geschädigte Proteine waren vermehrt im Hippocampus und Striatum in alten Mäusen zu finden (Forster et al., 1996). Eine Schlüsselfunktion des Striatums ist die Vermittlung von Antworten auf primäre Verstärker sowie von dem Erlernen von Kontingenzen zwischen Reiz und Reaktion in Abhängigkeit von Verstärkung (Schultz, 1998), wohingegen der Hippocampus eher die Akquisition von räumlichen Relationen zwischen Reizen im Umfeld vermittelt (Morris et al., 1982).

1.1.3 Die Neurotoxizität

Eine weitere Form des neuronalen Stresses beinhaltet die Neurotoxizität, die durch die exzessive Ausschüttung von exzitatorischen Aminosäuren (EAA), wie Glutamat (GLU), und Stimulierung von glutamatergen N-methyl-D-aspartat (NMDA) Rezeptoren, hervorgerufen wird. Bei akuten Konditionen wie Hypoxie/Ischämie und Hirntrauma wird ein Ausströmen von GLU verursacht, das mit neurodegenerativen Erscheinungen assoziiert ist (Olney, 1994). Auch die im Alter auftretende Neurodegeneration könnte auf eine NMDA Hyperaktivität (NRHyper) zurückzuführen sein, wobei hier ein langsamer Prozess vorherrscht im Gegensatz zu akuten Konditionen. Olney et al. (1997) spekuliert, dass eine NRHyper zum Verlust von funktionalen NMDA Rezeptoren oder von ganzen Neuronen führt, die den Rezeptor tragen, mit der Folge einer NMDA Hypoaktivität (NRHypo). Obwohl der Verlust von GLU Rezeptoren im Alter nicht bestätigt werden konnte, fanden mehrere Studien eine verringerte Anzahl von NMDA Bindungsstellen, die auf einen Verlust von Rezeptoren hindeuten könnte (Übersicht in Magnusson, 1998). Hintergründe einer NRHyper liegen nach Olney et al. (1997) und anderen Autoren (Beal, 1992) in einem defizienten Energiestoffwechsel der Mitochondrien. Eine Insuffizienz mit einer verringerten Formation von ATP führt dazu, dass die Ionen Homöostase gestört wird

und die Membran teilweise und chronisch depolarisiert. Der Magnesium Block, welcher den Einstrom von Ca^{2+} durch den Ionenkanal des NMDA Rezeptors normalerweise unterbindet, wird aufgehoben und es kommt zu einer Akkumulierung von Ca^{2+} in der Zelle. Die Folge sind Zellverletzungen und letztendlich Zelltod (Hartley et al., 1993). Faktoren, wie CORT, können die Neurotoxizität durch GLU erheblich verstärken, vermutlich dadurch, dass CORT den GLU-induzierten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle steigert (Goodman et al., 1996). Dawson et al. (1991) zeigten, dass NO eins der Moleküle ist, welches die Neurotoxizität durch GLU vermittelt. Der Einstrom von Ca^{2+} bewirkt eine Reihe von intrazellulären Ereignissen, so auch die Formation von NO. Als retrograder Botenstoff kann NO in die präsynaptische Zelle diffundieren und die Ausschüttung von GLU induzieren. NO besitzt zusätzlich neurotoxisches Potenzial, wenn es mit O_2^- zu ONOO^- reagiert. ONOO^- kann Proteine in der Atmungskette attackieren und in den Nukleus wandern, wo es die DNA schädigt. Solche Schädigungen initiieren Prozesse, die dazu führen, dass die Zelle vollständig zerstört und abgebaut wird (Dawson & Dawson, 2004). Nach Olney (1994) kann eine NRHypo ebenfalls zum Zelltod führen durch eine niedrige, jedoch chronische, glutamaterge und cholinerge Aktivität, die durch eine NRHypo ausgelöst wird. Eine experimentelle NRHypo (die sogenannte Olney Läsion) wird durch die Blockade von NMDA Rezeptoren, die auf GABAergen (GABA = Gamma-Aminobuttersäure) Interneuronen lokalisiert sind, herbeigeführt. Hierdurch entsteht ein Verlust über die inhibitorische Kontrolle, die eine tonische Aktivierung der NMDA Rezeptoren normalerweise über die Ausschüttung von GLU und Acetylcholin (ACh) ausübt. Der exzitatorische Neurotransmitter ACh kann in hohen Dosen ebenso wie GLU neurotoxisch wirken (Wenk et al., 1996) und bei Dysfunktionen im Energiestoffwechsel können bereits normale Mengen GLU zellschädigend sein (Simpson & Isacson, 1993; Wenk et al., 1996). Olney et al. (1997) spekuliert, dass kognitive Symptome im Alter erst mit einer NRHypo auftreten, als Folge einer NRHyper und des Verlustes inhibitorischer Neurone.

1.1.4 Die cholinerge Hypothese des Gedächtnisverlustes

Die cholinerge Hypothese des Gedächtnisverlustes im Alter entstand aufgrund einer Vielzahl von Befunden, die zeigten, dass im späten Alter und bei altersassoziierten Pathologien, wie der Alzheimerschen Krankheit (AD), ACherge Marker abnehmen. Sie besagt, dass kognitive Defizite im Alter und bei AD, v.a. Aufmerksamkeitsdefizite

und Beeinträchtigungen in der Akquisition und Retention neuer Informationen, auf den Verlust dieser Marker zurückzuführen sind (Bartus et al., 1982; Perry et al., 1999; Sarter & Turchi, 2002). Diese Hypothese konnte soweit bestätigt werden, als Verluste in AChergen Neuronen und Atrophie des basalen Vorderhirns (BF), einer cholinergen Ursprungsregion, mit Lern- und Gedächtnisdefiziten in alten Tieren korrelieren und unspezifische neurotoxische Läsionen des BF in jungen Tieren Lern- und Gedächtnisdefizite hervorrufen (Übersicht in Gallagher & Colombo, 1995). Allerdings führten selektive Läsionen durch Gabe von 192 IgG-Saporin, einem Gift, das cholinerge Zellen im Nukleus basalis magnocellularis (NBM) und medialen Septum (MS), Areale des BF, und den Projektionsgebieten Cortex und Hippocampus eliminiert, nicht zur Abnahme im Lernen und Gedächtnis (Torres et al., 1994; Berger-Sweeney et al., 1994; Baxter et al., 1999; Baxter & Gallagher, 1996). Das MS sendet neben AChergen auch eine GABAerge Projektion zum Hippocampus (Kohler et al., 1984), die besonders kritisch für die Generierung des Theta Rhythmus ist (Lee et al., 1994). Dieser tritt v.a. dann auf, wenn ein Tier die Umgebung exploriert (Buzsaki, 2002). Das Explorationsverhalten dient der Informationsaufnahme und – Speicherung und ist abhängig von Erregung und Aufmerksamkeitsprozessen (Berlyne, 1966a, b, 1969). Unspezifische Läsionen des BF, die zu Defiziten im Lernen und Gedächtnis und verwandten Prozessen führen, könnten demnach auf die Zerstörung von AChergen und GABAergen Projektionen zurückzuführen sein (Gallagher & Colombo, 1995).

1.1.5 Altersbedingte Abnahmen im Verhalten

Verhaltensstudien zeigen, dass mehrere Funktionsbereiche im Alter abnehmen können. Minderungen in kognitiven Fähigkeiten betreffen beispielsweise Lern- und Gedächtnisfunktionen der hippocampalen Formation und des nahe gelegenen limbischen Cortex (enthorinaler, perirhinaler und parahippocampaler Cortex) (Übersicht in Gallagher & Rapp, 1997). Diese Areale repräsentieren und speichern komplexe räumliche und zeitliche Relationen zwischen Ereignissen und Reizen sowie deren Anbindung an einen Kontext (Mumby et al., 2002; Broadbent et al., 2004; Hammond et al., 2004; Winters et al., 2004). Im Gegensatz hierzu involviert die klassische Konditionierung die Paarung eines anfänglich neutralen Reizes (CS) mit einem physiologisch relevanten Reiz (US). Der ursprünglich neutrale Reiz wird hierdurch zum konditionierten Reiz und kann Reaktionen (CR) hervorrufen, z.B. eine

Furchtreaktion, die vor der Paarung nur von dem US ausgelöst wurde. Diese Form des Lernens impliziert Teile der Amygdala und bleibt im Alter weitgehend erhalten (Houston et al., 1999; Doyere et al., 2000). Die klassische Konditionierung von einfachen Reflexen, wie der Augenblinkreaktion, ist hingegen eine Funktion des Cerebellums. Der Verlust von Zellen in dieser Struktur korreliert im Alter mit einer verlangsamten Lernrate (Woodruff-Pak & Trojanowski, 1996). Die operante Konditionierung beschreibt eine Form des Lernens, die über Verstärkerprozesse definiert wird. Eine positive Konsequenz für ein Verhalten erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass dieses Verhalten auftritt, wohingegen eine negative Konsequenz die Auftretenswahrscheinlichkeit verringert. Wird ein Verhalten (R) in Gegenwart eines neutralen Reizes (S) positiv oder negativ verstärkt bzw. bestraft, erhöht bzw. verringert die Darbietung dieses Reizes die Auftretenswahrscheinlichkeit des Verhaltens. Die Akquisition von S-R Assoziationen erfordert ein intaktes Striatum (McDonald & White, 1993) bzw. nach Murray & Wise (2004) einen intakten Hippocampus. Im Alter bleibt diese Form des Lernens dem Anschein nach erhalten (zumindest in Lernsituationen, in welchen bestimmte Verhaltensweisen kontinuierlich verstärkt werden, d.h., wenn auf jede Reaktion eine Verstärkung folgt) (Campbell & Haroutunian, 1981; Winocur, 1991; aber siehe Roux et al., 1994). Dagegen nimmt das Kurzzeitgedächtnis mit dem Alter ab (Dunnett et al., 1988; Winocur, 1991, 1992; Roux et al., 1994). Ein zentrales Areal, welches Repräsentationen von visuellen Reizen oder Objekten, bzw. den Positionen dieser Reize und Objekte kurzfristig speichert und entsprechende Reaktionen, auch operant konditionierte Reaktionen, plant und initiiert, ist der präfrontale Cortex (PFC). Altersbedingte strukturelle und funktionelle Veränderungen des PFC konnten mehrfach verzeichnet werden und gehen mit Defiziten in Kurzzeitgedächtnisaufgaben einher (Cruz et al., 2004; Luebke et al., 2004; Rossi et al., 2004; Smith et al., 2004).

Im Allgemeinen kann nicht ausgeschlossen werden, dass altersbedingte Veränderungen im Lernen und Gedächtnis zum Teil auf anderen, für die Performanz relevante, Prozessen beruhen. Sarter und Turchi (2002) sind der Meinung, dass Abnahmen in Aufmerksamkeitsprozessen, d.h. in den Ressourcen, die für die Informationsverarbeitung zur Verfügung stehen und/oder in den Möglichkeiten, die verfügbaren Ressourcen den Anforderungen entsprechend anzubringen, die im Alter auftretenden Lern- und Gedächtnisdefizite weitgehend erklären können. Birren & Fischer (1995) beobachteten, dass eine reduzierte

Informationsverarbeitungsgeschwindigkeit im Alter zu kognitiven Defiziten beiträgt. Zusätzlich können emotionale Faktoren, wie affektive Störungen, kognitive Leistungen beeinträchtigen (Thomas et al., 1998). Sensorische und motorische Funktionsdefizite, wie Seh- und Gleichgewichtsstörungen, Kraftverlust und motorische Verlangsamung (Roos et al., 1997; Konrad et al., 1999), können die Performanz ebenfalls beeinträchtigen.

Grundsätzlich ist zu betonen, dass nicht alle der oben aufgeführten Funktionsdefizite zugleich, in einer bestimmten Reihenfolge, in allen Individuen oder jeweils im selben Ausmaß auftreten. Die verschiedenen Systeme innerhalb eines Individuums sowie auch die Individuen untereinander altern zu unterschiedlichen Raten. Das chronologische Alter ist daher nur ein unzureichendes Maß für das biologische Alter eines Individuums (Collier und Coleman, 1991). Im folgenden Abschnitt (Punkt 1.2) wird das Thema der interindividuellen Varianz im Alter genauer behandelt.

1.2 Interindividuelle Differenzen im Alter

Sowohl Rodentien als auch Menschen weisen im Alter interindividuelle Differenzen auf, die im Vergleich zu jüngeren Populationen stark ausgeprägt sind (Gage et al., 1989; Frick et al., 1995). In Lern- und Gedächtnisaufgaben erstreckt sich diese Varianz von relativ unbeeinträchtigt bis hin zu stark beeinträchtigt im Vergleich zu jüngeren Populationen und man nimmt an, dass unterschiedliche Alterungsraten der Individuen hierzu beitragen (Baxter und Gallagher, 1996). Hintergründe der altersbedingten Varianz sind möglicherweise schon im jüngeren Alter zu finden. Allerdings sind bisher nur wenige prädiktive Faktoren aufgedeckt worden. In einer Längsschnittstudie konnten Dellu et al. (1994) zeigen, dass junge, in einer neuen Umgebung besonders aktive Ratten, die auch eine erhöhte HPA-Achsen Aktivität aufzeigten, im Alter Gedächtnisdefizite aufwiesen, von denen eine weniger aktive Gruppe verschont blieb.

1.2.1 Korrelationsanalysen

Bisweilen war die Altersforschung stark davon geprägt, unabhängig von der Varianz im Alter, alte Tiere mit jüngeren Populationen neurobiologisch zu vergleichen. Wie unter Punkt 1.1 beschrieben, können mit dem Alter jedoch mehrere Funktionen abnehmen. Neurobiologische Altersunterschiede sind daher unspezifisch in Bezug auf bestimmte Verhaltensfunktionen. In Anbetracht der Varianz im Verhalten kommt

hinzu, dass Ab- oder Zunahmen eines neurobiologischen Markers Indizien für Funktionsdefizite oder aber kompensatorische Prozesse sein können, die dem Erhalt von Hirn- und Verhaltensfunktionen dienen (Gallagher und Burwell, 1989). Aus diesen Gründen ging man dazu über, Verhaltensmaße zusätzlich zu neurobiologischen Markern zu erheben und wendete Korrelationsanalysen an, um Zusammenhänge zwischen beiden zu überprüfen. Um den Hintergrund dieser Entwicklung zu verdeutlichen, sind in Abb. 1 entsprechende Beispiele aufgeführt. In Abb. 1A ist ein neurobiologischer Altersunterschied dargestellt, der zeigt, dass alte Tiere größere Mengen eines Markers aufweisen als adulte Tiere. In Abb. 1B zeigt sich ein Altersunterschied im Verhalten, wobei alte Tiere eine schlechtere Performanz aufweisen als adulte Tiere. Das Alter hat demnach einen Effekt auf das Verhalten und den Marker, jedoch kann nicht gefolgert werden, dass der eine Effekt mit dem anderen verknüpft ist. Abb. 1C zeigt, dass trotz der Altersunterschiede kein Zusammenhang zwischen dem Marker und dem Verhalten existiert, wohingegen Abb. 1D bedeutsame Korrelationen zwischen beiden darstellt. In beiden Altersgruppen korreliert eine schlechtere Performanz mit einer größeren Menge des neurobiologischen Markers im Einklang mit den Gruppenunterschieden, die in Abb. 1A und 1B dargestellt sind. Man kann also hypothetisieren, dass sich größere Mengen des Markers negativ auf das Verhalten auswirken und die Zunahme des Markers im Alter der Abnahme im Verhalten unterliegt. In Abb. 1E ist eine Korrelation aufgeführt, die besagt, dass eine schlechtere Performanz in den adulten Individuen mit größeren Mengen des Markers korreliert. In der älteren Population ist ein ähnlicher Zusammenhang jedoch nicht gegeben und man könnte hieraus folgern, dass das Alter einen Einfluss auf den Zusammenhang genommen hat. Der Hintergrund hierfür könnte in der Heterogenität der alten Population liegen; dritte Variablen, wie unentdeckte pathologische Prozesse, die sich in einem Teil der Individuen auf das Verhalten und/oder das neurobiologische Substrat auswirken, könnten einen Zusammenhang aufheben. Korrelationen können jedoch auch artifiziell geschwächt oder verzerrt werden, wenn Varianzen nicht adäquat dargestellt werden. Z.B. sollte sichergestellt werden, dass Messfehler im Vergleich zur echten Varianz gering ausfallen und das Niveau des Verhaltenstests weder zu hoch noch zu niedrig ist, so dass Flur- und Deckeneffekte vermieden werden (Baxter und Gallagher, 1996). In Abb. 1F ist ein Beispiel aufgeführt, in welchem sich eine Korrelation zwischen einem Verhaltensmaß und einem neurobiologischen Marker

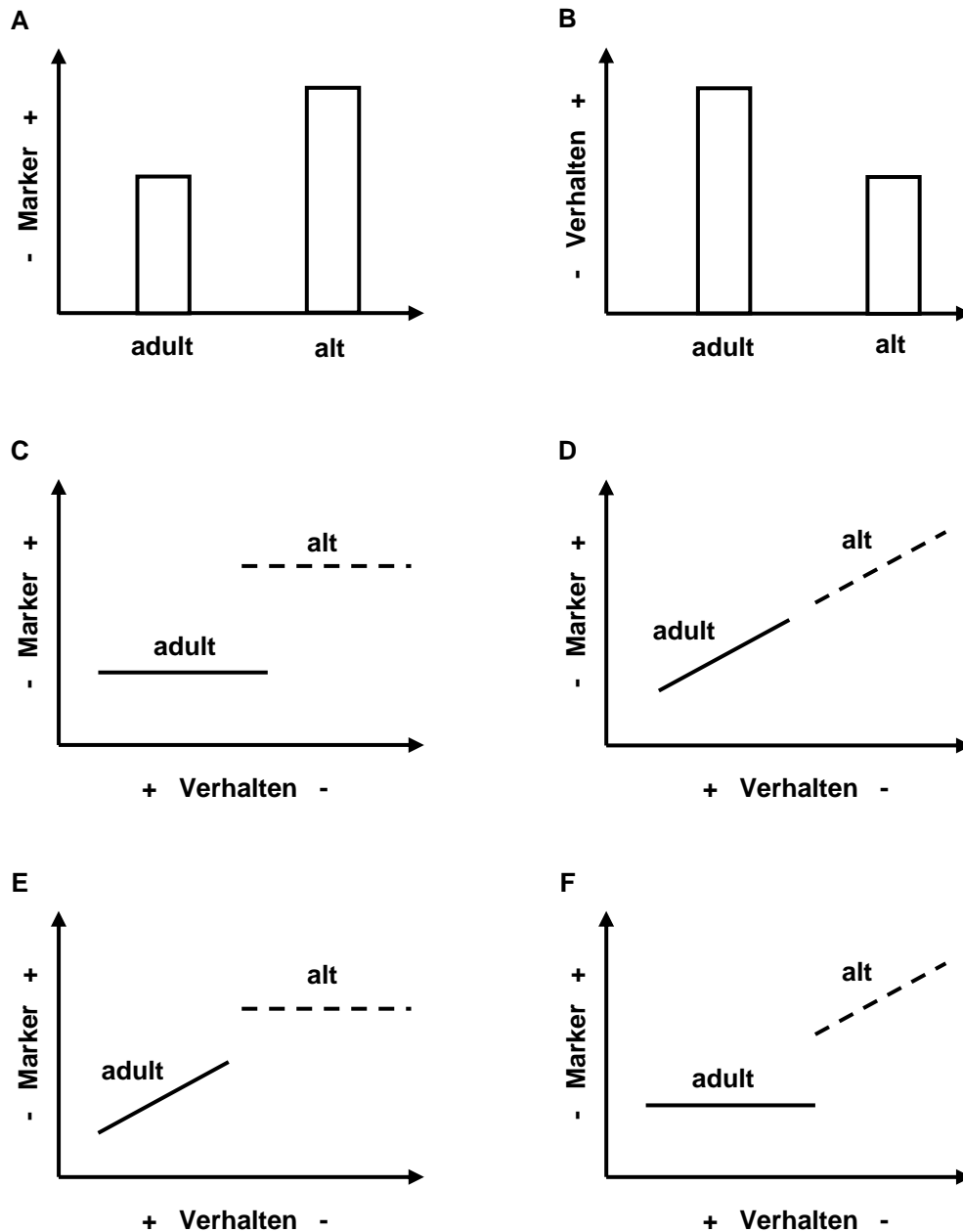


Abb. 1. Zusammenhänge zwischen einem Verhaltensmaß und einem neurobiologischen Marker. (A, B) Ein Vergleich der beiden Altersgruppen zeigt, dass alte, im Vergleich zu adulten Individuen, größere Mengen eines neurobiologischen Markers und eine schlechtere Performanz aufweisen. (C-F) Korrelationen sind anhand von Regressionslinien (durchgezogen = adult; gestrichelt = alt) dargestellt. (C) Der neurobiologische Marker und das Verhaltensmaß korrelieren nicht miteinander. (D) In beiden Altersgruppen gehen größere Mengen (+) des Markers mit einer schlechteren Performanz (-) einher. (E) In der jüngeren Population korrelieren größere Mengen (+) des Markers mit einer schlechteren Performanz (-), wohingegen kein eindeutiger Zusammenhang in der alten Population zu erkennen ist. (F) In der jüngeren Population ist kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem neurobiologischen Marker und dem Verhaltensmaß zu erkennen, wohingegen größere Mengen (+) des Markers mit einer schlechteren Performanz (-) in alten Tieren korreliert.

erst mit dem Alter ergibt. Z.B. wäre es vorstellbar, dass Individuen in Bezug auf bestimmte Zusammenhänge mit dem Alter homogener werden und sich auf diese Weise ein Zusammenhang im Alter herauskristallisiert, der im jüngeren Alter durch Einflüsse dritter Variablen auf den Zusammenhang verborgen bleibt. Ebenso wäre es möglich, dass im jüngeren Alter ein kurvenlinearer anstelle eines linearen Zusammenhangs existiert. Z.B. könnten größere Mengen eines Markers bis zu einem gewissen Punkt zu einer besseren Performanz beitragen, hiernach jedoch schädlich werden und die Performanz beeinträchtigen. Es wäre auch möglich, dass kleinere Variationen im Ausmaß eines Markers, der einer bestimmten Funktion unterliegt, keine Konsequenzen für ein Verhalten haben, dass jedoch Verhaltensdefizite proportional zu Zunahmen des Markers auftreten, wenn ein gewisses Limit überstiegen wird.

Die Mehrzahl an Studien, die Korrelationsanalysen durchgeführt haben, nutzte die Verhaltensvarianz im Relationslernen im Wasserlabyrinth (siehe Punkt 1.3), um Zusammenhänge zwischen dem Erhalt und den Abnahmen im Lernen und den Ausprägungen neurobiologischer Marker in alten Ratten zu untersuchen (Tabelle 1), obwohl alte Tiere, im Vergleich zu Adulten, auch in anderen Verhalten eine beträchtliche Varianz aufzeigen, z.B. in der Offenfeldlokomotion und -exploration und motorischen Koordination (Gage et al., 1989). Das Relationslernen im Wasserlabyrinth wird in einer Aufgabe gemessen, in welcher die Position einer im Wasser verborgenen Plattform anhand von Hinweisreizen im Umfeld erlernt wird (Morris, 1984). Tabelle 1 führt Studien auf, die Korrelationen entweder nur für alte Ratten berechnet haben (Fischer et al., 1989; Miettinen et al., 1993; Smith et al., 1995; Gill und Gallagher, 1998; Stemmelin et al., 2000) oder für adulte und alte separat (Barnes, 1979; Deupree et al., 1991; Nicolle et al., 1996; Bizon et al., 2001). In der letzten Gruppe fanden nur Barnes (1979) und Nicolle et al. (1996) bedeutsame Korrelationen für beide Altersgruppen, jedoch nur für einzelne Variablen. Die Ergebnisse, die sich aufgrund von Korrelationen mit alten Tieren ergaben, deuteten zumeist daraufhin, dass ein relativ beeinträchtigtes Verhalten mit einem geringeren Maß eines bestimmten Markers korrelierte, beispielsweise LTP, ein Maß für neuronale Plastizität, von welchem angenommen wird, dass es Aufmerksamkeits-, Lern- und Gedächtnisprozessen unterliegt (siehe Punkt 3.1). Ähnliche Korrelationen fand man mit der Anzahl an GABAergen (Parvalbumin-positiven) Neuronen, an

Tabelle 1. Korrelationen zwischen interindividuellen Differenzen im Funktionsstatus und neurobiologischen Markern in alten Ratten

Autoren	Stamm	Alter	Verhaltenstest	Variablen	Marker	Areale	Ergebnisse
Barnes, 1979	Long-Evans	28-34	Barnes' maze	Fehler, gelaufene Distanz (Akquisition)	LTE	HIPP	- $R_{LTE\ HIPP}$ u. Fehler; - $R_{LTE\ HIPP}$ u. Distanz
Fischer et al., 1989	Sprague-Dawley	22-24	MWM	Zeit zur Plattform (Akquisition), Überschwimmen der vorherigen Plattformposition („Probe Trial“)	Zellgröße u. Anzahl AChE positiver Zellen, ChAT Protein	MS, DB, Striatum, NBM	+ $R_{Größe\ MS}$ u. Überschwimmen; - $R_{Anzahl\ MS}$, Striatum u. Zeit zur Plattform; + $R_{Anzahl\ MS}$, Striatum, VDB u. Überschwimmen
Deupree et al., 1991	F344	24-26	MWM	Platzpräferenz („Probe Trial“)	STP, LTP	HIPP	+ $R_{LTP\ HIPP}$ Persistenz u. Platzpräferenz
Miettinen et al., 1993	Wistar	26	MWM; Inhibitorischer Vermeidungs- lernstest	Zeit u. Distanz zur Plattform (Akquisition), Platzpräferenz („Probe Trial“) Eintrittslatenz sofort u. 6 Tage nach Fußschock	Zelldichte Parvalbumin, Somatostatin positiver Zellen	MS, LS, DB, HIPP, EC, SSC, MC	- $R_{Parvalbumin}$ EC u. Distanz zur Plattform; + $R_{Parvalbumin}$ EC u. Eintrittslatenz 6 Tage nach Fußschock
Smith et al., 1995	Long-Evans	24-25	MWM	Platzpräferenz	[³ H]HC-3,	HIPP, Septum,	- $R_{PZ\ HIPP}$ u.

				(„Probe Trial“)	[³ H]Nic, [³ H]PZ, [³ H]AF-DX 384, [³ H]NMS	DB, FC, EC, AMYG, TH, BG, CC	Platzpräferenz; + R _{HC-3} HIPP u. Platzpräferenz
Nicolle et al., 1996	Long-Evans	24-25	MWM	Suchfehler („Probe Trial“)	[³ H]AMPA, [³ H]Kainat, [³ H]NMDA, [³ H]DAGO	HIPP, LS, Striatum	+ R _{Kainat} HIPP u. Suchfehler; + R _{NMDA} Striatum u. Suchfehler;
Gill & Gallagher, 1998	Long-Evans	23-25	MWM	Suchfehler („Probe Trial“)	[³ H]AF-DX 384	MS/DB, LDT, PPT	- R _{AF-DX} MS/ DB u. Suchfehler
Stemmelin et al., 2000	Long-Evans	26	MWM	Zeit u. Distanz zur Plattform (Akquisition), Platzpräferenz, Überschwimmen der vorherigen Plattformposition („Probe Trial“)	Anzahl ChAT u. p75 ^{NTR} positiver Zellen;	MS, DB, NBM, Striatum;	- R _{ChAT} NBM, Striatum u. Zeit, Distanz zur Plattform; + R _{ChAT} NBM, Striatum u. Überschwimmen; + R _{ChAT} Striatum u. Platzpräferenz; - R _{p75} MS u. Zeit, Distanz zur Plattform; + R _{p75} NBM u. Überschwimmen; + R _{ACh} , 5-HIAA, 5-HIAA/ 5-HT Striatum u. Verhalten im „Probe Trial“; + R _{5-HT} , 5-HIAA, NE HIPP u. Verhalten im „Probe Trial“;
					ACh, DA, NE, 5-HT, HVA, DOPAC, 5-HIAA, HVA/DA, DOPAC/DA, 5-HIAA/5-HT	FPC, EC, OC, HIPP, Striatum	

							+ R _{5-HIAA} , 5-HIAA/5-HT, HVA/DA FPC u. Verhalten im „Probe Trial“ ; + R _{DOPAC/DA} OC u. Verhalten im „Probe Trial“ ; - R _{5-HT} Striatum u. Akquisition; - R _{DOPAC/DA} HIPP u. Akquisition; - R _{NE} FPC u. Akquisition
Bizon et al., 2001	Long-Evans	27-28	MWM	Suchfehler ("Probe Trial")	MR, GR mRNA;	HIPP, PFC, OF, LS	-R _{MR, GR} HIPP u. Suchfehler; + R _{GR} PFC, OF u. Suchfehler
					Zelldichte	HIPP	

ACh = Acetylcholin; AChE = Acetylcholinesterase (Abbau Enzym für ACh); [³H]AF-DX 384 = Marker für muskarinerge M₂ Rezeptoren; [³H]AMPA = [³H]α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (ionotroper GLU Rezeptor); AMYG = Amygdala; BG = Basalganglien; CC = Corpus Callosum; ChAT = Cholin Acetyltransferase (Synthese Enzym für ACh); [³H]DAGO = (D-alan², N-methyl-phe⁴, glycol⁵)(tyrosol^{3,5})enkephalin (Marker für μ-Opiat Rezeptoren); DA = Dopamin; DB = vertikale Extremität des diagonalen Bands von Broca; DOPAC = 3,4-dihydroxyphenylelessigsäure; EC = enthorinaler Cortex; FPC = frontoparietaler Cortex; GR = Glucocorticoid Rezeptor; [³H]HC3 = [³H]hemicholinium-3 (Marker für präsynaptische Bindungsstellen mit hoher Affinität für Cholin); 5-HIAA = 5-hydroxyindolessigsäure; HIPP = Hippocampus; 5-HT = Serotonin; HVA = Homovanillinsäure; [³H]Kainat = ionotroper GLU Rezeptor; LDT = laterodorsaler tegmentaler Nukleus; LS = laterales Septum; LTE = Langzeitverstärkung, -potenzierung (Marker für neuronale Plastizität); LTP = Langzeitpotenzierung (Marker für neuronale Plastizität); MC = motorischer Cortex; MS = mediales Septum; MR = Mineralocorticoid Rezeptor; MWM = Wasserlabyrinth nach Morris; NBM = Nukleus Basalis Magnocellularis; NE = Norepinephrin; [³H]Nic = [³H]Nikotin (Marker für nikotinerge Bindungsstellen); [³H]NMDA = [³H]N-methyl-D-aspartat (ionotroper GLU Rezeptor); [³H]NMS = [³H]N-methylscopolamin (Marker für unspezifische muskarinerge Bindungsstellen); OC = occipitaler Cortex; OF = olfaktorischer Cortex; Parvalbumin = Marker für GABAerge Neurone; PFC = präfrontaler Cortex; p75^{NTR} = Neurotrophin Rezeptor mit niedriger Affinität; PPT = pedunculo pontine tegmentaler Nukleus; [³H]PZ = [³H]Pirenzepin (Marker für muskarinerge M₁ Rezeptoren); +R = positiver Korrelationskoeffizient; -R = negativer Korrelationskoeffizient; Somatostatin = Marker für GABAerge Neurone; SSC = somatosensorischer Cortex; STP = Kurzzeitpotenzierung (Marker für neuronale Plastizität); TH = Thalamus.

Bindungsstellen an cholinergen Rezeptoren sowie mit den Konzentrationen von Monoaminen. Eine Ausnahme war die Studie von Nicolle et al. (1996), in welcher ein geringeres Maß an GLU Bindungsstellen mit einer besseren Performanz im Wasserlabyrinth korrelierte.

1.2.2 Subgruppenvergleiche

Ein anderer Ansatz, der mehrfach dazu genutzt wurde, die Verhaltensvarianz in alten Tieren, zumeist im Relationslernen im Wasserlabyrinth, in einen Bezug zu neurobiologischen Markern zu setzen, basiert auf der Einteilung alter Tiere in bessere, relativ unbeeinträchtigte und schlechtere, relativ defiziente Lerner, die dann neurobiologisch miteinander verglichen werden (siehe Tabelle 2). In einer Studie wurden die besseren und schlechteren Wasserlabyrinthlerner so ausgewählt, dass sie eine breite Spanne an defizienten Verhaltensleistungen repräsentierten (Fischer et al., 1989), wohingegen in einer anderen Arbeit die beiden Extreme einer Stichprobe selektiert wurden (Hasenöhrle et al., 1997). Stemmelin et al. (2000) wendete eine Clusteranalyse an, um die Subgruppen zu bestimmen. In anderen Studien stand der unmittelbare Vergleich zur mittleren Performanz der adulten Tiere im Vordergrund. Alte, relativ beeinträchtigte Lerner wurden als solche klassifiziert, wenn die Lernleistungen den adulten Mittelwert um mehr als zwei Standardabweichungen (SD) überstiegen und als unbeeinträchtigt, wenn die Performanz nicht mehr als 0.5 oder 1 SD über dem adulten Mittelwert lag. 28-55% bzw. 15-20% der Tiere fielen in diese Kategorien (Issa et al., 1990; Fischer et al., 1991; Aubert et al., 1995; Law et al., 2000). Die Verschiedenartigkeit dieser Auswahlkriterien macht deutlich, dass kein Konsens besteht, wie Tiere am besten einzuteilen sind. Ähnlich verhält es sich mit den Ansichten darüber, wie das Lernen am besten zu messen ist. Eine gängige Variable, von der man ausgeht, dass sie die allgemeine Lernfähigkeit im Wasserlabyrinth beschreibt, ist die geschwommene Zeit oder die Distanz zur verborgenen Plattform (siehe auch Punkt 1.3). Um hiernach den Funktionsstatus zu bestimmen, führten die in Tabelle 2 zitierten Studien drei (Issa et al., 1990) bis acht (Hasenöhrle et al., 1997) Trainingstage und drei (Aubert et al., 1995; Law et al., 2000) bis acht (Fischer et al., 1989, 1991), maximal 60 (Fischer et al., 1989, 1991) bis 120 (Issa et al., 1990; Hasenöhrle et al., 1997) Sekunden lange Durchgänge pro Tag durch und betrachteten für die Auswahl der Tiere die letzten zwei von fünf Trainingstagen (Fischer et al., 1989, 1991), die letzten vier von fünf

Tabelle 2. Vergleiche von Subgruppen von alten Ratten mit unterschiedlichem Funktionsstatus auf neurobiologische Marker

Autoren	Stamm	Alter	Verhaltenstest	Einteilungskriterium	Marker	Areale	Ergebnisse
Fischer et al., 1989	Sprague-Dawley	22-24	MWM	Zeit zur Plattform (Akquisition) u. Überschwimmen der vorherigen Plattformposition („Probe Trial“)	Zellgröße u. Anzahl AChE positiver Zellen, ChAT Protein	MS, DB, Striatum, NBM	Größe _{MS} : B > S; Anzahl Striatum, NBM: B > S
Gallagher et al., 1990	Long-Evans	28-29	MWM	Platzpräferenz u. Überschwimmen der vorherigen Plattformposition („Probe Trial“)	ChAT Protein, DA, NE, 5-HT, HVA, DOPAC, 5-HIAA; Muskarinerge Bindungen	FC, Striatum, BF, HY, HIP, PC; HIP	ChAT _{BF, FC} : B > S
Issa et al., 1990	Long-Evans	23-27	MWM	Zeit zur Plattform (Akquisition)	Zelldichte; CORT, ACTH; MR, GR Bindungen	HIPP; Blut; HIP, HY, Hypophyse	Dichte _{HIPP} : B > S; CORT, ACTH _{basal} : B < S; CORT _{post-stress} : B < S; GR _{HIPP} : B > S
Fischer et al., 1991	Sprague-Dawley	24	MWM	Zeit zur Plattform (Akquisition)	ACh (extrazell.); Zellgröße u. Anzahl NGFr positiver Zellen	HIPP; MS, DB	Anzahl _{NGFr} MS, DB: B > S
Aubert et al., 1995	Long-Evans	24-25	MWM	Zeit zur Plattform (Akquisition)	ChAT Protein, [³ H]HC-3,	Cortex, HIP,	[³ H]AF-DX 384 Cortex,

					[³ H]JPZ, [³ H]AF-DX 384, [³ H]Cystisin,	Septum, Striatum	HIPP: B < S
Hasenöhl et al., 1997	Wistar	27	MWM	Zeit zur Plattform (Akquisition), Überschwimmen der vorherigen Plattformposition („Probe Trial“)	NGF mRNA; TrkA mRNA; p75 ^{NTR} mRNA	HIPP; BF, Striatum; BF	p75 ^{NTR} _{BF} : B > S
Law et al., 2000	Long-Evans	24-26	MWM	Zeit zur Plattform (Akquisition)	nNOS, HO-2 mRNA	HIPP, Cortex	nNOS _{HIPP} , Cortex: B < S; HO-2 _{HIPP} : B < S
Stemmelin et al., 2000	Long-Evans	26	MWM	Distanz zur Plattform (Akquisition)	Anzahl ChAT u. p75 ^{NTR} positiver Zellen;	MS, DB, NBM, Striatum;	ChAT _{NBM} , Striatum: B > S; p75 _{MS} : B > S; DOPAC/DA FPC: B > S
					ACh, DA, NE, 5-HT, HVA, DOPAC, 5-HIAA, HVA/DA, DOPAC/ DA, 5-HIAA/5-HT	FPC, EC, OC, HIPP, Striatum	
Bizon et al., 2001	Long-Evans	27-28	MWM	Suchfehler („Probe Trial“)	CORT; MR, GR mRNA; Zelldichte	Blut; HIPP, PFC, OF, LS; HIPP	CORT _{post- stress} : B < S; GR _{OF} : B > S;

ACh = Acetylcholin; AChE = Acetylcholinesterase (Abbau Enzym für ACh); ACTH = adrenocorticotrophes Hormon; [³H]AF-DX 384 = Marker für muskarinerge M₂ Rezeptoren; B = Subgruppe der besseren alten Lerner; BF = basales Vorderhirn; ChAT = Cholin Acetyltransferase (Synthese Enzym für ACh); CORT = Corticosteron; [³H]Cystisin = Marker für nikotinerge Bindungsstellen; DA = Dopamin; DB = vertikale Extremität des diagonalen Bands von Broca; DOPAC =

3,4-dihydroxyphenylelessigsäure; EC = enthorinaler Cortex; FC = frontaler Cortex; FPC = frontoparietaler Cortex; GR = Glucocorticoid Rezeptor; [³H]HC3 = [³H]hemicholinium-3 (Marker für präsynaptische Bindungsstellen mit hoher Affinität für Cholin); 5-HIAA = 5-hydroxyindolessigsäure; HIPPO = Hippocampus; HO-2 = Haem Oxygenase 2 (kann die Produktion von Antioxidantien initiieren); 5-HT = Serotonin; HVA = Homovanillinsäure; HY = Hypothalamus; LS = laterales Septum; MS = mediales Septum; MR = Mineralocorticoid Rezeptor; MWM = Wasserlabyrinth nach Morris; NBM = Nucleus Basalis Magnocellularis; NE = Norepinephrin; NGF = Nervenwachstumsfaktor; NGFr = Nervenwachstumsfaktor Rezeptor; nNOS = neuronale Stickoxid Synthase (synthetisiert NO); OC = occipitaler Cortex; OF = olfaktorischer Cortex; PC = parietaler Cortex; PFC = präfrontaler Cortex; p75^{NTR} = Neurotrophin Rezeptor mit niedriger Affinität; [³H]PZ = [³H]Pirenzepin (Marker für muskarinerge M₁ Rezeptoren); S = Subgruppe der schlechteren alten Lerner; TrkA = Nervenwachstumsfaktor Rezeptor mit hoher Affinität.

Trainingstagen (Aubert et al., 1995; Law et al., 2000) oder auch die gesamten Trainingstage (Issa et al., 1990; Hasenöhrl et al., 1997). Hierbei wurde nicht geklärt, ob das Gefälle einer Lernkurve (die Lernrate), der allgemeine Lernlevel oder die asymptotische Performanz in den letzten Trainingstagen den Funktionsstatus eines Tieres am besten beschreibt. Es wird spekuliert, dass das räumliche Relationslernen anfänglich von nicht-räumlichen Faktoren, z.B. von Neuheit, beeinflusst wird. Ebenso muss ein Tier erst lernen, eine natürliche Tendenz, an der Wand des Labyrinths entlang zu schwimmen, zu unterdrücken und in das Innere des Labyrinths zu schwimmen, in dem die Plattform verborgen liegt (Cain, 1998). Allerdings wurde bislang nicht geklärt, wie viele Trainingsdurchgänge oder -tage ein altes Tier benötigt, bis es die nicht-räumlichen Lernprozesse überwunden hat und das räumliche Lernen beginnt. Zudem liegt es nahe, zu vermuten, dass alte, stark beeinträchtigte Tiere eine Plattformposition nicht mehr akquirieren. Es muss hierbei angemerkt werden, dass diese Diskussion nicht nur für Studien relevant ist, die eine Einteilung von besseren und schlechteren Lernern vornehmen, sondern auch für solche, die Korrelationsanalysen durchführen, da im letzteren Fall die Varianz im Lernen ebenfalls für statistische Analysen genutzt wird.

Trotz aller methodischen Verschiedenheiten erzielten die in Tabelle 2 zitierten Studien interessante Resultate. Ähnlich wie in Tabelle 1 korrelierte ein relativ beeinträchtigt Verhalten zumeist mit einem geringeren Maß eines bestimmten Markers, mit Ausnahme von CORT, nNOS und HO-2, Marker, die für eine erhöhte Stress-Aktivität (Issa et al., 1990; Bizon et al., 2001) bzw. Bildung von ROS (Law et al., 2000) stehen. Obwohl Vergleiche zwischen alten, relativ unbeeinträchtigten und adulten Tieren in Tabelle 2 nicht erwähnt werden, wird in der Überzahl der Studien deutlich, dass Unterschiede zwischen diesen Gruppen im Ausmaß bestimmter neurobiologischer Marker existieren, auch wenn Unterschiede im Relationslernen nicht vorhanden waren (Fischer et al., 1989; Gallagher et al., 1990; Issa et al., 1990; Fischer et al., 1991; Aubert et al., 1995; Law et al., 2000; Stemmelin et al., 2000). Möglicherweise deuten solche Unterschiede auf kompensatorische Maßnahmen hin, die dem Schutz von Verhaltensfunktionen dienen oder auf die funktionale Relevanz der Marker für Verhaltensweisen, die nicht gemessen wurden.

1.3 Das Wasserlabyrinth

In den frühen 80er Jahren wurde von Morris ein Test entwickelt, der es erlauben sollte, das Navigationslernen in Ratten zu untersuchen (z.B. Morris, 1984). Zu diesem Zweck wird ein großes (ca. 150 cm im Durchmesser), rundförmiges Labyrinth benutzt, welches mit kaltem Wasser (zwischen 20 - 26 °C) gefüllt wird und eine kleine Plattform (ca. 12 cm im Durchmesser) unter der Wasseroberfläche verbirgt. In der Umgebung des Labyrinths sind deutliche, visuelle Hinweisreize angebracht, die eine räumliche Konfiguration ergeben, in welche die Plattform eingebettet ist. Es wird angenommen, dass Tiere diese Reize zur räumlichen Orientierung nutzen, um die Plattform aufzufinden, denn gesunde Tiere, die im Pool platziert werden, lernen im Laufe mehrerer Trainingsdurchgänge in immer kürzerer Zeit auf direktem Wege von jeder beliebigen Startposition aus zur verborgenen Plattform zu schwimmen und diese zu erklimmen. Das räumliche Wasserlabyrinth wurde schon oft erfolgreich eingesetzt, um neurobiologische Substrate aufzudecken, die dem Navigationslernen unterliegen sowie um Drogen zu testen, die jenes beeinflussen können. Darüber hinaus wurde es auch für die Validierung von Tiermodellen für neurodegenerative Erkrankungen oder das normale Altern genutzt.

1.3.1 Versuchsaufbau

In den Studien variiert der Durchmesser des Wasserlabyrinths zwischen ca. einem bis zu über zwei Metern und wird u.a. von der Größe des Versuchstieres abhängig gemacht (z.B. ist die Apparatur kleiner in Maus- als in Rattenstudien). Untersuchungen zu den Effekten der Labyrinthgröße auf das Verhalten von Rodentien sind nicht vorhanden. Man könnte jedoch erwarten, dass sich das zufallsbedingte Auftreffen auf die Plattform in kleineren Schwimmbecken erhöht.

Die Farbe eines Wasserlabyrinths spielt bei Versuchen insofern eine Rolle, als dass eine Plattform unter der Wasseroberfläche verborgen und für das Tier unsichtbar gemacht werden muss. Dieses wird z.B. erreicht, indem das Labyrinth und die Plattform schwarz gefärbt werden. Je nach Farbe des Versuchstieres kann das Labyrinth jedoch auch weiß gestrichen und das Wasser mit Milchpulver oder weißer Farbe gefärbt werden, so dass sich ein schwarzes Tier auf der Wasseroberfläche abbilden lässt.

Die Wassertemperatur beträgt in den meisten Studien zwischen 20 und 26 °C. Obwohl die Hypothermie das Lernen beeinflussen kann (Panakhova et al., 1984; Rauch et al., 1989) fanden Lindner und Gribkoff (1991) keinen eindeutigen

Zusammenhang zwischen der Körpertemperatur in alten Ratten nach einem Schwimmdurchgang, die im Durchschnitt niedriger war als in jüngeren Tieren, und der Lernfähigkeit im Wasserlabyrinth.

Man geht davon aus, dass eine effektive Performanz der Tiere, auf direktem Weg von jeder Startposition aus zu der im Wasser verborgenen Plattform zu schwimmen, davon abhängig ist, dass visuelle Reize, die sich außerhalb des Labyrinths befinden, zur räumlichen Orientierung benutzt werden. Für diese Hypothese spricht, dass Hinweisreize innerhalb des Labyrinths, die das Tier zur Plattform leiten könnten, nicht vorhanden sind; Duftmarken werden durch das Wasser und Wasserbewegungen maskiert (siehe aber auch Means et al., 1992). Die Plattform selbst liegt unsichtbar unter der Wasseroberfläche verborgen. Die Wand des Labyrinths kann zwar einen Reiz darstellen, von wo aus das Tier in einem bestimmten Schwimmwinkel oder durch Kreisen in einer bestimmten Distanz zur Wand letztendlich zur Plattform gelangen kann, jedoch wird die Performanz weniger effektiv. Morris (1984) konnte zeigen, dass eine totale Verdeckung der visuellen Hinweisreize durch einen Vorhang die Performanz deutlich beeinträchtigte. Dennoch könnten auch nicht-visuelle Hinweisreize, z.B. Geräusche von Ventilatoren oder Gerüche von Ausstattung und Versuchsleitern, der räumlichen Orientierung dienen. Sutherland und Dyck (1984) untersuchten den Einfluss nicht-visueller Hinweisreize auf das Lernen im Wasserlabyrinth und fanden z.B. heraus, dass Ratten, die kurz nach der Geburt erblindeten, zwar mehr Zeit als Kontrolltiere benötigten, um auf die verborgene Plattform zu entkommen, jedoch dennoch eine Lernkurve und eine Platzpräferenz für den vorherigen Plattformquadranten in einem „Probe Trial“ aufwiesen, also von nicht-visuellen Hinweisreizen Gebrauch machen mussten. Bei der Anwesenheit von mindestens zwei distalen auditorischen Signalen konnten blinde sowie Kontrolltiere eine Platzpräferenz erlernen, auch wenn keine visuellen Reize vorhanden waren. In Abwesenheit von auditorischen und visuellen Hinweisreizen verbesserten sich die Tiere zwar in den Schwimmzeiten zur verborgenen Plattform, wiesen jedoch keine Platzpräferenz auf.

1.3.2 Versuchsabläufe

Die Testversion mit verborgener Plattform („Hidden Platform Task“) beinhaltet, dass die Plattform unsichtbar, d.h., unter der Wasseroberfläche verborgen ist und der Ort der Plattform über die Versuchsdurchgänge (z.B. 2-4 Durchgänge pro Tag und für 5-

9 Tage) konstant bleibt. Im Pool platziert hat ein Tier je nach Studie zwischen 60 und 120 Sek. Zeit, um die Plattform aufzufinden. Wenn das Tier die Plattform in diesem Zeitraum nicht auffindet, wird es vom Versuchsleiter zur Plattform geleitet. Nach Erreichen der Plattform verweilt das Tier für eine kurze Zeit auf der Plattform (z.B. 30 oder 60 Sek.). Es wird angenommen, dass sich die Tiere auf der Plattform orientieren, welches dann zum Erlernen der Plattformposition beiträgt (Sutherland und Dyck, 1984). Zwischen den Durchgängen (z.B. 1 Min. ITI) werden die Tiere in einem Haltekäfig aufbewahrt. Über die Trainingsdurchgänge hinweg verkürzt sich die geschwommene Zeit bzw. Distanz zur Plattform.

Beim Umkehrlernen wird die verborgene Plattform nach mehreren Schwimmdurchgängen an einen neuen Ort verschoben. Eine Konsequenz dieser Prozedur ist vermehrtes Schwimmen im vorherigen Plattformquadranten, bis das Umlernen stattgefunden hat. Das Umlernen geht zumeist sehr schnell und es wird davon ausgegangen, dass dieses darauf zurückzuführen ist, dass nicht die räumliche Konfiguration neu gelernt werden muss, sondern nur die neue Plattformposition. Sutherland et al. (1984) bemerkte, dass die Verschiebung der Plattform erneutes Explorationsverhalten (Aufrichtungen) auf der Plattform auslöst.

Im so genannten „Probe Trial“ wird die Plattform nach mehreren Trainingsdurchgängen mit verborgener Plattform entfernt und ein Schwimmdurchgang von 1-2 Min. durchgeführt, um die Platzpräferenz für den vorherigen Plattformquadranten zu messen. In gesunden Tieren kann eine deutliche Platzpräferenz für den vorherigen Plattformquadranten noch bis zu drei Monaten nach dem letzten Trainingsdurchgang nachgewiesen werden (Sutherland und Dyck, 1984). Morris (1984) führte eine Untersuchung zu den Auswirkungen mehrerer „Probe Trials“ auf die Anzahl an „Annulus Crossings“ (Überschwimmen der vorherigen Plattformposition) durch. In dieser Studie wurden drei Gruppen von Tieren verglichen, die entweder drei „Probe Trials“ (4Std., 48 Std. und 336 Std. nach dem letzten Durchgang mit verborgener Plattform), zwei „Probe Trials“ (48 Std. und 336 Std. nach dem letzten Trainingsdurchgang) oder nur einen (336 Std. nach dem letzten Trainingsdurchgang) durchliefen. Obwohl in der ersten Gruppe eine Abnahme in der Platzpräferenz über die Durchgänge hinweg zu erkennen war, wiesen die letzten beiden Gruppen eine geringere Platzpräferenz auf. Morris interpretiert diese Ergebnisse dahingehend, dass das „Vergessen“ über lange

Zeitintervalle stärkere Effekte auf die Platzpräferenz ausübt als der Extinktionsprozess, der durch den Entzug der Plattform induziert wird.

Die Testversion mit sichtbarer Plattformposition wurde entwickelt, um zwischen räumlichen Lerndefiziten und Defiziten, die der allgemeinen Performanz zugeordnet werden, zu unterscheiden. Motivationale oder sensorisch-motorische Defizite (z.B. Sehvermögen, Schwimmfähigkeit oder motorische Koordination) könnten das Erlernen einer verborgenen Plattformposition beeinträchtigen und fälschlicherweise als räumliches Lerndefizit interpretiert werden. Morris (1984) entwickelte daher eine Testversion, bei der die ursprünglich verborgene Plattform aus dem Wasser ragt und hiermit sichtbar gemacht wird („Cued Platform Task“). Alternativ wird die verborgene Plattform mit einem Hinweisreiz versehen. Wenn ein räumliches Lerndefizit beobachtet wird, jedoch kein Defizit im „Cued Platform Task“, wird davon ausgegangen, dass das Defizit im „Hidden Platform Task“ tatsächlich räumlicher Natur ist. Wenn jedoch Defizite in beiden Testversionen auftreten, wird im allgemeinen davon ausgegangen, dass sensorisch-motorische oder andere nicht-räumliche Lern- oder Performanzdefizite die Performanz im „Hidden Platform Task“ beeinträchtigt haben. Lindner et al. (1997) fanden jedoch heraus, dass blinde Ratten Kontrolltieren in der Version mit sichtbarer Plattformposition zwar unterlegen waren, jedoch qualitativ keine profunden Defizite aufwiesen. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Ratten und Mäuse räumliche Informationen zur Bewältigung dieser Aufgabe hinzuziehen (Rapp et al., 1987; Hauben et al., 1999), welches bedeuten könnte, dass Tiere mit räumlichen Defiziten im Test mit sichtbarer Plattformposition benachteiligt sind und ein Vergleich mit Kontrolltieren zu Fehlinterpretationen führen könnte.

1.3.3 Messvariablen

Die gängigsten Variablen zur Messung des räumlichen Lernverhaltens sind die Schwimmzeiten und –distanzen, die benötigt werden, um die verborgene Plattform zu erreichen. In der Testversion mit sichtbarer Plattformposition werden dieselben Variablen erhoben. Der Schwimmwinkel („Heading Angle“) ist hingegen ein Maß, das die Genauigkeit des gelernten Verhaltens misst. Um den Schwimmwinkel zu erfassen, wird eine Tangente zwischen der Start- und der Plattformposition gezogen sowie eine Linie zwischen der Position des Tieres (nach ca. 25 cm geschwommener Distanz nach dem Start) und der Plattform (Sutherland und Dyck, 1984). Der hieraus

resultierende Winkel zeigt an, inwieweit der Schwimmpfad des Tieres von einem direkten Weg zur Plattform abweicht. Das räumliche Lernvermögen kann ebenfalls anhand von Aufenthaltszeiten oder geschwommenen Distanzen, die im Plattformquadranten verbracht werden, gemessen werden (Sutherland und Linggard, 1982; Hoh et al., 2003).

In den so genannten „Probe Trials“, die ohne Plattform durchgeführt werden, werden üblicherweise die Aufenthaltsdauer und die geschwommenen Distanzen gemessen, die ein Tier im dem Quadranten verbringt, in welchem zuvor, d.h. während der Akquisition, die Plattform verborgen war, und mit dem Aufenthalt in den restlichen Quadranten verglichen. Tiere, die die Plattformposition während der Akquisition sicher erlernt haben, verbringen im „Probe Trial“ ca. 50-60 % der geschwommenen Zeit (1-2 Min) im vorherigen Plattformquadranten. Die Arbeitsgruppe von M. Gallagher entwickelte ein eigenes Retentionsmaß basierend auf mehreren „Probe Trials“, die zwischen den Durchgängen mit verborgener Plattform stattfinden, den so genannten Lernindex. Hierfür wird die Distanz zur Plattformposition 10mal pro Sekunde berechnet und über jeweils 30 Sekunden gemittelt. Je größer die Entfernung zur Plattformposition, umso fehlerhafter ist das Schwimm- bzw. Suchverhalten. „Annulus Crossings“ bzw. die Anzahl der Übertritte über die vorherige Plattformposition indiziert wie exakt die Plattformposition erlernt wurde.

1.3.4 Schwimmstrategien

Im Allgemeinen werden drei verschiedene Suchstrategien unterschieden (z.B. Sutherland und Dyck, 1984), die Ratten entsprechend der Testsituation anwenden, um ein Ziel zu erreichen. Bei der „Praxis Strategie“ (auch „Response Strategy“ genannt) wird eine Bewegungssequenz erlernt (rechts, dann links etc.), die nur dann zum Ziel führt, wenn die Relation zwischen Startposition und Ziel in jedem Testdurchgang dieselbe bleibt. Barnes (1980) konnte zeigen, dass alte Ratten diese Strategie öfter anwenden als adulte Tiere und anderen Strategien über bevorzugen, wenn in einem T-Labyrinth zwei verschiedene Strategien zur Auswahl standen, die zum Auffinden einer Belohnung führten. Im Wasserlabyrinth, in der Aufgabe mit verborgener Plattform, bietet sich diese Strategie nicht an, da sich die Startposition mit jedem Schwimmdurchgang verschiebt und die Plattform an einem Ort fixiert bleibt. Bei der „Taxis Strategie“ (auch „Cue Strategy“ genannt) folgt das Tier einem im Labyrinth platzierten Hinweisreiz, der sich in unmittelbarer Nähe des Ziels

befindet, wie es in der Testsituation mit sichtbarer Plattform im Wasserlabyrinth der Fall ist. Hierbei kann das Tier auch ohne die Hinweisreize aus der räumlichen Umgebung zu nutzen von verschiedenen Startpositionen aus direkt zum Ziel gelangen. Nach Sutherland and Dyck (1984) beinhaltet die „Taxis Strategie“ auch das Kreisen im Labyrinth, d.h. das Schwimmen eines nahezu perfekten Kreises in einer bestimmten Distanz zur Wand, welches so kalkuliert ist, dass dieses Schwimmen automatisch zum Auftreffen auf die Plattform führt. In gesunden Tieren kann dieses Verhalten beobachtet werden, wenn die verborgene Plattform nicht fixiert, sondern bei jedem Durchgang verschoben wird. Ist die Plattform fixiert und unsichtbar und von mehreren Hinweisreizen umgeben, bietet sich die „Mapping Strategie“ als effizienteste Methode an, um so schnell wie möglich auf die Plattform zu gelangen. In dieser Situation lernen gesunde Tiere den Ort der Plattform in Relation zu den Reizen sowie die Relationen zwischen den Reizen selbst. Bei der Orientierung an den Reizen kann das Ziel von jeder Startposition aus auf direktem Weg angesteuert werden, ohne dass das Ziel mit einem Hinweisreiz markiert werden muss. Sutherland und Dyck (1984) nehmen an, dass der Aufenthalt auf der verborgenen Plattform nach dem Schwimmdurchgang dazu beiträgt, dass der Ort der Plattformposition gelernt wird, da Tiere dort ein Orientierungsverhalten in Form von Aufrichtungen und Rotationen zeigen, das mit zunehmendem Lernerfolg abnimmt. Morris (1984) bemerkte, dass die Testversion mit verborgener Plattform verschiedene Strategien erfordert, nämlich die Präferenz, an der Wand des Labyrinths entlang zu schwimmen auch Thigmotaxis genannt zu unterdrücken und den Ort der Plattform zu erlernen. Tiere, die den Ort der Plattform nicht erlernen können, weil diese nicht fixiert, sondern von Durchgang zu Durchgang verschoben wird, weisen dennoch eine Lernkurve auf, d.h. ein über die Versuchsdurchgänge hinweg entstehendes Gefälle in den Schwimmzeiten und –distanzen zur Plattform, welches wahrscheinlich einer Reduktion im thigmotaxischen Verhalten zuzuschreiben ist.

1.3.5 Altersbedingte Defizite

Eine Vielzahl an Studien zeigte, dass alte Ratten (ca. 24 Monate alt) im Vergleich zu Adulten (ca. 3 Monate alt) Defizite im Wasserlabyrinthlernen und -gedächtnis aufweisen, d.h. mehr Schwimmzeit und längere Distanzen benötigen, um auf die verborgene Plattform zu entkommen und eine geringere Platzpräferenz im „Probe

Test“ aufweisen (Rapp et al., 1987; Van der Staay und De Jonge, 1993). Obwohl alte Ratten auch sensorisch-motorisch defizient sind, scheinen Dysfunktionen dieser Art nicht mit der Performanz in der räumlichen Testaufgabe zu korrelieren (Gage et al., 1989; Gallagher und Burwell, 1989; Rapp et al., 1987). Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass nicht-kognitive Defizite dennoch zur Minderung des räumlichen Wasserlabyrinthlernens beitragen. Z.B. begünstigt die Zugehörigkeit zu Albino-Rattenstämmen den Alterungsprozess der Retina und somit die visuellen Fähigkeiten. Im Wasserlabyrinthlernen sind Albino-Ratten gegenüber Nicht-Albino Stämmen benachteiligt (Lindner und Schallert, 1988; O’Steen und Brodich, 1985; O’Steen et al., 1987). Ein direkter Zusammenhang zwischen der Sehfähigkeit in alten Albino-Ratten und dem Relationslernen im Wasserlabyrinth konnte jedoch nicht festgestellt werden (O’Steen et al., 1995). Van der Staay und De Jonge (1993) zeigten, dass alte Tiere eine verminderte Schwimmgeschwindigkeit während der Akquisition aufzeigen, dass diese jedoch nicht schwerwiegend genug war, dass sie die Abnahmen im Relationslernen vollständig erklären konnten. Rapp et al. (1987) konnten zeigen, dass alte Tiere im Vergleich zu Adulten mehr Zeit brauchten, um auf eine sichtbare Plattform zu entkommen, wenn diese Aufgabe neu war, d.h. der Aufgabe mit verborgener Plattform vorausging. Das Defizit war allerdings nur im ersten Drittel der Durchgänge zu beobachten und die Autoren spekulieren, dass alte Tiere möglicherweise Defizite im Erlernen nicht-räumlicher Strategien aufweisen und/oder neophobische Reaktionen auf den Hinweisreiz die Akquisition der Aufgabe verlangsamten (Rapp et al., 1987).

1.3.6 Beteiligte Hirnstrukturen

Die Befunde deuten daraufhin, dass die Hippocampus-Formation eine wichtige Rolle beim Erlernen und Speichern von räumlichen Inhalten spielt. O’Keefe und Dostrovsky (1971) konnten feststellen, dass der Gyrus dentatus Zellen enthält, so genannte „Place Cells“, die nur dann feuern, wenn sich das Tier in einer bestimmten Position relativ zu einem räumlichen Kontext befindet. Morris et al. (1982) zeigte, dass Läsionen des Hippocampus in Ratten zu Defiziten in der Akquisition einer Plattformposition im Wasserlabyrinth führten. Die Rolle des Hippocampus im Relationslernen scheint von seinen reziproken Verbindungen mit dem enthorinalen und perirhinalen Cortex abhängig zu sein, da Läsionen dieser Areale die Performanz im Wasserlabyrinth ebenfalls beeinträchtigen (Nagahara et al., 1995; Liu und Bilkey,

1998). Hoh et al. (2003) konnten zeigen, dass Läsionen verschiedener neocortikaler Areale, inklusive des parietalen und präfrontalen Cortex, ebenfalls zu Defiziten in der Akquisition des Wasserlabyrinths führten, allerdings konnten diese Defizite verhindert werden, wenn die Tiere vor den Operationen ein nicht-räumliches Vortraining erhielten, d.h. nur die Strategien lernten, die für das Entkommen auf eine Plattform notwendig sind (z.B. von der Wand weg und in das Innere des Labyrinths zu schwimmen), aber nicht das Erlernen eines Kontextes beinhalten. Dies deutet daraufhin, dass der Neocortex eher eine Rolle beim Erlernen von prozeduralen Schwimmstrategien spielt als bei der Vermittlung von räumlichen Inhalten. Neocortex und Hippocampus werden von cholinergen Zellen des BF innerviert und Läsionen des BF führen ebenfalls zu einer Abnahme im Wasserlabyrinthlernen (Riekkinen Jr. et al., 1990, aber siehe Punkt 1.1). McDonald und White (1995) hypothetisieren, dass das Striatum und die Amygdala ebenfalls zum Platzlernen beitragen, auch wenn diese Areale nicht direkt das räumliche Relationslernen vermitteln. Nach diesen Autoren spielt die Amygdala eine Rolle beim Erlernen von S-S Verbindungen, Verbindungen zwischen den distalen Hinweisreizen im Umfeld (CS), die den Ort einer Belohnung, z.B. der Plattform, anzeigen, und der Belohnung (US) selbst. Diese Assoziation kann ohne einen motorischen Einsatz des Tieres erlernt werden. Das dorsale Striatum hingegen ist für das Erlernen von S-R Verbindungen verantwortlich, d.h. für Assoziationen zwischen den distalen Reizen im Umfeld (S) und der motorischen Reaktion (R) eines Tieres, die unmittelbar zur Belohnung führt und daher ein Teil dessen sind, was gelernt wird.

2 Der Rahmen der empirischen Arbeiten

Die empirischen Arbeiten der Dissertation umfassen vier Projekte, die aus zwei separaten Experimenten entstanden sind. In beiden Experimenten lag das Interesse auf Untersuchungen zum Lernen und Gedächtnis in alten Ratten. In Experiment 1 wurden alte Ratten aufgrund ihrer Performanz im Wasserlabyrinth in bessere und schlechtere Lerner eingeteilt und bezüglich ihres Verhaltens im Wasserlabyrinth und anderen relevanten Tests sowie im Ausmaß relevanter neurobiologischer Parameter verglichen. Die Letzteren wurden von verschiedenen Kooperationspartnern erhoben und werden daher in Projekt I und Projekt II separat behandelt und diskutiert. Projekt III basiert auf Ideen, die in den Projekten I und II entwickelt wurden. In Projekt IV werden Daten zur Extinktion im Wasserlabyrinth behandelt, die in Experiment 2 zusammen mit anderen Daten erhoben wurden.

2.1 Projekt I: Das Lernen im Wasserlabyrinth, die Offenfeldexploration, das inhibitorische Vermeidungslernen und die Kurz- und Langzeitpotenzierung in Hippocampusschnitten bei alten besseren und schlechteren Lernern

In diesem Experiment wurden sieben bessere und sieben schlechtere alte Ratten aufgrund ihrer Lernfähigkeit im Wasserlabyrinth aus einer Stichprobe von 40 Tieren ausgewählt und in Bezug auf ihre Verhaltensleistungen im Wasserlabyrinth, in einem inhibitorischen Vermeidungslerntest und im Offenfeld verglichen und die Zusammenhänge der Verhaltensleistungen in diesen Tests untersucht. Der Annahme entsprechend, dass diesen Tests ähnliche Funktionen zugrunde liegen, erwarteten wir, dass

➤ die Tiere, die eine bessere Performanz im Wasserlabyrinth aufzeigen, auch eine bessere Performanz im inhibitorischen Vermeidungslerntest und mehr Explorationsverhalten im Offenfeld zeigen würden als die schlechteren Wasserlabyrinthlerner.

Mehrere Wochen nach den Verhaltenstests wurden die Gehirne der sieben besseren und sieben schlechteren Lerner entnommen und Hippocampusschnitte von unserem Kollaborationspartner Prof. H.J. Luhmann (Institut für Neurophysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, jetzt Johannes Gutenberg-Universität Mainz)

angefertigt. Die Kurz- (STP) und Langzeitpotenzierung (LTP) wurde dann in der Hippocampusregion CA1 in den jeweiligen Tieren gemessen. Da plastische Prozesse wie LTP schon lange als mögliches Korrelat von Aufmerksamkeits-, Lern- und Gedächtnisprozessen diskutiert werden, erwarteten wir, dass

- die besseren Wasserlabyrinthlerner mehr STP und LTP aufweisen als die schlechteren Lerner und
- die Varianz im Ausmaß an STP und LTP mit der interindividuellen Varianz im Lernen und anderen relevanten Verhalten, wie der Exploration im Offenfeld, die von Erregungs- und Aufmerksamkeitsprozessen determiniert wird und der Informationsaufnahme- und Speicherung dient, korreliert.

Die Ergebnisse dieser Studie sind teilweise im *European Journal of Neuroscience*, Vol. 16, pp. 2175-2185, 2002 publiziert worden.

Zusätzlich zu den oben genannten Verhaltenstests durchliefen die Tiere in Experiment 1 weitere Tests, die in Projekt I, II und III nicht oder jeweils nur teilweise behandelt werden. Es folgt daher eine Zusammenfassung der Testdurchgänge in Experiment 1:

(Gruppe 1)

- Tag 1: Adaptiondurchgang im Wasserlabyrinth
- Tag 2-10: Akquisition im Wasserlabyrinth
- Tag 11: Probe Trial im Wasserlabyrinth
- Tag 12: Test mit sichtbarer Plattformposition im Wasserlabyrinth
- Tag 13: Motorische Koordinationstests
- Tag 19: Offenfeld, erste Testung
- Tag 20: Offenfeld, zweite Testung
- Tag 23: Black/White Box
- Tag 25: Inhibitorischer Vermeidungslerntest
- Tag 26: Inhibitorischer Vermeidungslerntest (Test auf Langzeitretention)

(Gruppe 2)

- Tag 1: Adaptiondurchgang im Wasserlabyrinth
- Tag 2-10: Akquisition im Wasserlabyrinth
- Tag 11: Probe Trial im Wasserlabyrinth
- Tag 12: Test mit sichtbarer Plattformposition im Wasserlabyrinth
- Tag 13: Motorische Koordinationstests

Tag 13:	Offenfeld, erste Testung
Tag 14:	Offenfeld, zweite Testung
Tag 15:	Black/White Box
Tag 16:	Inhibitorischer Vermeidungslerntest
Tag 17:	Inhibitorischer Vermeidungslerntest (Test auf Langzeitretention)

Es wurden insgesamt 40 alte Tiere randomisiert auf zwei Gruppen verteilt und nacheinander getestet. Da sich keine bedeutsamen Verhaltensunterschiede zwischen diesen Gruppen ergaben, wurden diese Tiere für die in Projekt I, II und III aufgeführten Untersuchungen gepoolt.

2.2 Projekt II: Korrelationen zwischen Verhaltensparametern bei alten Ratten und STP und LTP sowie der Genexpression von ChAT und den NMDA-NR2 Untereinheiten im Striatum

In diesem Projekt wurden die sieben besseren und sieben schlechteren Wasserlabyrinthlerner aus Experiment 1 auf die Kurz- und Langzeitpotenzierung und die Cholin Acetyltransferase (ChAT) mRNA sowie die mRNA der NMDA Rezeptor Untereinheiten NR2A, NR2B und NR2C im Striatum untersucht. Diese Variablen wurden ebenfalls am Institut für Neurophysiologie (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) unter der Leitung unseres Kooperationspartners Prof. H.L. Haas zeitgleich zu den unter Projekt I beschriebenen neuronalen Variablen gemessen. Das Striatum scheint ebenso wie der Hippocampus an Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt zu sein, vermittelt jedoch im Gegensatz zum Hippocampus nicht die räumlichen und zeitlichen Relationen zwischen Reizen, sondern eher die Akquisition von Reaktionen auf Reize, die Verstärkung indizieren (siehe Punkt 1.1). Beim Wasserlabyrinthlernen fungiert die Plattform als negativer Verstärker und motiviert das Tier, auf jene zu entkommen (siehe auch Projekt IV). Der Annahme entsprechend, dass plastische Prozesse im Striatum zum Lernen und Gedächtnis im Wasserlabyrinth beitragen, erwarteten wir, dass

- die besseren Wasserlabyrinthlerner ein höheres Ausmaß an STP und LTP im Striatum aufweisen als die schlechteren Lerner und
- STP und LTP im Striatum mit dem Lernen im Wasserlabyrinth und verwandten Verhalten korrelieren.

Zusätzlich zur synaptischen Plastizität hatten wir die Möglichkeit die mRNA von ChAT, dem Synthesenzym von Acetylcholin, und von den NMDA Rezeptor Untereinheiten NR2A, NR2B und NR2C am Institut für Neurophysiologie zu erheben. Im Alter kann sich die Aktivität der cholinergen und glutamatergen Botenstoffsysteme verändern (siehe Punkt 1.1) und beide sind an der Induktion von LTP im Striatum beteiligt. So gingen wir von der Annahme aus, dass

- sich die besseren und schlechteren Wasserlabyrinthlerner in der mRNA von ChAT und den NMDA-NR2 Untereinheiten unterscheiden und
- die mRNA von ChAT und NMDA-NR2 miteinander und mit LTP sowie mit der Lernfähigkeit in den besseren und schlechteren Wasserlabyrinthlernern korrelieren.

Die Ergebnisse aus Projekt II sind teilweise im *European Journal of Neuroscience*, Vol. 19, pp. 1373-1383, 2004 publiziert worden.

2.3 Projekt III: Die „Sliding Window Correlation“ Methode zur Aufdeckung verborgener Korrelationen: Die Existenz von Subgruppen in alten Ratten

Projekt III basiert auf Ideen, die sich aus den Ergebnissen von Projekt I und II ergaben. Z.B. korrelierte das Lernen im Wasserlabyrinth mit der Offenfeldexploration und beide Verhalten mit STP und LTP im Hippocampus und im Striatum, allerdings nur für die Gruppe der alten besseren Lerner. Die Korrelationen waren nicht bedeutsam für die Gruppe der schlechteren Lerner. Dies deutet daraufhin, dass dritte Variablen die untersuchten Zusammenhänge in den schlechteren Lernern beeinflusst haben und die besseren und schlechteren Lerner Subgruppen einer alten Population darstellen, denen unterschiedliche Eigenschaften inhärent sind. In Projekt III wollten wir diesen Überlegungen weiter nachgehen und systematisch nach nicht-monotonen Zusammenhängen in alten Populationen suchen. Hierfür entwickelten wir die Sliding Window Correlation (SWC) Methode. Nach der SWC-Methode werden die Individuen einer Stichprobe den Werten einer Variable zufolge rangiert und diese Werte mit den zugehörigen Datenpunkten einer Co-Variante für aufeinanderfolgende, teilweise überlappende Segmente oder Fenster der Rangordnung korreliert. Die sich aus der SWC-Methode ergebenden Korrelationskoeffizienten werden in einem Koordinatensystem aufgezeichnet. In

Projekt III wurde diese Prozedur für die Variablen Wasserlabyrinthlernen, Offenfeldexploration und Angst, die in einer Black/White Box gemessen wurde, für die Tiere aus Experiment 1 angewendet. Es ergaben sich äußerst überraschende Befunde, die zeigten, dass sich Korrelationen über die Stichprobe hinweg nicht nur in ihrem Grad, sondern auch in ihrer Valenz verändern, d.h. positiv und negativ für verschiedene Segmente der Rangordnung sein können. Ein Teil der Ergebnisse wurde anhand der Tiere aus Experiment 2, einer zweiten Stichprobe, repliziert. Die Ergebnisse aus Projekt III sind teilweise im *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 121, pp. 129-137, 2002 publiziert worden.

2.4 Projekt IV: Die extinktions-induzierte Hoffnungslosigkeit im Wasserlabyrinth und deren neurochemische Korrelate in alten und adulten Ratten

In Projekt IV interessierte uns neben dem Lernen im Wasserlabyrinth auch die Extinktion des zuvor gelernten Verhaltens, die im Wasserlabyrinth und besonders in alten Tieren bislang noch kaum untersucht wurde. Die Extinktion im Wasserlabyrinth wurde induziert, indem der negative Verstärker, die Plattform, nach der Akquisition mit verborgener Plattform dem Labyrinth entnommen und mehrere Schwimmdurchgänge ohne eine Plattform durchgeführt wurden. In diesem Projekt wurden alte mit adulten Ratten verglichen, wobei letztere nicht als Kontrolltiere eingesetzt wurden, sondern Altersunterschiede in der Extinktion aufdecken sollten. Das Ausmaß der Extinktion ist von dem Ausmaß des zuvor gelernten Verhaltens abhängig und so erwarteten wir, dass

➤ adulte Ratten, die im Mittel eine bessere Lernleistung im Wasserlabyrinth aufweisen als alte Ratten, auch eine deutlichere Resistenz aufzeigen, das gelernte Verhalten zu extinguieren.

Die Extinktion wie andere Stressoren aktiviert die HPA-Achse und induziert Verhaltensweisen wie die Ultraschallvokalisierung und Angriffe auf andere Tiere, die sonst in Stresssituationen auftreten. Wir hypothetisierten, dass

➤ die Extinktion depressives Verhalten induziert.

Depressives Verhalten wird gewöhnlich im Forced Swimming Test gemessen, einem mit Wasser gefüllten kleinen Zylinder. Ratten, die in diesem Zylinder platziert werden, sind anfänglich sehr aktiv. Nach erfolglosen Fluchtversuchen tritt jedoch eine Immobilität oder Bewegungslosigkeit ein, die durch die Gabe von Antidepressiva verringert werden kann. Wir nahmen an, dass die Extinktion im Wasserlabyrinth ein depressives Verhalten induziert, das sich aufgrund der Wassersituation in Form von immobilem Verhalten äußert. Da ältere im Vergleich zu jüngeren Populationen von einer höheren Stress-Reaktivität gekennzeichnet sind, erwarteten wir, dass

➤ die alten im Vergleich zu den adulten Tieren während der Extinktion ein höheres Ausmaß an Immobilität aufweisen.

Mehrere Wochen nach den Verhaltenstests wurden die Gehirne der Tiere von unserer Kooperationspartnerin Dr. M.A. de Souza Silva entnommen und neurochemisch mittels HPLC-EC am Institut für Physiologische Psychologie untersucht. Unsere Kooperationspartner vom Institut für Neurophysiologie (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) ermittelten unter der Leitung von Prof. H.L. Haas den Expressionsgrad verschiedener Gene. Projekt IV konzentrierte sich jedoch nur auf neurochemische Analysen des Hippocampus und des ventralen Striatums, also Areale, die mit der Depression in Verbindung stehen. Die aus diesen Regionen gewonnenen Botenstoffkonzentrationen wurden mit der extinktions-induzierten Immobilität für die beiden Altersgruppen ohne eine gerichtete Hypothese korreliert. Die Ergebnisse aus Projekt IV sind teilweise im Journal *Neurobiology of Learning and Memory*, Vol. 82, pp. 128-141, 2004 publiziert worden.

Ähnlich wie in Experiment 1 durchliefen die Tiere in Experiment 2 mehrere Verhaltenstests:

(Gruppe 1)

Tag 1: Offenfeld, erste Testung

Tag 2: Offenfeld, zweite Testung

Tag 3: Offenfeld, dritte Testung und Objekt Exploration

Tag 9: Adaptiondurchgang im Wasserlabyrinth

Tag 11-35: Akquisition im Wasserlabyrinth (eine Testung jeden dritten Tag)

Tag 38-56: Extinktion im Wasserlabyrinth (eine Testung jeden dritten Tag)

- Tag 59-71: Test mit sichtbarer Plattformposition (eine Testung jeden dritten Tag)
- Tag 81: Motorische Koordinationstests
- Tag 85: Black/White Box
- Tag 88: Inhibitorische Vermeidungslerntest
- Tag 89: Inhibitorischer Vermeidungslerntest (Test auf Langzeitretention)

(Gruppe 2)

- Tag 1: Offenfeld, erste Testung
- Tag 2: Offenfeld, zweite Testung
- Tag 3: Offenfeld, dritte Testung und Objekt Exploration
- Tag 7: Adaptiondurchgang im Wasserlabyrinth
- Tag 9-33: Akquisition im Wasserlabyrinth (eine Testung jeden dritten Tag)
- Tag 36-54: Extinktion im Wasserlabyrinth (eine Testung jeden dritten Tag)
- Tag 57-69: Test mit sichtbarer Plattformposition (eine Testung jeden dritten Tag)
- Tag 78: Motorische Koordinationstests
- Tag 83: Black/White Box
- Tag 87: Inhibitorischer Vermeidungslerntest
- Tag 88: Inhibitorischer Vermeidungslerntest (Test auf Langzeitretention)

40 alte und 8 adulte Tiere wurden in zwei Gruppen aufgeteilt und abwechselnd an aufeinanderfolgenden Tagen getestet. Eine Ausnahme waren die Offenfeldtestungen. Da diese in einem 24-Stunden-Rhythmus stattfanden, wurde zuerst Gruppe 1 an drei aufeinanderfolgenden Tagen getestet, gefolgt von Gruppe 2. Für die in Projekt IV aufgeführten Untersuchungen wurden alle Tiere gepoolt.

Bezüglich der Anzahl der Tests, die in Experiment 1 und 2 durchgeführt wurden, ist zu bemerken, dass mögliche Sequenzeffekte oder Interaktionen zwischen den Tests nicht ausgeschlossen werden können. Die Anzahl der Testungen ließ es jedoch nicht zu, die Testsequenz über mehrere Gruppen zu variieren. In den hier aufgeführten Projekten standen Untersuchungen zum Wasserlabyrinthlernen und zur Offenfeldexploration im Mittelpunkt und fanden jeweils zu Anfang der Experimente statt. Obwohl Interaktionen zwischen diesen Tests nicht ausgeschlossen werden können, wird darauf hingewiesen, dass jede Erfahrung eines Tieres (beispielsweise im Heimkäfig oder als Ergebnis des Umgangs mit dem Menschen) zu unerwünschten Interaktionen mit den Erfahrungen im Experiment führen kann. Die Überprüfung der Befunde in Folgestudien ist daher erforderlich.

3 Die Forschungsarbeiten im Einzelnen

3.1 Das Lernen im Wasserlabyrinth, die Offenfeldexploration, das inhibitorische Vermeidungslernen und die Kurz- und Langzeitpotenzierung in Hippocampusschnitten bei alten besseren und schlechteren Lernern

3.1.1 Zusammenfassung

Die *in vitro* Kurz- und Langzeitpotenzierung (STP und LTP) wurde in Hippocampusschnitten in der Region CA1 in 28-30 Monate alten Ratten gemessen. Aufgrund der Performanz im Wasserlabyrinth, in einer Aufgabe mit verborgener Plattform, die 9 Tage andauerte, wurden sieben bessere und sieben schlechtere Lerner aus einer Stichprobe von insgesamt 40 Ratten ausgewählt. Es wurde untersucht, ob die Gruppenunterschiede im Verhalten (d.h. in den Schwimmzeiten zu einer verborgenen Plattform, in den Aufenthaltszeiten im Plattformquadranten und im äußeren Ring des Wasserlabyrinths und in der Kurzzeitretention in einem inhibitorischen Vermeidungslernstest) auf Unterschiede im Expressionsgrad von STP und LTP zurückzuführen waren. Im Gegensatz zu den oben genannten Verhaltensunterschieden ergab sich kein Gruppenunterschied im Explorationsverhalten, d.h. in der Anzahl der Aufrichtungen im Offenfeld. Entgegen unserer Erwartungen waren die besseren und schlechteren Lerner im Ausmaß an STP und LTP nicht voneinander zu unterscheiden. Korrelationsanalysen ergaben jedoch, dass die Varianz in den Schwimmzeiten zur verborgenen Plattform und in den Aufenthaltszeiten im Plattformquadranten die Varianz im Ausmaß an STP und LTP in der Gruppe der besseren Lerner zu einem bedeutsamen Anteil erklären konnte. Ebenfalls in der Gruppe der besseren Lerner korrelierte das Explorationsverhalten im Offenfeld mit STP und LTP sowie mit den Schwimmzeiten zur verborgenen Plattform im Wasserlabyrinth. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass das Ausmaß an STP und LTP, das in der Hippocampus-Region CA1 gemessen wurde, mit den residualen räumlichen Lernfähigkeiten und mit dem Explorationsverhalten, beides bekannte Funktionen des Hippocampus, in den besseren alten Lernern koinzidiert. Die Abwesenheit ähnlicher Korrelationen in der Gruppe der schlechteren Lerner könnte auf die schweren Defizite im Labyrinthlernen

und/oder auf den Einfluss von bisher unbekanntem dritten Variablen auf die Korrelationen zurückzuführen sein.

3.1.2 Einleitung

Defizite im Lernen und Gedächtnis, wie sie bei alten Rodentien, aber auch bei Tieren mit Hippocampusläsionen auftreten, können in Tests, die das räumliche Lernen erfassen, wie dem Wasserlabyrinth, gemessen werden (Morris, 1984). Bei alten im Vergleich zu adulten Tieren ist die Varianz in den Lernleistungen jedoch erheblich und erstreckt sich von relativ unbeeinträchtigt bis hin zu stark beeinträchtigt (Gage et al., 1989; Fischer et al., 1992; Frick et al., 1995; aber vergleiche Lindner, 1997). Es besteht ein großes Interesse daran, den Hintergrund dieser Varianz auch auf neuronaler Ebene zu erkunden, denn Erklärungen könnten zum besseren Verständnis von altersbedingten Veränderungen sowie von Lern- und Gedächtnisprozessen im Allgemeinen beitragen.

Die Langzeitpotenzierung (LTP) wird schon seit langem als mögliches neuronales Substrat für Lern-, Gedächtnis- und verwandte Prozesse diskutiert (McEachern und Shaw, 1996; Shors und Matzel, 1997). Im Vergleich zu jungen Ratten weisen alte Tiere eine veränderte LTP im Gyrus dentatus und der CA1-Region des Hippocampus auf (Barnes und McNaughton, 1985; Deupree et al., 1991; Shankar et al., 1998). Die Zusammenhänge zwischen der Verhaltensvarianz im räumlichen Lernen und der LTP im Hippocampus wurden bei alten Ratten jedoch nur in wenigen Studien untersucht. In zwei Studien korrelierten einzelne Akquisitionsdurchgänge im Barnes' Maze bzw. im Wasserlabyrinth mit dem Expressionsgrad an synaptischer Potenzierung im Gyrus Dentatus (Barnes, 1979; Diana et al., 1994). In einer anderen Studie zeigten alte Ratten, die Lerndefizite aufwiesen (nicht aber Tiere ohne Defizite) im Vergleich zu jungen Kontrolltieren eine veränderte, durch Kalzium induzierte, LTP in der CA1-Region (Diana et al., 1995; Bergado et al., 1997).

Die hier beschriebene Studie verfolgte das Ziel, die Beziehungen zwischen der Performanzvariabilität in alten Ratten und LTP im Hippocampus sowie Kurzzeitpotenzierung (STP) näher zu untersuchen. Bessere und schlechtere Lerner wurden aufgrund von Schwimmlatenzen zu einer verborgenen Plattform im Wasserlabyrinth unterschieden und auf folgende, im Wasserlabyrinth erhobene, Parameter hin verglichen: die Aufenthaltszeit im Plattformquadranten, welche ein Indikator für räumliches Lernen ist und die Aufenthaltszeit in der Peripherie des

Wasserlabyrinths, welche nicht unbedingt ein Maß für räumliches Lernen darstellt. Zusätzlich zu weiteren Parametern, die im Wasserlabyrinth erhoben wurden, wurden die Lernergruppen auch im Hinblick auf das Kurz- und Langzeitgedächtnis in einer inhibitorischen Vermeidungslernaufgabe verglichen. Die Bewältigung dieser Aufgabe scheint ähnlich dem Wasserlabyrinth die Integrität des Hippocampus und anderer Hirnregionen zu erfordern (Bermudez-Rattoni et al., 1991; Frisch et al., 1998; Izquierdo et al., 1998). Wir hypothetisierten, dass die Tiere, die im Vergleich zu anderen das Wasserlabyrinth besser erlernen, auch die inhibitorische Vermeidungslernaufgabe besser bewältigen.

Es wird als wahrscheinlich angesehen, dass der Lernerfolg mit Prozessen, die mit der Aufmerksamkeit und der Exploration verknüpft sind, co-variiert (Berlyne, 1966a, b, 1969; Posner und Petersen, 1990). Daher testeten wir alte Ratten auch in einem Offenfeld und erwarteten, dass die besseren Lerner mehr Explorationsverhalten zeigen als die schlechteren Lerner, welches daraufhin deuten würde, dass die Varianz im Platzlernen mit der Exploration korreliert. Weiterhin hypothetisierten wir, dass die besseren Lerner einen höheren Expressionsgrad an *in vitro* STP und LTP in der Hippocampus-Region CA1 aufweisen als die schlechteren Lerner und dass STP und LTP mit dem Lernen im Wasserlabyrinth sowie verwandten Prozessen, z.B. mit der Offenfeldexploration, korrelieren.

3.1.3 Materialien und Methoden

3.1.3.1 Die Versuchstiere

Das Experiment wurde entsprechend den Vorschriften des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und von der Bezirksregierung in Düsseldorf genehmigt. Insgesamt 40 männliche Wistar Ratten (28-30 Monate alt; Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) wurden aufgrund ihrer Performanz im Wasserlabyrinth rangiert. Die Performanz wurde über die Akquisitionsrates und der gemittelten Zeit, welche zum Erlernen der Aufgabe benötigt wurde, definiert. Von diesen Tieren wurden sieben bessere (528.14 ± 30.99 g; Mittelwert \pm SF) und sieben schlechtere (555.14 ± 23.12 g) Ratten verwendet. Keines dieser Tiere wies offensichtliche physische Beschwerden oder Krankheiten auf. Sie wurden in einem 12:12 Tag/Nacht Zyklus gehalten (Licht an um 07.00 Uhr) und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Tiere waren in Gruppen untergebracht.

3.1.3.2 Das Wasserlabyrinth

Das runde Labyrinth hatte einen Durchmesser von 185 cm und bestand aus schwarzem Polyethylen. Es wurde zu einer Höhe von 30 cm mit 20 ± 1 °C warmem Wasser gefüllt. 1.5 cm unter der Wasseroberfläche war eine aus PVC angefertigte Plattform angebracht, deren Durchmesser 18 cm betrug. Die Plattform befand sich während der Akquisition für jedes Tier an einem von vier verschiedenen Orten im Labyrinth, jeweils in der Mitte eines Quadranten. Zusätzlich wurden vier Startpunkte gewählt, die dem Uhrzeigersinn nach jeweils gleichweit voneinander entfernt waren. Die Tiere wurden täglich einer zufällig ausgewählten Sequenz entsprechend an jedem der vier Startpunkte einmal in das Labyrinth gelassen, wobei die Sequenz für jedes Tier identisch war. Hinweisreize in der Umgebung des Labyrinths, wie z.B. ein Poster, eine Tafel und ein Schrank, dienten zur räumlichen Orientierung. Die Reize wurden von vier 75-W Glühbirnen angestrahlt und hierdurch hervorgehoben. Diffuses Deckenlicht trug ebenfalls zur Beleuchtung des Labyrinths bei und sorgte für eine Helligkeit von ≈ 6.5 Lux auf der Wasseroberfläche. Computerisierte Systeme für die Verhaltensanalyse befanden sich hinter einer Barriere vom Labyrinth entfernt. Eine Kamera war ≈ 2 m über dem Labyrinth platziert.

Mindestens 30 Minuten vor Beginn der Experimente wurden die Ratten in einen Warteraum gebracht und bis kurz vor den Testungen in einem Transportkäfig gehalten. Zu Anfang eines Durchgangs wurden die Tiere einzeln im Labyrinth platziert, wobei sie der Wand des Beckens entgegen blickten. Jedes Tier durchlief einen 2-minütigen Adaptationsversuch in Abwesenheit einer Plattform, so dass es sich an die Wassersituation gewöhnen konnte und die allgemeine Schwimmfähigkeit überprüft werden konnte. Am nächsten Tag begann das 9 Tage dauernde Training mit verborgener Plattform („Hidden Platform Task“). In dieser Phase hatten die Tiere die Möglichkeit, den Ort der Plattformposition zu erlernen und auf die Plattform zu entkommen. Pro Tag wurden 4 Trainingsdurchgänge durchgeführt. Ein Trainingsdurchgang war dann beendet, wenn das Tier die Plattform erklimmt hatte oder 2 Minuten verstrichen waren. Nach Ablauf des 2-Minutenintervalls wurde die Ratte vom Versuchsleiter zur Plattform geleitet. Das Tier verweilte dann 30 Sekunden auf der Plattform. Hiernach wurde das Tier für 60 Sekunden in einem Transportkäfig gehalten und anschließend der nächste Durchgang gestartet. Nach dem letzten Durchgang wurden die Ratten mit Papiertüchern abgetupft und durch die Wärme von zwei 75-W Glühbirnen getrocknet. Einen Tag nach dem letzten

Trainingsdurchgang durchliefen die Tiere einen 2-minütigen Extinktionsdurchgang, bei dem die Plattform nicht mehr vorhanden war und die Präferenz für den vorherigen Plattformquadranten erfasst wurde („Probe Trial“). Die Startpunkte für diesen Versuch lagen der vorherigen Plattformposition gegenüber. Am darauffolgenden Tag wurde ein Hinweisreiz an der verborgenen Plattform angebracht und somit die Plattformposition sichtbar gemacht („Cued Version“). Den Hinweisreiz bildete ein Stab aus Holz, der eine Höhe von 25 cm und einen Durchmesser von 2 cm aufwies, schwarz-weiß gestreift war und mit einem Baumwollband an der verborgenen Plattform befestigt wurde. Die Plattform mit Hinweisreiz wurde so positioniert, dass sie der ursprünglichen (verborgenen) Plattformposition gegenüber lag. Es wurden 4 Durchgänge in gleicher Weise wie zuvor, d.h. als die Plattform verborgen war, durchgeführt. Der Test mit sichtbarer Plattformposition wurde durchgeführt, um sensorisch-motorische Defizite zu erfassen (Morris, 1984). Alle Versuchsdurchgänge wurden auf Video aufgezeichnet und mit ETHOVISION software (Noldus, Wageningen, Niederlande) analysiert. Die Versuche fanden zwischen 9.00 und 17.00 Uhr statt.

Für jeden Trainingsdurchgang wurden die Schwimmzeiten und –distanzen bis zum Erreichen der verborgenen Plattform gemessen. Diese Variablen korrelierten für jeden Trainingstag (alle P -Werte ≤ 0.000003). Aus diesem Grund wurden nur die Schwimmzeiten als Index für die Lernleistung berücksichtigt. Die Schwimmzeiten wurden über alle vier Versuchsdurchgänge pro Tag gemittelt und diese wiederum über alle neun Trainingstage hinweg. Hieraus ergab sich ein Gesamtwert für jedes Tier, die „mittlere Gesamtschwimmzeit“ zur verborgenen Plattform. Diesem Index und den Lernraten nach wurden die Tiere von der besseren bis hin zur schlechteren Performanz rangiert. Hiernach wurden die sieben besseren und sieben schlechteren Tiere für die gegenwärtige Studie ausgewählt. Während der 9 Trainingstage wurden darüber hinaus andere Variablen erhoben, z.B. die Aufenthaltszeiten im Plattformquadranten und im äußeren Ring des Schwimmbeckens. Für die statistische Analyse wurden die Aufenthaltszeiten im Plattformquadranten und im äußeren Ring als Prozente des Aufenthalts in den Quadranten bzw. Ringen vor dem Erreichen der verborgenen Plattform dargestellt. Der Aufenthalt im äußeren Ring wurde erfasst, indem das Labyrinth in drei imaginäre Ringe unterteilt wurde, einem äußeren, einem mittleren und einem inneren Ring. Gemessen vom Mittelpunkt zur Wand des Schwimmbeckens waren die Ringe jeweils gleichweit voneinander

entfernt. Die Breite des äußeren Rings betrug 30.83 cm. Der Extinktionsdurchgang ohne Plattform wurde zum einen in Hinblick auf die Aufenthaltszeiten im vorherigen Plattformquadranten sowohl für die gesamten 2 Minuten des Durchgangs als auch separat für die erste und zweite Minute analysiert. Zum anderen wurde die Schwimmgeschwindigkeit (geschwommene Distanz in cm/120 Sekunden) erfasst. Bei der Aufgabe mit sichtbarer Plattformposition wurden die Schwimmzeiten zur Plattform mit Hinweisreiz gemessen und ein Mittelwert für alle für vier Durchläufe berechnet sowie jeweils einer für die ersten und letzten beiden Durchgänge.

3.1.3.3 Das Offenfeld

Das Offenfeld bestand aus dunkelgrauem Plexiglas, hatte einen 60 x 60 cm breiten Boden, 39 cm hohe Wände und war nach oben hin offen. Während der Experimente war die Arena dunkel beleuchtet. Eine Videokamera wurde ca. 1 m über dem Zentrum des Feldes installiert. Ein Weitspektrumrauschgenerator erzeugte ein Rauschen von 60 dB.

Die Offenfeldversuche begannen ca. 4 Tage nach dem Wasserlabyrinthexperiment. Die Tiere wurden einzeln im Zentrum des Offenfeldes platziert, wobei der Kopf immer einer der Wände entgegen gerichtet war. Es wurde jeweils eine Testung an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt, die jeweils 10 Minuten andauerte. Die Experimente fanden zwischen 20:00 und 01:00 Uhr, d.h. während der aktiven Nachtphase der Tiere in abgedunkelten Räumen statt. Die Tiere wurden in dieser Zeit getestet, damit der altersbedingten Verhaltensabnahme (Willig et al., 1987) entgegengewirkt werden konnte.

Die Anzahl der Aufrichtungen wurde für jeden Testtag separat gezählt. Eine Aufrichtung war gegeben, wenn beide Vorderpfoten vom Boden gelöst und in die Luft oder an eine Wand gerichtet waren.

3.1.3.4 Der inhibitorische Vermeidungslerntest

Für den Versuch wurde eine rechteckige Box (43 x 23 x 24 cm) verwandt, die aus zwei Abteilen, die entweder aus schwarzem oder weißem Plexiglas gefertigt waren und durch eine schwarze Guillotinetür voneinander getrennt waren, bestand. Den Boden des schwarzen Abteils bildeten rostfreie Eisenstäbe, die einen Durchmesser von je 3.5 mm besaßen und 1.1 cm auseinander lagen. Durch diese Eisenstäbe wurde ein intermittierender Elektrofußschock (Coulbourn Instruments, Allentown, PN, USA) appliziert. Das weiße Abteil (23 x 23 x 24 cm) wurde durch eine 25 W starke Glühbirne beleuchtet, welche ca. 50 cm über dem Boden positioniert war. Das

schwarze Abteil (20 x 23 x 24 cm) wurde durch einen Klappdeckel vor Lichteinfall geschützt. Ein Weitspektrumrauschgenerator gewährleistete ein maskierendes Geräusch.

Die Testungen fanden zwischen 9.00 und 17.00 Uhr und 5-13 Tage nach dem Wasserlabyrinthexperiment statt. Zwei Baselinedurchgänge wurden von einem Trainingsdurchgang und zwei darauffolgenden Retentionsdurchgängen gefolgt. Bei jedem Durchgang wurde das Tier dem Transportkäfig entnommen und im weißen Abteil platziert, wobei die Blickrichtung jeweils entgegengesetzt zur Guillotinetür war. Es wurden 5 s zur Akklimatisierung gegeben, bevor die Tür hochgeschoben wurde und dem Tier somit der Eintritt in das Schwarze Abteil gewährt wurde. Dem Tier wurden hierfür maximal 5 min eingeräumt. Im Anschluß daran wurde die Tür heruntergelassen und das Tier zurück in den Heimkäfig gebracht. Die Heimkäfige befanden sich in einem nahegelegenen Raum neben dem Versuchslabor. Der zweite Baselinedurchgang folgte dem ersten nach 30 min. Weitere 30 min später folgte der Trainingsversuch, der sich von den vorherigen Durchgängen nur darin unterschied, dass kurz nach dem Eintritt des Tieres in das schwarze Abteil ein 1 Sek. andauernder Fußschock mit einer Stärke von ca. 0.85 mA appliziert wurde. Jeweils 90 min und 24 Std. nach dem Trainingsdurchgang wurden die Retentionstests durchgeführt. Die Art der Durchführung war dieselbe wie jene während der Baselinetestungen. Es wurden keine Fußschocks appliziert.

Für jeden Versuchsdurchgang wurde die Zeitspanne bis zum Eintritt des Tieres in das schwarze Abteil gemessen. Ein Eintritt wurde als solcher gewertet, wenn sich alle vier Pfoten auf dem Boden des schwarzen Abteils befanden.

3.1.3.5 *In vitro* elektrophysiologische Untersuchungen

Die elektrophysiologischen Untersuchungen fanden ca. 3 Wochen nach dem Wasserlabyrinthexperiment statt. Hierbei wurde die hippocampale Aktivität in der Region CA1 im Gewebeschnitt *in vitro* gemessen. Den Versuchsleitern war kein Einblick in die vorhergehenden Verhaltensanalysen erlaubt. Die Sequenz der Experimente wurde zufällig ausgewählt, um mögliche Reihenfolgeeffekte zu verhindern. Die Tiere wurden durch Enfluran (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) in eine tiefe Anästhesie versetzt, mit einer kleinen Tierguillotine dekapitiert, die Gehirne schnell entnommen und für 1-2 min in eiskalter artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF), die aus 124 NaCl, 3.7 KCl, 1.3 MgSO₄, 1.24 NaH₂PO₄, 2.0 CaCl₂, 25.6 NaHCO₃ und 10 Glukose (pH von 7.4 unter einer Sättigung von 95% O₂/5% CO₂) in

mm bestand, aufbewahrt. Der Gewebekblock wurde auf die Schneideplattform eines Campden Vibratoms geklebt und in sauerstoffangereicherterem eiskaltem ACSF eingetaucht. Hippocampales Gewebe wurde kaudal von Bregma (zwischen -3.0 und -4.3 mm) entnommen und in coronale $400\ \mu\text{m}$ dicke Scheiben geschnitten (Paxinos und Watson, 1986). Die Schnitte ruhten für mindestens 1 Std., bevor die Messungen in einer *in vitro* Meßkammer bei $32-34\ ^\circ\text{C}$ begannen. Extrazelluläre Feldpotentiale wurden mit ACSF gefüllten Glassmikroelektroden ($3-5\ \text{M}\Omega$) gemessen, die im Stratum radiatum der Region CA1 platziert wurden. Die Schaffer-Kollateralfasern wurden mit einer bipolaren Stimulationselektrode aktiviert. Nach Stabilisierung der Feldpotentiale wurde die Stimulusintensität jenes Thresholds ($= 1T$, $1.5-5\ \text{V}$) bestimmt, welcher eine minimale orthodromische synaptische Antwort auslöste. Eine input-output Kurve wurde ermittelt, indem eine immer höhere Stimulusintensität bis zu einer maximalen Intensität von $5T$ appliziert wurde. Für jede Stimulusintensität wurde ein Mittelwert von 5-10 Antworten berechnet, um die input-output Kurve zu konstruieren. Die Stimulusintensität wurde so angepasst, dass sie eine orthodromische synaptische Antwort auslöste, die zwischen einer Amplitude von 50 bis 60 % der maximalen Antwort eines Feldpotenzials lag. Eine Baseline wurde erhoben, indem einzelne synaptische Antworten über eine Dauer von 20 min gemessen wurden, wobei die Interstimulusintervalle jeweils 30 s betragen. Gewebeschnitte, die un stabile Baselineamplituden oder Feldpotenziale $<0,5\ \text{mV}$ aufwiesen, wurden verworfen. Afferenzen zum CA1 wurden tetanisiert, indem vier 0.5 Sekunden dauernde Impulsgruppen bei einer Frequenz von $200\ \text{Hz}$ im Abstand von 5 Sekunden appliziert wurden (Shankar et al., 1998). Nach Gabe des Tetanus wurden alle 20 Sek. einzelne Antworten über eine Dauer von 60 min ausgelöst. Die Signale wurden bei $6-10\ \text{kHz}$ ausgewählt, bei $3\ \text{kHz}$ Tiefpass gefiltert und aufgenommen, gespeichert und off-line mit einer Software analysiert (PCLAMP7, Axon Instruments, CA, USA oder TIDA, Heka Elektronik, Lambrecht, Deutschland). Im CA1 wurde die Steilheit („peak slope“) der anfänglichen Abwärtsphase des exzitatorischen postsynaptischen Feldpotentials (fEPSP) gemessen. Alle Daten wurden in Abhängigkeit von der durchschnittlichen Steilheit und dem Scheitelpunkt der fEPSPs während der 20 minütigen Baseline vor Gabe des Tetanus normalisiert. Die Expressionsgrade von STP bzw. LTP wurden von den Datenpunkten erhoben, die $10-15$ Min. bzw. $55-60$ Min. nach dem Tetanus gemessen wurden.

3.1.3.6 Statistische Analysen

Die durchschnittlichen Schwimmzeiten zur Plattform sowie die durchschnittlichen Aufenthaltszeiten (in %) im Plattformquadranten und im äußeren Ring des Labyrinths wurden pro Trainingstag erhoben. Für die statistische Analyse wurden für jede der Variablen die Werte der einzelnen Trainingstage gemittelt, so dass ein Gesamtwert für jedes Tier erhoben werden konnte ($n = 14$).

Für Gruppenvergleiche wurden Mann-Whitney oder ANOVA Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt. Parametrische Tests wurden angewandt, wenn die Annahmen der normalen Stichprobenverteilung und der Homogenität erfüllt wurden.

Es wurden ebenso Korrelationsanalysen nach Spearman oder Pearson durchgeführt, um die Zusammenhänge zwischen den Variablen zu überprüfen. Welcher der beiden Tests angewandt wurde, basierte auf denselben Annahmen wie oben erwähnt. Die Korrelationsanalysen wurden für die besseren und schlechteren Lerner getrennt als auch für beide Gruppen zusammen durchgeführt.

Aufgrund der großen Anzahl der Analysen werden die nachfolgenden P -Werte nur als ein Effektmaß dargestellt.

3.1.4 Ergebnisse

3.1.4.1 Das Wasserlabyrinth

Schwimmzeit zur verborgenen Plattform. Wie erwartet, unterschieden sich die besseren und schlechteren Lerner hinsichtlich der durchschnittlichen Gesamtschwimmzeiten zur verborgenen Plattform [$F(1, 12) = 51.69$, $P = 0.000005$, einseitig]. Der Mittelwert (\pm SF) für die besseren Lerner betrug 47.57 ± 3.58 Sek. und für die schlechteren Lerner 82.06 ± 3.19 Sek. Die Lernkurven sind in Abb. 1A dargestellt.

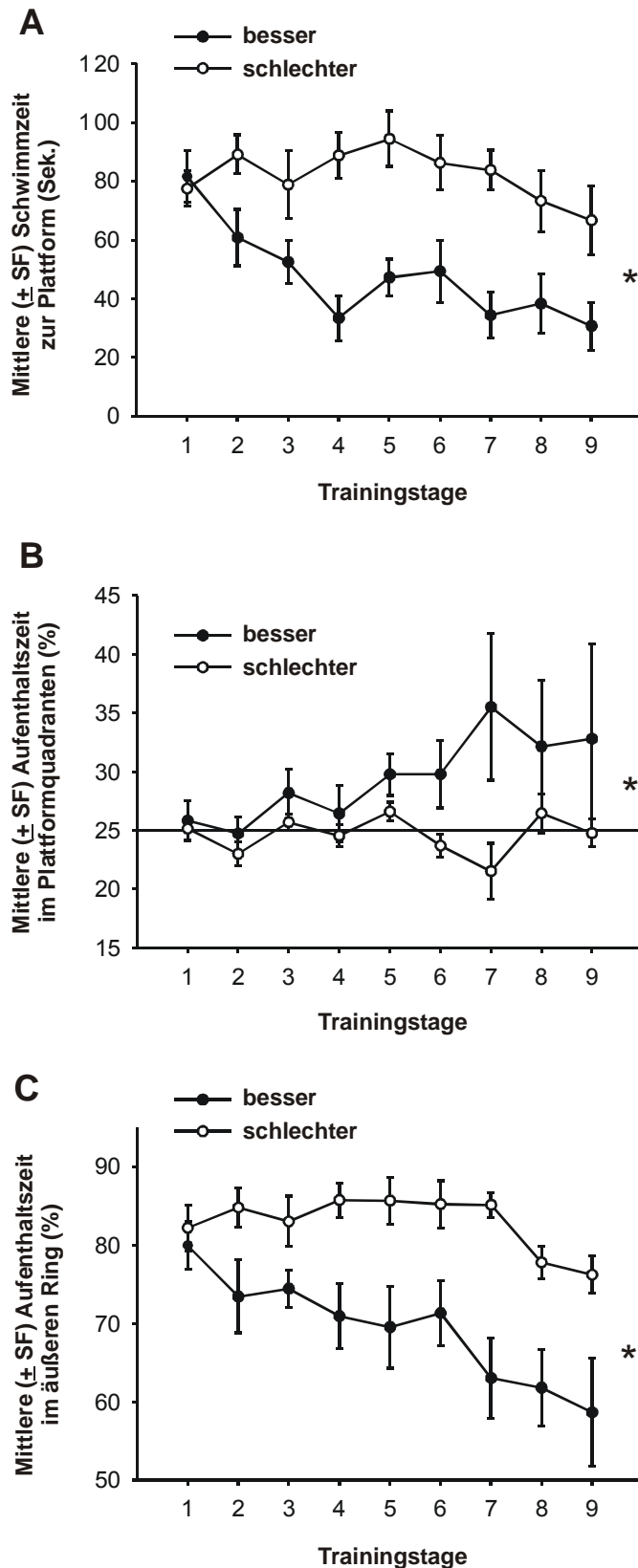


Abb. 1. Lernen im Wasserlabyrinth. (A) Mittlere (\pm SF) Schwimmzeit zur verborgenen Plattform über vier Durchgänge pro Tag, aufgezeigt für 9 Trainingstage. Die Lernkurven für diese Variable sind für die besseren ($n = 7$) und schlechteren ($n = 7$) Lerner separat aufgeführt. Die Gruppen unterschieden sich hinsichtlich der Gesamtperformanz (d.h. im Durchschnittswert über alle neun mittleren Schwimmzeiten pro Tag) ($*P < 0.05$). (B) Mittlere (\pm SF) Aufenthaltszeit im Plattformquadranten (% der Schwimmdauer zur verborgenen Plattform) über vier Durchgänge pro Tag, aufgezeigt für neun Trainingstage. Die Lernkurven sind für die besseren ($n = 7$) und schlechteren ($n = 7$) Lerner separat aufgeführt. Die mittleren Aufenthaltszeiten (%) wurden an die Performanz am ersten Tag (Baseline = 100%) angepasst und gemittelt. Die besseren Lerner wiesen eine höhere Platzpräferenz an den Trainingstagen 5-9, 6-9 und 7-9 auf als die schlechteren Lerner ($*P < 0.05$). (C) Mittlere (\pm SF) Aufenthaltszeiten im äußeren Ring des Labyrinths (% der Schwimmdauer zur verborgenen Plattform) über vier Durchgänge pro Tag, aufgezeigt für neun Trainingstage. Die Abnahme der Aufenthaltszeiten über die Trainingstage hinweg sind separat für die besseren ($n = 7$) und schlechteren ($n = 7$) Lerner aufgeführt. Die Gruppen unterschieden sich hinsichtlich der Gesamtperformanz (d.h. im Durchschnittswert über alle neun mittleren Aufenthaltszeiten pro Tag) ($*P < 0.05$).

Aufenthaltszeit im Plattformquadranten. Die besseren und schlechteren Lerner wurden auch bezüglich der durchschnittlichen Prozentwerte, die sie während der Akquisitionsphase im Plattformquadranten schwammen, verglichen. Die Lernkurven der jeweiligen Gruppen für dieses Verhaltensmaß sind in Abb. 1B aufgezeigt. Die sieben besseren und sieben schlechteren Lerner unterschieden sich nicht im mittleren Gesamtaufenthalt im Plattformquadranten, d.h. während der 9 Trainingstage ($P = 0.57$). Um die offensichtliche Platzpräferenz der besseren Lerner während der letzten 5 Trainingstage genauer zu untersuchen, wurden die mittleren Prozentwerte der einzelnen Trainingstage 5, 6, 7, 8 und 9 zuerst den Baselinewerten an Tag 1 (100%) angepasst und dann gemittelt. Die Ergebnisse zeigten, dass die besseren Lerner während der Trainingstage 5-9 ($\text{Median}_{\text{bessere}} = 116.44\%$, $\text{Interquartilbereich}_{\text{bessere}} = 11.89$; $\text{Median}_{\text{schlechtere}} = 100.03\%$, $\text{Interquartilbereich}_{\text{schlechtere}} = 9.14$; $P = 0.04$), 6-9 ($\text{Median}_{\text{bessere}} = 112.99\%$, $\text{Interquartilbereich}_{\text{bessere}} = 13.68$; $\text{Median}_{\text{schlechtere}} = 100.23\%$, $\text{Interquartilbereich}_{\text{schlechtere}} = 11.11$; $P = 0.03$) und 7-9 ($\text{Median}_{\text{bessere}} = 110.07\%$, $\text{Interquartilbereich}_{\text{bessere}} = 19.51$; $\text{Median}_{\text{schlechtere}} = 103.29\%$, $\text{Interquartilbereich}_{\text{schlechtere}} = 12.51$; $P = 0.04$) mehr Zeit im Plattformquadranten verbrachten als die schlechteren Lerner.

Aufenthaltszeiten im äußeren Ring. Die sieben besseren und sieben schlechteren Lerner wurden auch bezüglich der mittleren Gesamtaufenthaltszeiten (%) während des Trainings in der Peripherie des Labyrinths verglichen. Die besseren Lerner ($72.57 \pm 2.21\%$) verbrachten weniger Zeit in der Peripherie als die schlechten Lerner ($83.02 \pm 1.81\%$; $F(1,12) = 13.38$, $P = 0.003$). Die Lernkurven der beiden Gruppen für dieses Maß sind in Abb. 1C aufgeführt.

Probe Trial. Das Gedächtnis für den Ort des vorherigen Plattformquadranten wurde in einem Extinktionsdurchgang ohne Plattform gemessen. Die besseren und schlechteren Lernergruppen unterschieden sich allerdings nicht in der Zeit, die sie während des 2-minütigen Durchgangs in diesem Quadranten schwammen ($P = 0.75$) (Abb. 2A). Ebenso ergaben sich keine Gruppenunterschiede bei separater Untersuchung der ersten [$F(1,12) = 2.08$, $P = 0.18$] und zweiten Minute [$F(1,12) = 1.16$, $P = 0.30$] des Durchgangs. Die Lernergruppen unterschieden sich auch nicht im Hinblick auf die Schwimmgeschwindigkeit während des Durchgangs [$F(1,12) = 1.22$, $P = 0.29$] (Abb. 2B).

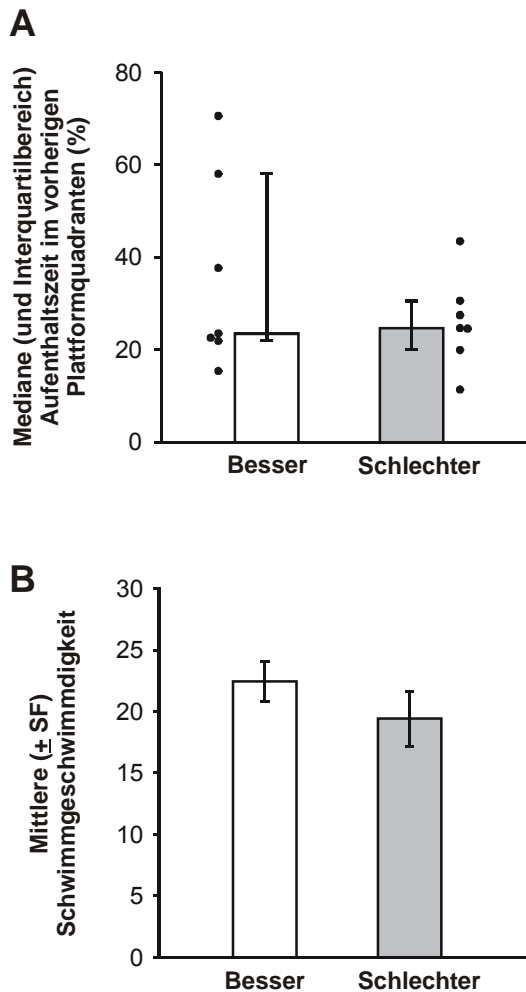


Abb. 2. Performanz während des Extinktionsdurchgangs. (A) Mediane Aufenthaltszeiten (%) und Interquartilbereiche im vorherigen Plattformquadranten (mit verborgener Plattform) während eines 2-minütigen Durchgangs ohne Plattform. Die Mediane sind für die Gruppen der besseren ($n = 7$) und der schlechteren ($n = 7$) Lerner aufgeführt. Die Datenpunkte sind auch für jedes Tier einzeln aufgezeigt. (B) Mittlere (\pm SF) Schwimgeschwindigkeiten [geschwommene Distanz in cm/geschwommene Zeit (120 Sek.)] der besseren ($n = 7$) und schlechteren ($n = 7$) Lernergruppe während des 2-minütigen Durchgangs.

Test mit sichtbarer Plattformposition. Die besseren und schlechteren Lerner wurden dann ebenfalls im Hinblick auf die durchschnittlichen Schwimmzeiten zur signalisierten Plattform verglichen. Die besseren Lerner ($45.23 \text{ s} \pm 8.25 \text{ SF}$) unterschieden sich hierbei nicht von den schlechteren ($70.01 \text{ s} \pm 10.06 \text{ SF}$) in Bezug auf die mittleren Schwimmzeiten für die vier Durchgänge [$F(1,12) = 3.63$, $P = 0.08$]. Die mittleren Schwimmzeiten zur Plattform wurden auch für die ersten beiden und die beiden weiteren Durchgänge separat analysiert (Abb. 3). Die Gruppen unterschieden sich nicht in den ersten beiden Durchgängen [$F(1,12) = 1.05$, $P = 0.33$]. In den letzten beiden Durchgängen jedoch brauchten die besseren Lerner weniger Zeit, um die Plattform zu erreichen als die schlechteren Lerner [$F(1,12) = 5.08$, $P = 0.04$]. Keine der genannten Fluchtlatenzen, d.h., für alle vier, die ersten und letzten beiden Durchgänge, korrelierte mit den restlichen Variablen, die für den Wasserlabyrinthversuch erhoben wurden (alle P -Werte > 0.05); die Korrelationen wurden jeweils für die besseren und schlechteren Lerner separat, aber auch für alle

Tiere der beiden Gruppen zusammen durchgeführt. Die Lernergruppen wurden ebenfalls hinsichtlich der Aufenthaltszeiten verglichen, die diese im vorherigen Plattformquadranten (während des Platzlernens mit verborgener Plattform) und im aktuellen Plattformquadranten (mit sichtbarer Plattformposition) verbrachten. Es ergab sich für keinen der vier Durchgänge ein Gruppenunterschied (alle P -Werte > 0.1).

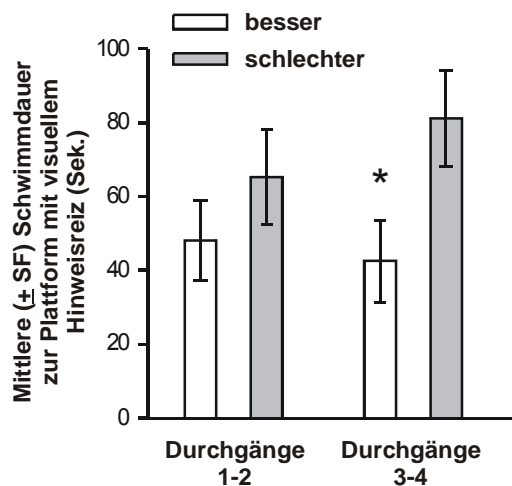


Abb. 3. Test mit sichtbarer Plattformposition. Mittlere (\pm SF) Schwimmdauer zur Plattform mit visuellem Hinweisreiz während der ersten beiden und beiden weiteren Durchgänge. Die Mittelwerte sind jeweils für die Gruppe der besser- und schlechterlernenden Tiere aufgezeigt. In diesem Experiment folgten vier Versuchsdurchgänge aufeinander, die Plattform befand sich immer am gleichen Ort, gegenüber der vorherigen Plattformposition (mit verborgener Plattform). * $P < 0.05$ zwischen den Gruppen.

3.1.4.2 Der inhibitorische Vermeidungslerntest

Die medianen Zeiten, die die Gruppen für den Wechsel vom weißen in das schwarze Abteil in Anspruch nahmen, sind für den Trainingsdurchgang (Baseline) und die Retentionsdurchgänge 90 min und 24 Std. nach dem Trainingsdurchgang in Abb. 4A aufgeführt. Ein Vergleich der Eintrittslatenzen der beiden Gruppen (% Baseline = 100%) zeigte, dass die besseren Lerner 90 min nach dem Trainingsdurchgang das schwarze Abteil später betraten als die schlechteren Lerner ($P = 0.003$, einseitig) (Abb. 4B). D.h., die kurzzeitige Erinnerung daran, dass der Fußschock in diesem Abteil stattgefunden hat, war deutlicher in der Gruppe der besseren Lerner. Die Gruppen unterschieden sich nicht im Erinnerungsvermögen, wenn dieses 24 Std. nach dem Training getestet wurde ($P = 0.07$, einseitig). Ebenso ergab sich kein Unterschied im Baselineverhalten ($P = 0.28$).

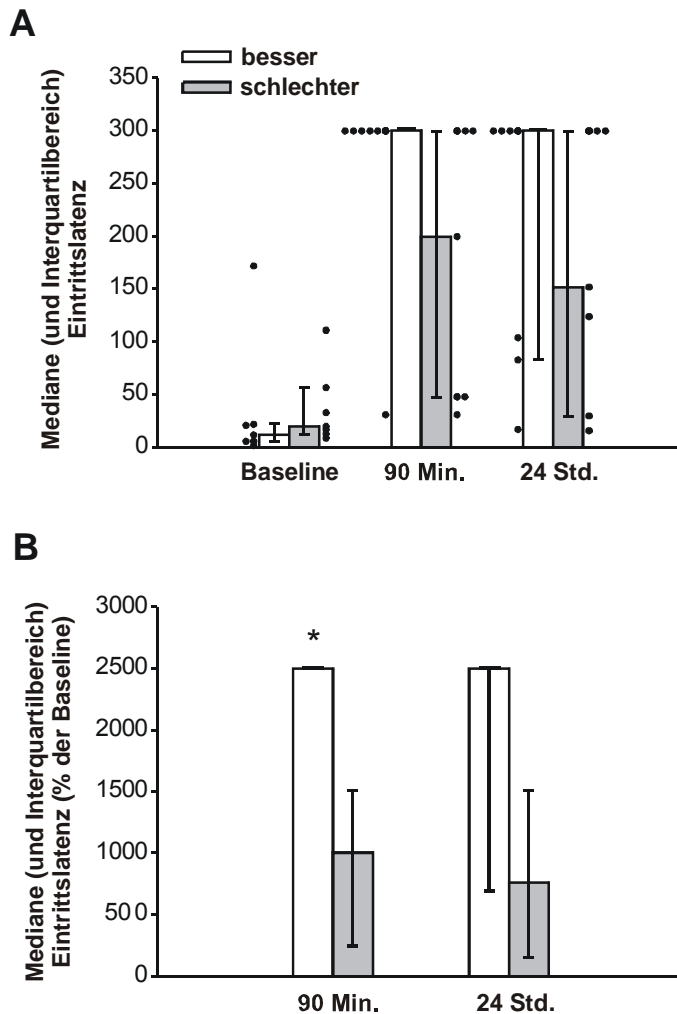


Abb. 4. Inhibitorisches Vermeidungslernen. (A) Mediane Eintrittslatenzen und Interquartilbereiche vom weißen in das schwarze Abteil während des Baselinedurchgangs mit Fußschock und 90 Min. bzw. 24 Std. nach dem Schock. Die Mediane sind jeweils für die Gruppen der besseren ($n = 7$) und schlechteren ($n = 7$) Lerner aufgeführt. Die Datenpunkte sind ebenfalls für jedes Tier einzeln dargestellt. (B) Die sieben besseren und sieben schlechteren Lerner wurden hinsichtlich der medianen Eintrittslatenzen, die der Performanz während des Baselinedurchgangs (= 100%) angeglichen wurden, 90 Min. und 24 Std. nach dem Fußschock verglichen. * $P < 0.05$ zwischen den Gruppen.

3.1.4.3 Das Offenfeld

Die durchschnittliche Anzahl (\pm SF) der Aufrichtungen im Offenfeld betrug bei den besseren Lernern 13.86 ± 4.03 an Tag 1 und 12.00 ± 3.11 an Tag 2, und 18.14 ± 6.35 sowie 15.43 ± 4.76 bei den schlechteren Lernern. Die Gruppen unterschieden sich nicht in der jeweiligen Anzahl der Aufrichtungen an Tag 1 [$F(1,12) = 0.32$, $P = 0.29$, einseitig] oder Tag 2 [$F(1,12) = 0.36$, $P = 0.28$, einseitig].

3.1.4.4 Korrelationen zwischen dem Lernen im Wasserlabyrinth und der Offenfeldexploration

Es wurden auch Korrelationsanalysen zwischen den gewonnenen Variablen im Wasserlabyrinth und Offenfeld durchgeführt. Für die Gruppe der besseren Lerner, korrelierte die Anzahl der Aufrichtungen im Offenfeld an Tag 1 (Pearson $r = -0.84$, $P = 0.02$) und an Tag 2 (Pearson $r = -0.85$, $P = 0.02$) mit den mittleren

Gesamtschwimmzeiten zur verborgenen Plattform. Demnach gingen für diese Gruppe mehr Aufrichtungen im Offenfeld mit einem schnelleren Entkommen auf die Plattform im Wasserlabyrinth einher. Der Korrelationskoeffizient für die schlechteren Lerner betrug $r = -0.2$ ($P = 0.67$; Pearson) an Tag 1 und $r = -0.11$ ($P = 0.82$; Pearson) an Tag 2. Für beide Gruppen zusammen betrug der Korrelationskoeffizient $r = -0.05$ ($P = 0.88$; Pearson) an Tag 1 und $r = -0.02$ ($P = 0.95$; Pearson) an Tag 2. Weiterhin korrelierte die Anzahl der Aufrichtungen in den besseren Lernern mit der Platzpräferenz während der letzten drei Trainingstage im Wasserlabyrinth, d.h. den Anstieg (% Baseline) der Aufenthaltszeiten im Plattformquadranten während der Akquisitionstage 7-9 (Spearman $r = 0.75$, $P = 0.05$). Die restlichen Korrelationen zwischen den erhobenen Variablen im Offenfeld und im Wasserlabyrinth einschließlich des Extinktionsdurchgangs ergaben für die jeweilige Gruppe, aber auch für beide Gruppen zusammen, hohe P -Werte (alle P -Werte > 0.05).

3.1.4.5 *In vitro* elektrophysiologische Untersuchungen

Baseline-Messungen in der CA1-Region. Die Feldpotenziale im CA1 des Hippocampus wiesen die typische stark negative Antwort auf, wobei präsynaptische Faservolleys dieser oft vorausgingen (Abb. 5). Die sieben besseren und sieben schlechteren Lerner unterschieden sich nicht in der Steilheit der Feldpotentiale (fEPSPs), die vor der Induktion von LTP bei Reizintensitäten von 1T (Threshold) (besser: -0.29 ± 0.02 V/s; schlechter: -0.32 ± 0.05 V/s), 2T (200% des Thresholds) (besser: -0.69 ± 0.07 V/s; schlechter: -0.88 ± 0.19 V/s) und 3T (300% des Thresholds) (besser: -1.13 ± 0.13 V/s; schlechter: -1.15 ± 0.16 V/s) (alle P -Werte > 0.05) evoziert wurden. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass sich die Lernergruppen über eine Reihe von Stimulusintensitäten hinweg bezüglich der normalen synaptischen Übertragung nicht voneinander unterschieden. Synaptische Antworten auf Reizintensitäten, die höher als 3T waren, wurden nicht weiter analysiert, da diese oftmals ein Aktionspotenzial („population spike“) auslösten. Die besseren (6.92 ± 1.12 V) und schlechteren (7.14 ± 0.97 V) Lernergruppen unterschieden sich auch nicht in den Reizintensitäten, die zur Induktion von Testimpulsen und Tetani benutzt wurden ($P > 0.05$). Bei beiden Gruppen konnte eine stabile Baseline vor Gabe des 200 Hz Tetanus über einen Zeitraum von mindestens 20 Min. im CA1 gemessen werden.

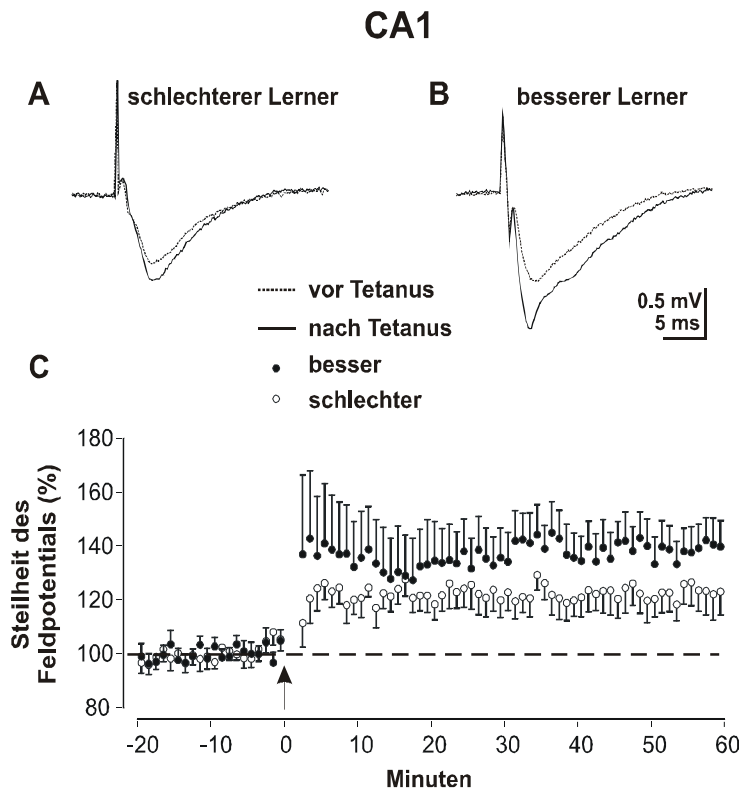


Abb. 5. STP und LTP in der Region CA1 des Hippocampus. Beispiele von Feldpotenzialen, wie sie im Stratum radiatum bei Stimulierung der Schaffer-Kollateralen im hippocampalen Gewebeschnitt in einem schlechteren (A) und einem besseren (B) Lerner gemessen wurden. Die oberen Spuren (gestrichelte Linien) zeigen die Kontrollantworten vor Gabe des Tetanus, die überlagerten unteren Spuren zeigen die potenzierten Antworten 55-60 Min. nach dem Tetanus. Die Spuren entsprechen dem Mittel von jeweils vier Antworten. (C) Der Verlauf von LTP in den Gruppen der besseren ($n = 7$) und schlechteren ($n = 7$) Lerner. Die Gabe des Tetanus fand an Zeitpunkt 0 (Pfeil) statt. Die Zeitpunkte beziehen sich auf jeweils zwei Antworten, die in einem Abstand von 30 Sek. aufeinander folgten. Die Daten wurden an die Prozentwerte der Feldpotenzialsteilheit während der Baseline angepasst und sind als Mittelwerte (+ - SF) dargestellt.

Kurz- und Langzeitpotenzierung in der CA1-Region. Die Kurz- und Langzeitpotenzierung (STP und LTP) im CA1 wurde für jedes Tier gemessen und anhand der Baselinewerte prozentual berechnet. Die Mediane (und Interquartilbereiche) für STP betragen 124.16 (68.66) und 124.10 (22.90) für die besseren bzw. schlechteren Lerner. Die Mediane (und Interquartilbereiche) für LTP betragen 128.26 (47.17) bzw. 129.66 (18.17). Die Gruppen unterschieden sich nicht im Expressionsgrad von STP ($P = 0.24$, einseitig) und LTP ($P = 0.42$, einseitig). Korrelationsanalysen ergaben, dass bei den besseren Lernern (Spearman $r = 1.00$, $P = 0.00$), jedoch nicht bei den schlechteren (Spearman $r = 0.64$, $P = 0.12$), STP und

LTP signifikant miteinander korrelierten. Bei allen Tieren korrelierten STP und LTP ebenfalls positiv miteinander (Spearman $r = 0.88$, $P = 0.00004$).

3.1.4.6 Korrelationen zwischen dem Verhalten im Wasserlabyrinth und STP und LTP

Da die Verteilungen von STP und LTP nicht das Normalitätskriterium erfüllten, wurden im Folgenden ausschließlich nicht-parametrische Verfahren zur Datenanalyse angewendet.

Schwimmzeiten zur verborgenen Plattform. Um die Hypothese zu testen, dass STP und LTP mit dem Fluchtlernen im Wasserlabyrinth assoziiert sind, wurden die durchschnittlichen Gesamtschwimmzeiten zur verborgenen Plattform mit STP und LTP jeweils für die besseren und schlechteren Lerner sowie für alle Tiere zusammen korreliert. Für die besseren Lerner waren diese Korrelationen signifikant, die Korrelationskoeffizienten betragen einen Wert von -1.0 . Demnach korrelierte ein schnelleres Entkommen auf die Plattform, also ein besseres Lernvermögen, mit mehr STP und LTP. Für die Gruppe der schlechteren Lerner betragen die Korrelationen zwischen den mittleren Gesamtschwimmzeiten und STP sowie LTP jeweils $r = -0.71$ ($P = 0.07$) und $r = -0.29$ ($P = 0.54$) (siehe Abb. 6). Für alle Tiere zusammen erreichte die Korrelation zwischen den mittleren Gesamtschwimmzeiten und STP einen Koeffizienten von -0.57 ($P = 0.03$), aber einen Koeffizienten von -0.41 ($P = 0.15$) im Fall von LTP.

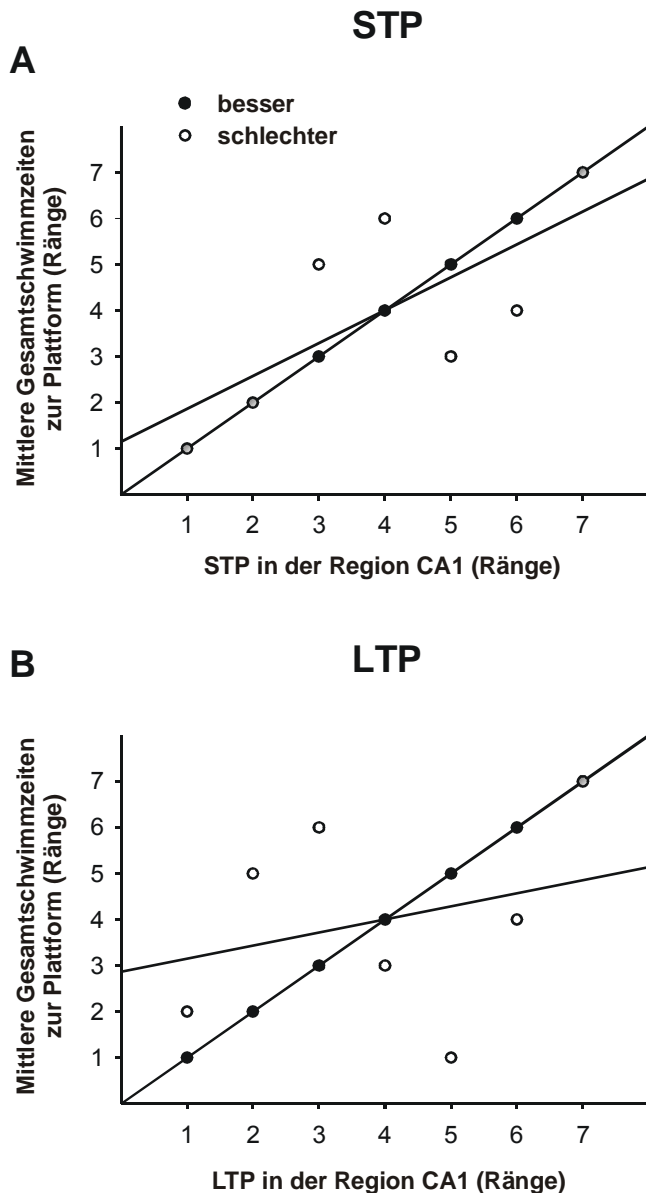


Abb. 6. Korrelationen zwischen dem Lernen im Wasserlabyrinth und STP und LTP. Die mittleren Gesamtschwimmzeiten (d.h. die Durchschnittswerte aller neun mittleren Schwimmzeiten pro Tag) und STP (A) und LTP (B) in der CA1-Region wurden separat für die besseren ($n = 7$) und schlechteren ($n = 7$) Lerner korreliert. Die Datenpunkte sind als Ränge dargestellt im Einklang mit den statistischen Analysen, die durchgeführt wurden. Niedrigere Ränge korrespondieren mit einem besseren Lernverhalten und mehr STP und LTP. Schwarz-weiß schattierte Punkte zeigen Ränge, die von jeweils einem besseren und einem schlechteren Lerner gleichzeitig besetzt wurden.

Schwimmzeiten im Plattformquadranten. Der Anstieg (%) der im Plattformquadranten geschwommenen Zeit während der letzten drei Trainingstage (7-9) im Vergleich zum Ersten (Baseline) korrelierte mit STP ($r = 0.75$, $P = 0.05$) und LTP ($r = 0.75$, $P = 0.05$) für die besseren Lerner. Demnach korrelierten höhere Aufenthaltszeiten im Plattformquadranten mit mehr STP und LTP in der CA1-Region. Wurden die mittleren Gesamtaufenthaltszeiten für die Trainingstage 6-9 errechnet und mit STP und LTP korreliert, ergaben sich Korrelationskoeffizienten von jeweils 0.71 ($P = 0.07$) und 0.71 ($P = 0.07$). Für die Gruppe der schlechteren Lerner betragen die P -Werte jeweils > 0.4 . Beide Gruppen zusammen wiesen Korrelationskoeffizienten von -0.5 ($P = 0.07$) und 0.51 ($P = 0.06$) auf, wenn STP und LTP mit den Aufenthaltszeiten im Plattformquadranten während der letzten drei

Trainingstage (7-9) korreliert wurde. Für die Trainingstage 6-9 betragen die Koeffizienten 0.42 ($P = 0.13$) im Fall von STP und 0.46 ($P = 0.1$) im Fall von LTP.

Aufenthaltszeiten im äußeren Ring. Die Korrelationen zwischen den Aufenthaltszeiten in der Peripherie des Labyrinths (%) und STP sowie LTP waren nicht bedeutsam. Für die Gruppe der besseren Lerner betragen die P-Werte jeweils 1.0., für die schlechteren Lerner jeweils > 0.7 und für alle Tiere zusammen > 0.5 .

Probe Trial. Für alle Tiere zusammen korrelierten die Aufenthaltszeiten im vorherigen Plattformquadranten während des Durchgangs ohne Plattform positiv mit STP ($r = 0.65$, $P = 0.01$) und LTP ($r = 0.56$, $P = 0.04$). Demnach korrelierte eine längere Aufenthaltszeit mit einem höheren Expressionsniveau von STP und LTP (Abb. 7).

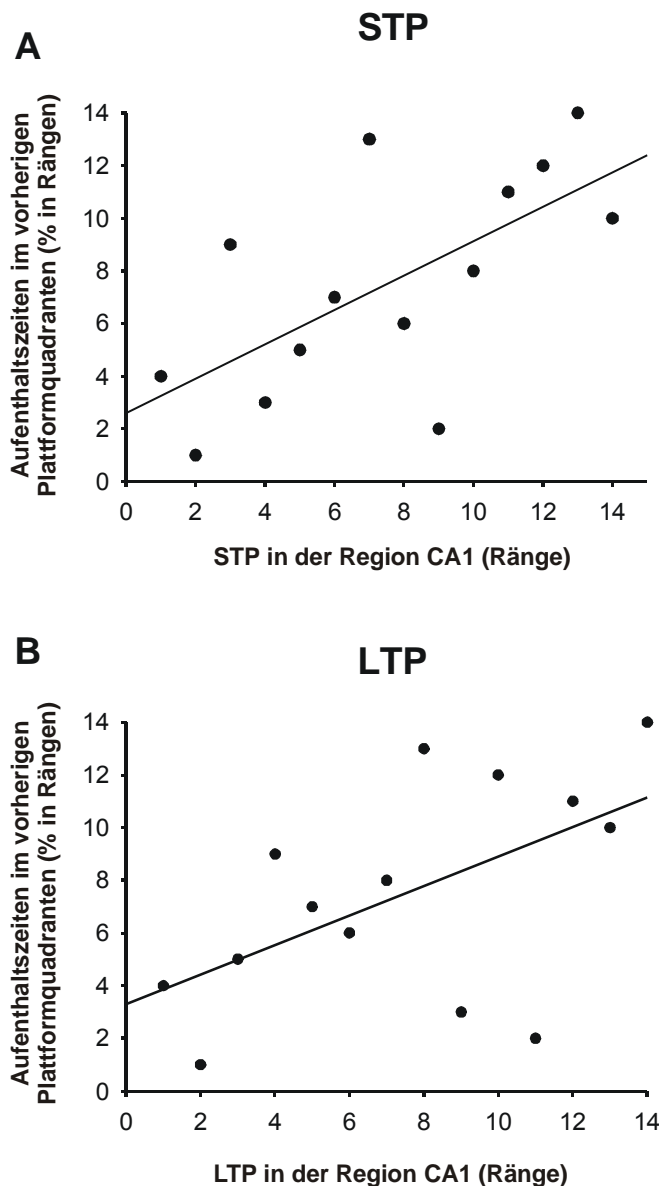


Abb. 7. Korrelationen zwischen der Performanz während des Extinktionsdurchgangs und STP und LTP. Die Aufenthaltszeiten im vorherigen Plattformquadranten (mit verborgener Plattform) (%) korrelierten mit STP (A) und LTP (B) für beide Lernergruppen zusammen ($n = 14$). Die Datenpunkte sind in Rängen dargestellt im Einklang mit den statistischen Analysen, die durchgeführt wurden. Niedrigere Ränge korrespondieren mit höheren Aufenthaltszeiten im vorherigen Plattformquadranten und höheren Graden an STP und LTP.

Für die Gruppe der schlechteren Lerner korrelierten die Aufenthaltszeiten im vorherigen Plattformquadranten mit STP ($r = 0.96$, $P = 0.0004$), aber nicht mit LTP ($r = 0.61$, $P = 0.15$). Für die besseren Lerner betragen die P -Werte > 0.25 . Korrelationsanalysen zwischen STP oder LTP und den Aufenthaltszeiten im Plattformquadranten wurden zusätzlich nur für diejenigen Tiere durchgeführt, die mehr als 25% der Schwimmzeit im Labyrinth im vorherigen Plattformquadranten verbracht haben ($n = 6$). Hierbei ergab sich keine bezeichnende Korrelation entweder zwischen STP und dem Aufenthalt im vorherigen Plattformquadranten ($r = 0.2$, $P = 0.7$) oder LTP und der Schwimmzeit in dieser Region ($r = -0.09$, $P = 0.87$).

Auch die Schwimgeschwindigkeiten im Labyrinth während des „Probe Trials“ korrelierten nicht offensichtlich mit STP oder LTP in der Gruppe der besseren Lerner ($P > 0.5$), der schlechteren Lerner ($P > 0.1$) oder für alle Tiere zusammen ($P > 0.1$).

Test mit sichtbarer Plattformposition. In der Gruppe der schlechteren Lerner korrelierten die durchschnittlichen Schwimmzeiten zur signalisierten Plattform während der vier Durchgänge ($r = -0.79$, $P = 0.04$) sowie während der ersten zwei Durchgänge ($r = -0.82$, $P = 0.02$) mit LTP, aber nicht mit STP ($r = -0.29$, $P = 0.54$ und $r = -0.18$, $P = 0.7$). In der Gruppe der besseren Lerner sowie für alle Tiere zusammen waren die Korrelationen nicht bedeutsam (alle P -Werte > 0.4).

3.1.4.7 Korrelationen zwischen der Offenfeldexploration und STP und LTP

Bezüglich einer weiteren zentralen Hypothese dieser Arbeit, nämlich dass Lern- und Gedächtnisprozesse auch eine Funktion des explorativen Verhaltens darstellen, untersuchten wir in diesem Projekt ebenfalls die Zusammenhänge zwischen dem Aufrichtverhalten im Offenfeld und STP und LTP. Die Ergebnisse zeigten, dass in der Gruppe der besseren Lerner die Anzahl der Aufrichtungen mit STP ($r = 0.93$, $P = 0.003$ an Tag 1 und $r = 0.96$, $P = 0.001$ an Tag 2) und LTP ($r = 0.93$, $P = 0.003$ an Tag 1 und $r = 0.96$, $P = 0.001$ an Tag 2) an beiden Versuchstagen im Offenfeld korrelierte. Hierbei korrelierten eine höhere Anzahl an Aufrichtungen mit mehr STP und LTP. In der Gruppe der schlechteren Lerner waren die Korrelationen nicht bedeutsam (alle P -Werte > 0.4) (Abb. 8). Auch für alle Tiere zusammen korrelierte die Anzahl der Aufrichtungen nicht offensichtlich mit STP und LTP ($P > 0.05$).

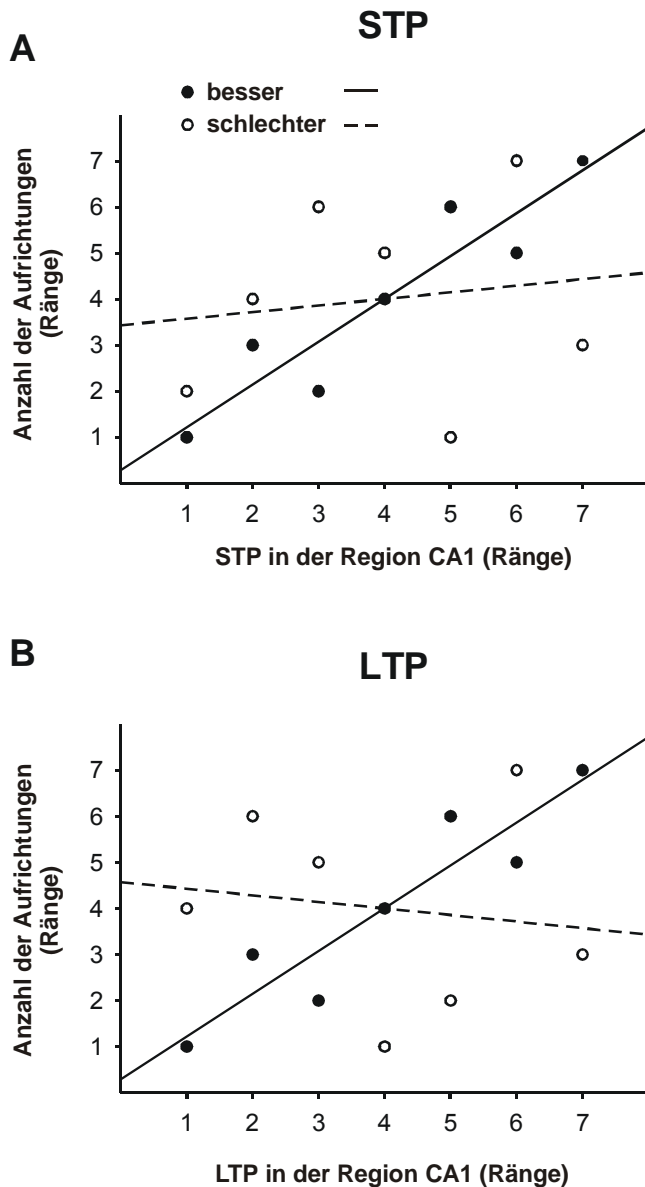


Abb. 8. Korrelationen zwischen dem Explorationsverhalten im Offenfeld und STP und LTP. Die Anzahl der Aufrichtungen während des 10-minütigen Versuchs am ersten Tag der Offenfeldtestungen wurden mit STP (A) und LTP (B) getrennt für die besseren (n = 7) und schlechteren (n = 7) Lerner korreliert. Die Datenpunkte sind in Rängen dargestellt im Einklang mit den statistischen Analysen, die durchgeführt wurden. Niedrigere Ränge korrespondieren mit einer höheren Anzahl an Aufrichtungen und mehr STP und LTP.

Die Korrelationen mit den P -Werten ≥ 0.05 sind noch einmal in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1. Zusammenfassung der Korrelationen mit $P \leq 0.05$ in den Gruppen der besseren (B) und schlechteren (S) Lerner und für alle Tiere (BS) zusammen

	Wasserlabyrinth				Offenfeld		Elektrophysiologie	
	Schwimmzeiten zur Plattform	Aufenthaltszeiten im Plattformquadranten*	Probe Trial	Cued Version	Anzahl der Aufrichtungen an Tag 1	Anzahl der Aufrichtungen an Tag 2	STP	LTP
Schwimmzeiten zur Plattform	-	-	-	-	-	-	-	-
Aufenthaltszeiten im Plattformquadranten*	↓ (B, BS)	-	-	-	-	-	-	-
Probe Trial	-	-	-	-	-	-	-	-
Cued Version	-	-	-	-	-	-	-	-
Anzahl der Aufrichtungen an Tag 1	↓ (B)	↑ (B)	-	-	↑ (B, S, BS)	-	-	-
Anzahl der Aufrichtungen an Tag 2	↓ (B)	-	-	-	↑ (B)	↑ (B)	-	-
STP	↓ (B, BS)	↑ (B)	↑ (S, BS)	-	↑ (B)	↑ (B)	-	-
LTP	↓ (B)	↑ (B)	↑ (BS)	↓ (S)	↑ (B)	↑ (B)	↑ (B, BS)	-

↑ = positive Korrelation; ↓ = negative Korrelation. * An den Tagen 7-9.

3.1.5 Diskussion

In der gegenwärtigen Studie wurden alte Tiere mit besserem und schlechterem Lernleistungsvermögen im Wasserlabyrinth miteinander verglichen und unterschieden sich, wie erwartet, in der Schwimmlatenz bis zum Entkommen auf eine verborgene Plattform, aber auch in den Aufenthaltszeiten im Plattformquadranten und in der Peripherie des Labyrinths. Ebenso wies die Gruppe der besseren Lerner in einer inhibitorischen Vermeidungslernaufgabe ein besseres Kurzzeitgedächtnis als die schlechteren Lerner auf. Zusätzlich konnte in der Gruppe der besseren Lerner die Varianz im Wasserlabyrinthlernen durch die Varianz im Explorationsverhalten im Offenfeld größtenteils erklärt werden. Ebenso korrelierten STP und LTP, die in der CA1-Region gemessen wurden, in dieser Gruppe mit dem Relationslernen im Wasserlabyrinth sowie mit dem Explorationsverhalten im Offenfeld. Die Verhaltensunterschiede der besseren und schlechteren Lerner konnten nicht durch Gruppenunterschiede im Expressionsgrad von STP und LTP in diesen Tieren erklärt werden.

3.1.5.1 Unterschiede im Verhalten zwischen den besseren und schlechteren Wasserlabyrinthlernern

Die Akquisition im Wasserlabyrinth. Die besseren und schlechteren Lerner wurden aufgrund ihrer Schwimmzeiten zur verborgenen Plattform im Wasserlabyrinth aus einer größeren Stichprobe ausgewählt. Wie erwartet unterschieden sich die Lernergruppen in den mittleren Gesamtschwimmzeiten zur Plattform während der Akquisitionsphase; im Vergleich zu den besseren Lernern, wiesen die schlechteren Lerner ein deutliches Defizit bei der Lösung der Aufgabe auf. Im Allgemeinen wird die Verringerung der Schwimmzeiten oder -distanzen über die Versuchsdurchgänge hinweg als Indikator für räumliches Lernen angesehen, denn es wird angenommen, dass diese mit dem Erlernen der Plattformposition anhand von Hinweisreizen außerhalb des Wasserlabyrinths einhergeht (Morris, 1984). Studien zeigen jedoch, dass sich die Latenzen oder Distanzen auch verringern können, wenn die Tiere blind sind (Lindner et al., 1997). In der gegenwärtigen Studie wurden ebenfalls Daten zum Erlernen einer Platzpräferenz sowie einer Vermeidung der Peripherie des Wasserlabyrinths erhoben. Im Gegensatz zum Erlernen einer Platzpräferenz, d.h. die Bevorzugung des Plattformquadranten gegenüber den anderen Quadranten, beinhaltet das Lernen einer Vermeidung der Peripherie nicht unbedingt eine räumliche Komponente; von der Beckenwand in das Zentrum des

Labyrinths zu schwimmen kann automatisch die Chancen erhöhen, auf die Plattform zu treffen. In dieser Studie zeigten die besseren Lerner beide Formen der Akquisition. Die schlechteren Lerner hingegen wiesen keine Platzpräferenz auf und reduzierten den Aufenthalt im äußeren Ring nur während der letzten zwei Akquisitionstage. Interessanterweise führen Läsionen des Hippocampus und die Blockade von NMDA und muskarinergen Rezeptoren ebenfalls zur Zunahme der Schwimmzeiten zur verborgenen Plattform und der Aufenthaltszeiten in der Peripherie des Labyrinths (Cain et al., 1996; Saucier et al., 1996; Cain, 1998).

Probe Trial. Die Gruppenwerte der besseren und schlechteren Lerner indizierten keine Präferenz für den vorherigen Plattformquadranten, obwohl der Interquartilbereich der besseren Lerner relativ groß war und darauf hindeutete, dass ein Teil der Tiere eine räumliche Präferenz zeigte. Auch in anderen Studien fand man bei alten Tieren keine deutliche Platzpräferenz für den vorherigen Plattformquadranten, auch wenn die Schwimmzeiten oder –distanzen zur verborgenen Plattform während der Akquisition abnahmen (Rapp et al., 1987; Deupree et al., 1991; Frick et al., 1995). In der gegenwärtigen Studie zeigten die besseren Lerner während der Akquisition räumliche und nicht-räumliche Lernleistungen, welche zur Abnahme in den Schwimmzeiten zur Plattform geführt haben. Beide Lernverhalten können daher mit der Performanz während des „Probe Trials“ interagiert haben, so dass die räumliche Platzpräferenz nicht die gesamte Lernleistung widerspiegelte und gering ausfiel. Möglicherweise war ein räumliches Lernvermögen in zu wenigen Tieren vorhanden, als dass sich dieses in Form einer Platzpräferenz für die gesamte Gruppe abbilden konnte.

Testversion mit sichtbarer Plattformposition. Obwohl sich in den vier einzelnen Durchgängen mit sichtbarer Plattformposition oder in den ersten zwei Durchgängen die besseren Lerner nicht von den schlechteren unterschieden, zeigte sich ein Gruppenunterschied in den letzten beiden Durchgängen. Hierbei erklommen die besseren Lerner die Plattform schneller als die schlechteren Lerner. Diese Version des Wasserlabyrinths steht im Allgemeinen für die Messung des Sehvermögens sowie der Motivation und anderer möglicher konfundierender Variablen, welche die räumliche Lernleistung während der Akquisition beeinflussen könnten (Morris, 1984). Bei alten Ratten konnten die räumlichen Lerndefizite bisher nicht durch Defizite bei der Aufgabe mit sichtbarer Plattformposition erklärt werden (Rapp et al., 1987; Gage et al., 1989; Markowska et al., 1989, Gallagher et al., 1993). Auch in der

gegenwärtigen Studie korrelierten für keine der beiden Lernergruppen die Schwimmzeiten zur verborgenen und signalisierten Plattform. Dieses deutet daraufhin, dass die Performanz in der räumlichen Lernaufgabe nicht durch die Performanz in der Aufgabe mit sichtbarer Plattformposition erklärt werden konnte. Der Gruppenunterschied in den letzten beiden Durchgängen bei der Aufgabe mit sichtbarer Plattformposition könnte auf ein Lerndefizit bei den schlechteren gegenüber den besseren Lernern hinweisen.

Offenfeldaktivität. Die besseren und die schlechteren Lerner wurden auch bezüglich des Explorationsverhaltens im Offenfeld, d.h. in Bezug auf das Aufrichtverhalten über zwei Testungen hinweg verglichen. Die Gruppen unterschieden sich nicht voneinander, in Übereinstimmung mit einer anderen Studie (Rowe et al., 1998). Dieses könnte darauf hindeuten, dass sich die Gruppen in der Motivation, das Offenfeld zu explorieren sowie in der hierzu erforderlichen motorischen Fähigkeit, ähnelten. Die Exploration ist eng an Konzepte wie Aufmerksamkeit, Erregung und Informationssuche geknüpft (Berlyne, 1966a, b). Aufmerksamkeitsprozesse und Motivation können wiederum determinieren, ob und zu welchem Grad das Lernen stattfindet (Berlyne, 1969; Posner und Petersen, 1990). Interessanterweise fanden wir in der gegenwärtigen Studie heraus, dass in der Gruppe der besseren Lerner die Varianz im Fluchtlernen im Wasserlabyrinth durch die Varianz in der Anzahl der Aufrichtungen im Offenfeld wesentlich erklärt werden konnte. In dieser Gruppe korrelierte besseres Lernen, d.h. kürzere Schwimmzeiten zur verborgenen Plattform mit einer vermehrten explorativen Aktivität im Offenfeld. Ebenso korrelierte eine stärkere Platzpräferenz für den Plattformquadranten während der Akquisition mit mehr Aufrichtungen an Tag 1 im Offenfeld. Möglicherweise konfundierten Faktoren wie das extrem defizitäre Fluchtlernen, das Nichtvorhandensein einer Platzpräferenz und/oder dritte Variablen ähnliche Zusammenhänge in der Gruppe der schlechteren Lerner.

Inhibitorisches Vermeidungslernen. Es ist bekannt, dass alte Tiere Retentionsaufgaben im Vergleich zu jungen Tieren schlechter bewältigen, auch wenn es sich um das inhibitorische Vermeidungsverhalten handelt (Martinez und Rigger, 1983; Vasquez et al., 1983; Markowska et al., 1989; Giuliani et al., 1994). Das Erlernen und die Retention einer inhibitorischen Vermeidung ist von der Integrität des Hippocampus und anderen Hirnstrukturen abhängig (Bermudez-Rattoni et al., 1991; Frisch et al., 1998; Izquierdo et al., 1998; Barros et al., 1999). In der gegenwärtigen

Studie zeigte die Gruppe der schlechteren Labyrinthlerner in einer inhibitorischen Vermeidungsaufgabe ein defizitäres Kurzzeitgedächtnis im Vergleich zu den besseren Lernern. Unglücklicherweise war es nicht möglich, Korrelationsanalysen mit anderen Verhaltensweisen durchzuführen, da die maximalen Eintrittslatenzen, die in dieser Aufgabe erreicht werden konnten, von mehreren Tieren erlangt wurden und so mehrere Datenpunkte punktgleich waren.

3.1.5.2 Korrelationen zwischen den Lernleistungen im Wasserlabyrinth und STP und LTP bei besser- und schlechterlernenden alten Ratten

Der Befund, dass sich die besseren und schlechteren Lerner in dieser Studie im Expressionsgrad von STP und LTP im Hippocampus nicht voneinander unterscheiden, steht im Einklang mit anderen Studien, in denen alte Tiere oder alte und junge Tiere hinsichtlich der Induktion von LTP miteinander verglichen wurden (Barnes, 1979; Deupree et al., 1993; Diana et al., 1994; Bach et al., 1999). Die Varianz im Raumlernen der besseren Lerner konnte jedoch auf bedeutsame Weise durch die Varianz im Expressionsgrad von STP und LTP erklärt werden; kürzere Schwimmzeiten zur verborgenen Plattform korrelierten mit einem höheren Grad an STP und LTP. Ebenfalls korrelierte eine höhere Platzpräferenz mit mehr STP und LTP in dieser Gruppe. Die Aufenthaltszeiten an der Wand des Labyrinths schienen jedoch in keinem bedeutsamen Zusammenhang mit STP und LTP zu stehen. Weiterhin korrelierte die Aufenthaltszeit im vorherigen Plattformquadranten während des „Probe Trials“ mit STP und LTP für beide Gruppen. In Bezug auf die seit langem geführte Debatte, ob LTP ein mögliches neuronales Substrat von Lern- und Gedächtnis- oder verwandten Prozessen darstellt (z.B. McEachern und Shaw, 1996; Shors und Matzel, 1997), unterstützen die Ergebnisse dieser Studie die Hypothese, dass *in vitro* STP und LTP mit dem Raumlernen und –gedächtnis verknüpft ist, obwohl diese keine kausalen Faktoren darstellen, die die Unterschiede im Verhalten der besseren und schlechteren Lerner erklären konnten.

Überraschenderweise korrelierten STP und LTP mit dem Lernverhalten während der Akquisition nur für eine Subgruppe der Tiere, der besseren Lerner, wohingegen die Platzpräferenz während des Extinktionsdurchgangs mit STP und LTP für alle Tiere gemeinsam korrelierte. In einer anderen Studie (Deupree et al., 1991) hingegen korrelierten diese Variablen nicht miteinander. Im Vergleich hierzu fanden Bach et al. (1999) heraus, dass räumliche Gedächtnisfehler bei alten Mäusen mit der späten Phase von LTP (L-LTP) im Hippocampus korrelierte. Festzustellen ist, dass in der

Studie von Deupree et al. (1991), vergleichbar mit der gegenwärtigen Studie, die Tiere im Durchschnitt keine bedeutsame Platzpräferenz im „Probe Trial“ aufwiesen. Daher führten wir ebenfalls Korrelationsanalysen zwischen STP, LTP und den Aufenthaltszeiten im vorherigen Plattformquadranten nur für diejenigen Tiere durch, die eine deutliche Platzpräferenz aufwiesen (6 von 14 Tieren) und fanden keine bedeutsame Korrelation zwischen den Variablen. Die zuvor gefundenen Korrelationen (für alle 14 Tiere) schienen also auf einer Co-Varianz mit anderen Variablen zu basieren, die nicht unbedingt in Zusammenhang mit dem räumlichen Gedächtnis stehen.

Auf der anderen Seite korrelierten in der Gruppe der besseren Lerner die Schwimmzeiten zur verborgenen Plattform und die Platzpräferenz für den Plattformquadranten mit STP und LTP. Bisher haben nur wenige Studien mit Korrelationsanalysen gearbeitet, um die Zusammenhänge zwischen dem Erlernen des Wasserlabyrinths und LTP oder anderen Formen der synaptischen Plastizität zu untersuchen. In einer Studie korrelierten einzelne Akquisitionsdurchgänge im „Circular Maze“ mit dem Grad der Potenzierung nach hochfrequenter Stimulation (Barnes, 1979). In einer anderen Studie wurde erwähnt, dass die Akquisitionsrate von räumlichem Verhalten in einem „Circular Maze“ in einem Verhältnis von 1:2 mit der synaptischen Potenzierung stand (Barnes und McNaughton, 1985). Korrelationsanalysen wurden in diesem Bericht jedoch nicht durchgeführt. Diana et al. (1994) fand eine Korrelation zwischen der Performanz im letzten (27.) Akquisitionsdurchgang und der post-tetanischen Potenzierung im Gyrus dentatus für eine gemischte Population verschiedener Altersgruppen und Tierstämme. Im Gegensatz hierzu wurden in der gegenwärtigen Studie bessere und schlechtere Lerner einer Altersgruppe miteinander verglichen, um den Zusammenhang zwischen dem Labyrinthlernen und synaptischer Plastizität zu untersuchen. Des Weiteren wurde die Aufmerksamkeit darauf gerichtet, das Lernen als funktional voneinander abhängige Trainingsdurchgänge, d.h. Kurvenlevel, zu beschreiben (Krauth, 1980). Das Fehlen ähnlicher Zusammenhänge in der Gruppe der schlechteren Lerner könnte aufgrund des großen Defizits im Fluchtlernen, im Raumlernen und/oder des Einflusses unbekannter dritter Variablen auf die Zusammenhänge aufgetreten sein. Solche Einflüsse könnten z.B. auf Dysfunktionen der extrazellulären Matrix (ECM) zurückzuführen sein. Der Grad solcher Dysfunktionen korrelierte mit dem Grad des Lerndefizits in alten besserlernenden und schlechterlernenden Ratten (Sykova et al.,

2002). Veränderungen in der Funktion der ECM können auch LTP beeinflussen (Kullmann et al., 1996; Asztely et al., 1997). Dritte Variablen dieser Art können für die Variabilität im Grad und in der Valenz von Korrelationen insbesondere bei alten Tieren verantwortlich sein (Schulz und Huston, 2002).

3.1.5.3 Korrelationen zwischen der Offenfeldaktivität und STP und LTP bei besser- und schlechterlernenden alten Ratten

Dem Hippocampus wird eine Rolle beim Relationslernen (Morris et al., 1982; Pouzet et al., 2002), bei Aufmerksamkeitsprozessen (Grossberg, 1975; Schmajuk, 1990; Schmajuk und DiCarlo, 1991) und beim Explorationsverhalten (Gall et al., 1998) zugedacht, welche wiederum selbst aneinander gekoppelt sind (Berlyne, 1966a, b; Berlyne, 1969; Posner und Petersen, 1990). So weit wie die Anzahl der Aufrichtungen ein exploratives oder aufmerksames Verhalten darstellt, bestätigten die Befunde der gegenwärtigen Studie den oben genannten Link; in der besserlernenden Subgruppe alter Tiere, die im Vergleich zu einer extrem defizitären Lernergruppe ein deutliches Flucht- und Raumlernen sowie das Lernen einer Vermeidung der Peripherie des Wasserlabyrinths und ein besseres Kurzzeitgedächtnis in einer inhibitorischen Vermeidungslernaufgabe aufwies, korrelierten das Flucht- und Raumlernen mit der Anzahl der Aufrichtungen. Die Anzahl der Aufrichtungen korrelierten auch mit STP und LTP. In diesem Zusammenhang ist es besonders interessant zu erwähnen, dass Shors und Matzel (1997) LTP als ein Aufmerksamkeits- oder Erregungsapparat sehen, welcher angeschaltet wird, wenn im Umfeld besonders kritische Informationen vorliegen.

Abschließend wird noch darauf hingewiesen, dass STP und LTP ungefähr drei Wochen nach den Verhaltenstestungen im Gewebeschnitt gemessen wurden. Es ist durchaus bemerkenswert, dass im Falle eines Zusammenhangs zwischen LTP und der Varianz im Verhalten, welches unsere Ergebnisse bekräftigen, die Eigenschaften des Systems, das für die Korrelationen verantwortlich ist, im Gewebeschnitt und über die Zeit hinweg konserviert werden.

3.2 Korrelationen zwischen Verhaltensparametern bei alten Ratten und STP und LTP sowie der Gen Expression von ChAT und den NMDA-NR2 Untereinheiten im Striatum

3.2.1 Zusammenfassung

Neuronale Parameter des Striatums wurden auf ihre Relevanz für altersbedingte Verhaltensabnahmen untersucht. Vierzig alte Ratten (28-30 Monate alt) wurden hierfür im Wasserlabyrinth und im Offenfeld getestet. Von diesen wurden sieben bessere und sieben schlechtere Lerner hinsichtlich des Expressionsgrads von *in vitro* Kurzzeit- und Langzeitpotenzierung (STP und LTP), der Genexpression von Cholin Acetyltransferase (ChAT) sowie den NMDA-NR2A-C Untereinheiten mittels semi-quantitativer RT-PCR untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die besseren Lerner einen höheren Level an ChAT mRNA im Striatum aufwiesen als die schlechteren Lerner. In der Gruppe der besseren Lerner korrelierte ChAT mRNA mit den Schwimmzeiten zu einer Plattform mit Hinweisreiz im Wasserlabyrinth, wohingegen die Varianz im Level von LTP die Varianz im Relationslernen im Wasserlabyrinth und in den Aufrichtungen in einem Offenfeld zu einem bedeutsamen Anteil erklären konnte. In der Gruppe der schlechteren Lerner korrelierte die Gen Expression von NR2A und NR2B positiv mit dem Relationslernen und mit der Performanz während einer Retentionsaufgabe im Wasserlabyrinth. Die Ergebnisse weisen daraufhin, dass interindividuelle Differenzen in verschiedenen Verhaltensweisen alter Ratten durch die Varianz in striatalen Parametern, d.h. LTP, ChAT und der mRNA der NMDA-NR2 Untereinheiten, zu bedeutsamen Anteilen erklärt werden konnten. Bemerkenswert war, dass die Korrelationen zwischen den Gruppen heterogen waren: Beispielsweise korrelierte das Platzlernen in den besseren Lernern mit LTP im Striatum, in den schlechteren Lernern hingegen mit der Gen Expression von NR2A-B.

3.2.2 Einleitung

Studien, die sich auf die Untersuchung von Zusammenhängen zwischen neuronalen und behavioralen Variablen bezüglich altersbedingten Abnahmen in der Kognition konzentriert haben, richteten die Aufmerksamkeit oft auf Funktionen des Hippocampus. Eine andere Hirnregion, die vom Altern betroffen ist und ebenfalls das Lernen und Gedächtnis parallel zum Hippocampus vermittelt, ist das Striatum.

Bei der Huntingtonischen Krankheit koinzidiert die Degeneration striataler Neurone mit Defiziten in der Bewegung und in der Verarbeitung von Gedächtnisinhalten und visuell-räumlichen Informationen (Lawrence et al., 1996). Striatale Lernmechanismen sind auch durch die Aktivitätsmuster striataler Neurone gekennzeichnet, die bei der Darbietung primärer Verstärker und konditionierter – auf Verstärkung hinweisender - Stimuli reagieren und ihre Antworten während des Lernens von Verstärkungskontingenzen verändern (Schultz, 1998; Fiorillo et al., 2003). Weiterhin können auch Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD) in corticostriatalen Synapsen induziert werden (Calabresi et al., 1992a, b). Während die hippocampale LTP und LTD schon lange als mögliches Substrat von Aufmerksamkeits-, Lern- und Gedächtnisprozessen diskutiert werden (Bliss und Collingridge, 1993; Shors und Matzel, 1997; Martin und Morris, 2002) und herausgefunden wurde, dass diese im Alter verändert sind (Norris et al., 1996; Lynch, 1998), ist über die Funktion von LTP im Striatum noch wenig bekannt. Obwohl man davon ausgeht, dass die corticostriatale LTP das motorische Lernen vermittelt (Charpier und Deniau, 1997), gibt es noch keine Studien, die solche Zusammenhänge untersucht haben. Die Intention dieser Studie war, Zusammenhänge zwischen LTP im Striatum und altersbedingten Verhaltensdefiziten – einschließlich der Performanz im Wasserlabyrinth und im Offenfeld - zu untersuchen. Sowohl das Erlernen eines Wasserlabyrinths als auch das Explorationsverhalten im Offenfeld werden durch striatale Läsionen gestört (Kelley und Iversen, 1979; Schwarting und Carey, 1988; Furtado und Mazurek, 1996; Devan und White, 1999) und wurden in dieser Studie hinsichtlich der Rolle des Striatums bei alten besser- und schlechterlernenden Ratten untersucht.

Eine Bedingung für die Induktion von LTP an corticostriatalen Synapsen, ist die Stimulierung von NMDA-Rezeptoren und M1-ähnlichen muskarinergen Rezeptoren, die sich auf „Medium Spiny“ Neuronen im Striatum befinden, die wiederum von cholinergen Interneuronen des Striatums innerviert werden (Calabresi et al., 1992a, 1999, 2000). Veränderungen in der Aktivität cholinerg und glutamaterger Systeme scheinen bei der Verhaltensabnahme im Alter eine Rolle zu spielen (Magnusson, 1998; Sarter und Bruno, 1998); die Aktivität beider Systeme wurde in dieser Studie zusammen mit LTP untersucht. Die cholinerge Aktivität wurde durch die Quantifizierung des Gens, welches das Acetylcholin-synthetisierende Enzym Cholin Acetyltransferase (ChAT) kodiert, gemessen. Die Bindung von Glutamat an den

NMDA-Rezeptor ist im Alter reduziert (Mitchell und Anderson, 1998). Seit kurzem wird die unterschiedliche Bedeutung der Untereinheiten des NMDA-Rezeptors, d.h. NR1/NR2A-D (ζ 1/ ϵ 1-4 in Mäusen) für die Hirnplastizität und das Verhalten betont; im Besonderen wurden die Untereinheiten ϵ 1-2 mit der hippocampalen synaptischen Plastizität und Lernparametern in Verbindung gebracht (Sakimura et al., 1995; Tang et al., 1999). Mit zunehmendem Alter der Tiere verringerte sich die mRNA von ϵ 2 im Cortex, Striatum und Hippocampus (Magnusson, 2000). Es ist jedoch nicht bekannt, ob die Menge der Untereinheiten mRNA mit den Verhaltensänderungen im Alter korreliert. In dieser Studie wurde die Gen Expression der Untereinheiten NR2A-C im Striatum der alten besseren und schlechteren Lerner gemessen und mit der Performanz im Wasserlabyrinth und im Offenfeld sowie mit ChAT und LTP korreliert.

3.2.3 Materialien und Methoden

3.2.3.1 Die Versuchstiere

Die Experimente wurden entsprechend den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und von der Bezirksregierung Düsseldorf genehmigt. Insgesamt 40 männliche Wistar-Ratten (28-30 Monate alt, Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) wurden entsprechend ihrer Leistung im Wasserlabyrinth rangiert. Das Leistungsvermögen wurde über die Akquisitionsrates und die durchschnittliche Zeit, die zum Erlernen der Aufgabe benötigt wurde, definiert. Nach diesen Kriterien wurden im gegenwärtigen Projekt 7 bessere (528.14 ± 30.99 g; Mittelwert \pm SF) und 7 schlechtere (555.14 ± 23.12 g; Mittelwert \pm SF) Ratten untersucht. Keines dieser Tiere wies offensichtliche physische Beschwerden oder Krankheiten auf. Die Tiere wurden in Gruppen untergebracht und einem 12-stündigen Hell/Dunkel Rhythmus ausgesetzt (Licht an um 07.00 Uhr). Futter (Altromin, gepresst) und Wasser standen frei zur Verfügung. Dieselben Tiere wurden schon in einer anderen Untersuchung zur synaptischen Plastizität im Hippocampus (Punkt 3.1) genutzt.

3.2.3.2 Das Wasserlabyrinth

Das runde Labyrinth hatte einen Durchmesser von 185 cm und bestand aus schwarzem Polyethylen. Es wurde zu einer Höhe von 30 cm mit 20 ± 1 °C warmem Wasser gefüllt. 1.5 cm unter der Wasseroberfläche war eine aus PVC angefertigte Plattform angebracht, deren Durchmesser 18 cm betrug. Die Plattform konnte an vier verschiedene Orte im Labyrinth verschoben werden, jeweils in die Mitte eines

Quadranten. Jedem Tier wurde ein zufällig ausgewählter Quadrant (Zielquadrant) zugeteilt, in dem sich die Plattform während der gesamten Akquisitionsphase befand. Zusätzlich wurden vier Startpunkte gewählt, die dem Uhrzeigersinn nach jeweils gleichweit voneinander entfernt waren. Täglich wurden die Tiere einer zufällig ausgewählten Sequenz entsprechend an jedem der vier Startpunkte einmal in das Labyrinth gelassen. Die Sequenz war für jedes Tier gleich. Hinweisreize in der Umgebung des Labyrinths, wie z.B. Poster, eine Tafel und ein Schrank, dienten zur räumlichen Orientierung. Die Reize wurden von vier 75-W Glühbirnen angestrahlt und hierdurch hervorgehoben. Diffuses Deckenlicht trug ebenfalls zur Beleuchtung des Labyrinths bei und sorgte für eine Helligkeit von ≈ 6.5 Lux auf der Wasseroberfläche. Computerisierte Systeme für die Verhaltensanalyse befanden sich hinter einer Barriere vom Labyrinth entfernt. Eine Kamera war ≈ 2 m über dem Labyrinth platziert.

Mindestens 30 Minuten vor Beginn der Experimente wurden die Ratten in einen Warteraum gebracht und bis kurz vor den Testungen in einem Transportkäfig gehalten. Am Anfang eines Versuchsdurchgangs wurden die Tiere einzeln im Labyrinth platziert, wobei sie der Wand des Beckens entgegen blickten. Jedes Tier durchlief einen 2-minütigen Adaptationsversuch in Abwesenheit einer Plattform, so dass es sich an die neue Wassersituation gewöhnen konnte und die allgemeine Schwimmfähigkeit überprüft werden konnte. Am nächsten Tag begann das neuntägige Training mit verborgener Plattform. In dieser Phase hatten die Tiere die Möglichkeit, den Ort der Plattformposition zu erlernen und auf die Plattform zu entkommen. Pro Tag wurden 4 Trainingsdurchgänge durchgeführt. Ein Trainingsdurchgang war beendet, wenn das Tier die Plattform erklimmt hatte oder 2 Minuten verstrichen waren. Nach Ablauf des 2-Minutenintervalls wurde die Ratte vom Versuchsleiter zur Plattform geleitet. Das Tier verweilte dann 30 Sekunden auf der Plattform. Hiernach wurde das Tier für 60 Sekunden in einem Transportkäfig gehalten und anschließend der nächste Durchgang gestartet. Nach dem letzten Durchgang wurden die Ratten mit Papiertüchern abgetupft und durch die Wärme von zwei 75-W Glühbirnen getrocknet. Einen Tag nach dem letzten Trainingsdurchgang durchliefen die Tiere einen 2-minütigen Extinktionsdurchgang („Probe Trial“), bei dem die Plattform nicht mehr vorhanden war und die Präferenz für den vorherigen Plattformquadranten erfasst wurde. Die Startpunkte für diesen Versuch lagen der vorherigen Plattformposition gegenüber. Am darauffolgenden Tag wurde ein

Hinweisreiz an der verborgenen Plattform angebracht und somit die Plattformposition sichtbar gemacht („Cued Platform Task“). Als Hinweisreiz diente ein Holzstab, der eine Höhe von 25 cm und einen Durchmesser von 2 cm aufwies, schwarz-weiß gestreift war und mit einem Baumwollband an der verborgenen Plattform befestigt wurde. Die Plattform mit Hinweisreiz wurde so positioniert, dass sie der ursprünglichen (verborgenen) Plattformposition gegenüber lag. Es wurden 4 Durchgänge in gleicher Weise wie bei den Durchgängen mit verborgener Plattform durchgeführt. Der Test mit sichtbarer Plattformposition wurde angewendet, um sensorisch-motorische Defizite zu erfassen (Morris, 1984). Alle Versuchsdurchgänge wurden auf Video aufgezeichnet und mit ETHOVISION software (Noldus, Wageningen, Niederlande) analysiert. Die Versuche fanden zwischen 9.00 und 17.00 Uhr statt.

Für jeden Trainingsdurchgang wurden die Schwimmzeiten und – distanzen bis zum Erreichen der verborgenen Plattform gemessen. Für jeden Trainingstag korrelierten diese Variablen miteinander (alle P -Werte ≤ 0.000003). Aus diesem Grund wurden nur die Schwimmzeiten als Index für die Lernleistung berücksichtigt. Die Schwimmzeiten wurden über alle vier Versuchsdurchgänge pro Tag gemittelt und diese wiederum über alle neun Trainingstage hinweg. Hieraus ergab sich ein Gesamtwert für jedes Tier, die „mittlere Gesamtschwimmzeit“ zur verborgenen Plattform. Diesem Index und den Lernraten nach wurden die Tiere rangiert, beginnend bei der besseren bis hin zur schlechteren Performanz. Hiernach wurden die sieben besseren und sieben schlechteren Tiere für die gegenwärtige Studie ausgewählt. Für die 9 Trainingstage wurden ebenfalls andere Variablen erhoben, z.B. die Aufenthaltszeiten im Plattformquadranten und im äußeren Ring des Labyrinths. Für die statistische Analyse wurden die Aufenthaltszeiten im Plattformquadranten und im äußeren Ring als prozentualer Anteil des Aufenthalts in den Quadranten bzw. Ringen vor dem Erreichen der verborgenen Plattform dargestellt. Der Aufenthalt im äußeren Ring wurde erfasst, indem das Labyrinth in drei imaginäre Ringe unterteilt wurde, einem äußeren, einem mittleren und einem inneren Ring. Gemessen vom Mittelpunkt zur Wand des Schwimmbeckens waren die Ringe jeweils gleichweit voneinander entfernt. Die Breite des äußeren Rings betrug 30.83 cm. Der Extinktionsdurchgang ohne Plattform wurde zum einen in Hinblick auf die Aufenthaltszeiten im vorherigen Plattformquadranten sowohl für die gesamten 2 Minuten des Durchgangs als auch separat für die erste und zweite

Minute analysiert. Zum anderen wurde die Schwimgeschwindigkeit (geschwommene Distanz in cm/120 Sekunden) erfasst. Bei der Aufgabe mit sichtbarer Plattformposition wurden die Schwimmzeiten zur Plattform mit Hinweisreiz gemessen und ein Mittelwert für alle vier Durchläufe berechnet sowie jeweils einer für die ersten und letzten beiden Durchgänge.

3.2.3.3 Das Offenfeld

Das Offenfeld bestand aus dunkelgrauem Plexiglas, hatte einen 60 x 60 cm breiten Boden, 39 cm hohe Wände und war nach oben hin offen. Während der Experimente war die Arena dunkel beleuchtet. Eine Videokamera wurde ca. 1 m über dem Zentrum des Feldes installiert. Ein Weitspektrumrauschgenerator erzeugte ein Rauschen von 60 dB.

Die Offenfeldversuche begannen ca. 4 Tage nach dem Wasserlabyrinthexperiment. Die Tiere wurden einzeln im Zentrum des Offenfeldes platziert, wobei der Kopf immer einer der Wände entgegen gerichtet war. Es wurde jeweils eine Testung an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt, die jeweils 10 Minuten andauerte. Die Experimente fanden zwischen 20:00 und 01:00 Uhr, d.h. während der aktiven Nachtphase der Tiere in abgedunkelten Räumen statt. Die Tiere wurden in dieser Zeit getestet, damit der altersbedingten Verhaltensabnahme (Willig et al., 1987) entgegengewirkt werden konnte.

Die Anzahl und Dauer der Aufrichtungen sowie der Zeitpunkt, an dem das Tier zum ersten Mal eine Aufrichtung ausführte, wurden für jeden Testtag separat gemessen. Eine Aufrichtung war gegeben, wenn beide Vorderpfoten vom Boden gelöst und in die Luft oder an eine Wand gerichtet waren.

3.2.3.4 *In vitro* elektrophysiologische Untersuchungen

Die elektrophysiologischen Messungen begannen ca. drei Wochen nach Beendigung des Wasserlabyrinthexperimentes. Die Aktivität im Striatum wurde im Gewebeschnitt *in vitro* gemessen. Den Versuchsleitern war kein Einblick in die vorhergehenden Verhaltensanalysen erlaubt. Die Sequenz der elektrophysiologischen Experimente wurde zufällig ausgewählt, um mögliche Reihenfolgeeffekte zu verhindern. Die Tiere wurden durch Enfluran (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) in eine tiefe Narkose versetzt und mit einer kleinen Tierguillotine dekapitiert. Unmittelbar danach wurden die Hirne entnommen und für 1-2 Minuten in eiskalte artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF) getaucht, die (in mM) aus 120 NaCl, 1.8 KCl, 1.2 MgCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 2.0 CaCl₂, 25 NaHCO₃ und 10 Glukose (pH von 7.4 unter einer

Sättigung von 95% O₂ und 5% CO₂) zusammengesetzt war. Der Gewebeblock wurde auf die Schneideplattform eines Campden Vibratoms geklebt und in eine sauerstoffangereicherte eiskalte ACSF getaucht. Das Gewebe wurde koronal zwischen Bregma +1.0 und -0.3 (Paxinos und Watson, 1986) in 400 µm dicke Scheiben geschnitten. Diese enthielten den anterodorsalen Teil des Striatums, weißes Gewebe und Teile des dorsalen Cortex. Die Gewebeschnitte ruhten 3-4 Std., bevor die Messungen bei 32°C in einer *in vitro* Meßkammer durchgeführt wurden. Eine 50 µm bipolare Reizelektrode wurde im weißen Gewebe zwischen Cortex und Striatum platziert, um corticostriatale Faserbahnen zu aktivieren (0.05 Hz, 80 µs Dauer). Die Messelektrode, eine mit ACSF gefüllte Mikroelektrode (3-4 MΩ), wurde 200-300 µm von der Reizelektrode entfernt im Striatum platziert, und zur Messung extrazellulärer Feldpotenziale genutzt. Nach Stabilisierung der Feldpotenzialantworten, wurde der Threshold derjenigen Stimulusintensität (=1T, 1.5-5 V) festgestellt, die eine minimale orthodromische synaptische Antwort auslöste. Der Zusammenhang zwischen der Eingangs- und Ausgangsintensität wurde untersucht, indem die Stimulusintensität um jeweils 1T bis zu einer maximalen Intensität von 5T erhöht wurde. Eine input-output Kurve wurde erstellt, wobei für jede Stimulusintensität 10 Antworten gemittelt wurden. Die Stimulusintensität wurde so adjustiert, dass eine orthodromische synaptische Antwort ausgelöst wurde, die eine Amplitude zwischen 50 und 60% der maximalen Feldpotenzialantwort betrug. Eine Baseline wurde erstellt, indem über ein Intervall von 20 Minuten einzelne synaptische Antworten gemessen wurden. Die Interstimulusintervalle hatten eine Dauer von 20 Sekunden. Gewebeschnitte, die eine instabile Baseline oder Feldpotentiale < 0.5 mV aufwiesen, wurden verworfen. Afferenzen zum Striatum wurden durch Gabe von drei Impulsgruppen à 100 Impulsen, die jeweils 100 µs andauerten, bei 100 Hz tetanisiert, wobei das Intervall zwischen den Folgen 20 Sekunden betrug (Calabresi et al., 1992a). Nach Gabe des Tetanus wurden 1 Stunde lang alle 20 Sekunden einzelne Antworten ausgelöst. Die Signale wurden bei 6 kHz entnommen, bei 3 kHz Tiefpass gefiltert, aufgenommen, gespeichert und offline mit einer Software (pCLAMP7, Axon Instruments, CA oder TIDA, Heka Elektronik, Lambrecht, Deutschland) analysiert. Die Feldpotenzialantworten wurden den Amplituden entsprechend vom Sattelpunkt der frühen Positivität bis zum Sattelpunkt der Negativität und vom Sattelpunkt der Negativität bis zum Sattelpunkt der späten Positivität analysiert (Calabresi et al., 1992a). Alle Daten wurden auf das

Niveau der Durchschnittsamplitude der 20-minütigen Baseline vor Gabe des Tetanus normalisiert. STP und LTP wurden berechnet, indem die Datenpunkte, die zwischen den Min. 10 und 15 bzw. 55 und 60 nach Gabe des Tetanus gemessen wurden, gemittelt wurden.

3.2.3.5 Die quantitative RT-PCR

Extrahierung der RNA und reversible Transkribierung. Zelluläres mRNA (gesamt) wurde mit Hilfe eines mRNA Isolierkits (Pharmacia Biothec, Amersham, UK) nach dem Protokoll des Herstellers vom dorsalen Striatum isoliert und mit 200 µl RNase-freiem Wasser von der Matrix eluiert. Für die reversible Transkribierung wurden 8 µl eluierte mRNA zu 7 µM einer Reagenzmixtur, die nach dem Protokoll des „First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Pharmacia Biotech, Amersham, UK) zubereitet wurde, gefügt. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37 °C wurde die reversible Transkribierung durch Tiefkühlung bei –20 °C gestoppt. Die durch die reversible Transkribierung verursachten Reaktionen wurden nicht normalisiert, so dass sie gleiche Mengen an mRNA enthielten. Die PCR wurde mit Hilfe des „SYBR Green Master Mix Kit“ in einem Sequenzerkennungssystem („PE Biosystems GeneAmp 5700“) durchgeführt. Jede Reaktion enthielt 2.5 µl des grünen 10xSYBR Puffers, 200 nM dATP, dGTP und dCTP, 400nM dUTP, 2mM MgCl₂, 0.25 Einheiten Uracil N-glycosylase, 0.625 Einheiten Amplitaq Gold DNA Polymerase, 10 pM vorwärts und rückwärts Primer, 5 µl von 1:4 verdünnter cDNA und Wasser bis 25 µl. Die Primer, die für die semiquantitative Analyse genutzt wurden, entsprachen NR2 Dg up: 5´-G(GC)T TCT G(CT)A T(CT)G ACATCC-3´ in Kombination mit einem spezifischen Primer für die NMDA Rezeptor NR2 Untereinheiten cDNA Amplifizierung:

NR2A lo: 5´-GTG AGC CCA CAG CCA TGA CT-3´;

NR2B lo: 5´-TAG GCC CTC TTC ATG ACC A-3´;

NR2C lo: 5´-CCA TGT CTG CCC GCT TGT A-3´;

ChAT up: 5´-ATG GCC ATT GAC AAC CAT CTT CTG-3´,

ChAT lo: 5´-AAC AAG GCT CGC TCC CAC AGC TTC-3´;

β-actin up: 5´-CGT GAA AAG ATG ACC CAG ATC ATG TT-3´,

β-actin lo: 5´-GCT CAT TGC CGA TAG TGA TGA CCT G-3´.

Die Primer, die in der Reaktion genutzt wurden, waren so konzipiert, dass die amplifizierten cDNA Fragmente entweder Introne enthielten oder ein Primer jedes Paares die Bindungsstelle des Exons abdeckte, damit die genomische DNA

Amplifizierung vermieden werden konnte. Die Reaktionen wurden in „MicroAmp 96-Well Plates“ oder in optischen Röhren, die mit „MicroAmp Optical Caps“ abgedeckt waren, durchgeführt. Die Reaktionen wurden zuerst bei 50 °C 2 Minuten lang inkubiert, um die Uracil N'-glycosylase zu aktivieren, und dann 10 Minuten lang bei 95 °C, um die Uracil N'-glycosylase zu deaktivieren und die Amplitaq Gold Polymerase zu aktivieren. Hierauf folgten 40 Zyklen à 15 Sekunden bei 95 °C und 1 Minute bei 60 °C. Die PCR Reaktionen wurden dann einem Hitze-Dissoziationsprotokoll (PE Biosystems 5700 Software) unterworfen. Nach dem letzten PCR Zyklus wurden die Reaktionen bei einer Temperatur von 60 bis 95 °C bei 0.03 °C pro Sekunde allmählich hitzedenaturiert. Jedes PCR Produkt wies einen einzelnen Sattelpunkt in den Denaturationskurven auf. Die Identität der PCR Produkte, die die bekannten cDNA Sequenzen enthielten, wurde nach dem Protokoll von Sergeeva und Haas (2001) aufgeschlüsselt. Die erzielten Sequenzen korrespondierten mit jenen, die für Ratten bekannt sind (GenBank, Zugangsnummer): ChAT (XM_224626), NR2A (M91561), NR2B (M91562), NR2C (M91563) und β -actin (13592132). Die Standardkurven der RT-PCR Protokolle mit beiden Primerpaaren, die sequenziell durch Verdünnungen eines cDNA Samples (bis 1:1000) erzielt wurden, wurden für optimal befunden (die Koeffizienten der linearen Regression betragen 0.99, 0.97, 0.99, 0.96 and 0.98 für β -actin, ChAT, NR2A, NR2B und NR2C, $P < 0.01$).

Datenanalyse. Die RT-PCR Daten wurden als ΔR_n Fluoreszenzsignal versus Zykluszahl dargestellt. ΔR_n wurde mit Hilfe der PE Biosystems 5700 Software kalkuliert, wobei die Gleichung $\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-)$ verwendet wurde. R_n^+ steht für das Fluoreszenzsignal eines Produktes zu einem bestimmten Zeitpunkt und R_n^- für das Fluoreszenzsignal während der Zyklen 6 und 15, die als Baseline festgelegt wurden. Eine willkürlich determinierte Schwelle wurde beim Mittelpunkt des Plots $\log \Delta R_n$ versus Zykluszahl festgelegt. Der C_t -Wert wurde als jene Zykluszahl bestimmt, bei der ΔR_n die Schwelle überschritt. Der „Fold Change“ bei der ChAT (sowie der NMDA-NR2 Untereinheiten) cDNA (das Targetgen) wurde in Relation zu β -actin (die endogene Kontrolle) berechnet: $\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$, wobei $\Delta\Delta C_t = (C_{t\text{Target}} - C_{t\text{Actin}})_{\text{Zeitpunkt } x} - (C_{t\text{Target}} - C_{t\text{Actin}})_{\text{Zeitpunkt } 0}$ ist. Hierbei steht Zeitpunkt x für einen beliebigen Zeitpunkt und Zeitpunkt 0 für die einmalige Expression jedes Gens unter Serumentzug. Die relative Quantifizierung der Gen Expression mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -

Methode korrelierte mit der absoluten Gen Quantifizierung, die in Standardkurven erzielt werden (Winer et al., 1999).

3.2.3.6 Statistische Analysen

Die Schwimmzeiten zur verborgenen Plattform und die prozentualen Aufenthaltszeiten im Plattformquadranten sowie im äußeren Ring des Labyrinths wurden für jeden Trainingstag gemittelt. Für die statistischen Analysen wurden für jede der Variablen die Werte der einzelnen Trainingstage gemittelt, so dass ein Gesamtwert für jedes Tier ($n = 14$) erhoben werden konnte.

Für Gruppenvergleiche wurden Mann-Whitney oder ANOVA Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt. Parametrische Tests wurden angewandt, wenn die Stichprobenverteilungen den Annahmen der Normalität und Homogenität entsprachen. Als Test für die Normalität wurde der Shapiro-Wilks-Test angewandt und im Fall der Homogenität wurde die Levene-Statistik genutzt. Eine Alpha-Adjustierung nach Bonferroni wurde separat für die elektrophysiologischen Daten, Gen Expressionsanalysen und die einzelnen Verhaltenstests durchgeführt (siehe Ergebnisteil).

Auf ähnliche Weise wurden die Rangordnungskorrelation nach Spearman [gekennzeichnet als $r(S)$] oder die Pearson-Korrelation [gekennzeichnet als $r(P)$] durchgeführt, um die Zusammenhänge zwischen den Variablen zu überprüfen. Jede Stichprobenverteilung musste normal verteilt sein, damit parametrisch getestet werden konnte. Die Korrelationsanalysen wurden separat für die Gruppen der besseren und schlechteren Lerner durchgeführt. Aufgrund der Vielzahl der vorgenommenen Korrelationen wurden die erzielten P -Werte lediglich als Effektmaß dargestellt. Unter Berücksichtigung möglicher Typ I Fehler wurden P -Werte ≤ 0.05 als Indikator für einen Effekt gewertet.

3.2.4 Ergebnisse

3.2.4.1 Das Wasserlabyrinth

Die Ergebnisse der Lernleistungen der besseren und schlechteren Lerner im Wasserlabyrinth wurden schon detailliert unter Punkt 3.1 in Zusammenhang mit den aus hippocampalen Gewebeschnitten gewonnenen LTP Daten beschrieben, so dass diese hier nur kurz zusammengefasst werden (siehe Abb. 1). (Es wird darauf hingewiesen, dass die Ergebnisse, die hier über LTP im Striatum berichtet werden, in einem anderen Labor und unabhängig von den Hippocampusdaten erhoben

wurden.) Kurz gesagt, wie mit dem Versuchsdesign beabsichtigt, benötigten die besseren Lerner signifikant (bei einem Signifikanzniveau von $P \leq 0.008$) weniger Zeit, auf die verborgene Plattform zu entkommen als die schlechteren Lerner [$F(1,12) = 51.69$, $p = 0.000005$, einseitig] (Abb. 1A). Die beiden Lernergruppen stellten demnach ihrer Performanz nach zwei Extreme dar, die für weitere Vergleiche genutzt werden konnten. Die besseren Lerner wiesen ebenfalls eine höhere Platzpräferenz für den Plattformquadranten während der Akquisitionstage 5-9 auf ($P = 0.04$, Mann-Whitney Test) (Abb. 1B) und eine signifikant niedrigere Präferenz für den äußeren Ring des Labyrinths während der gesamten Testtage [$F(1,12) = 13.38$, $p = 0.003$] (Abb. 1C).

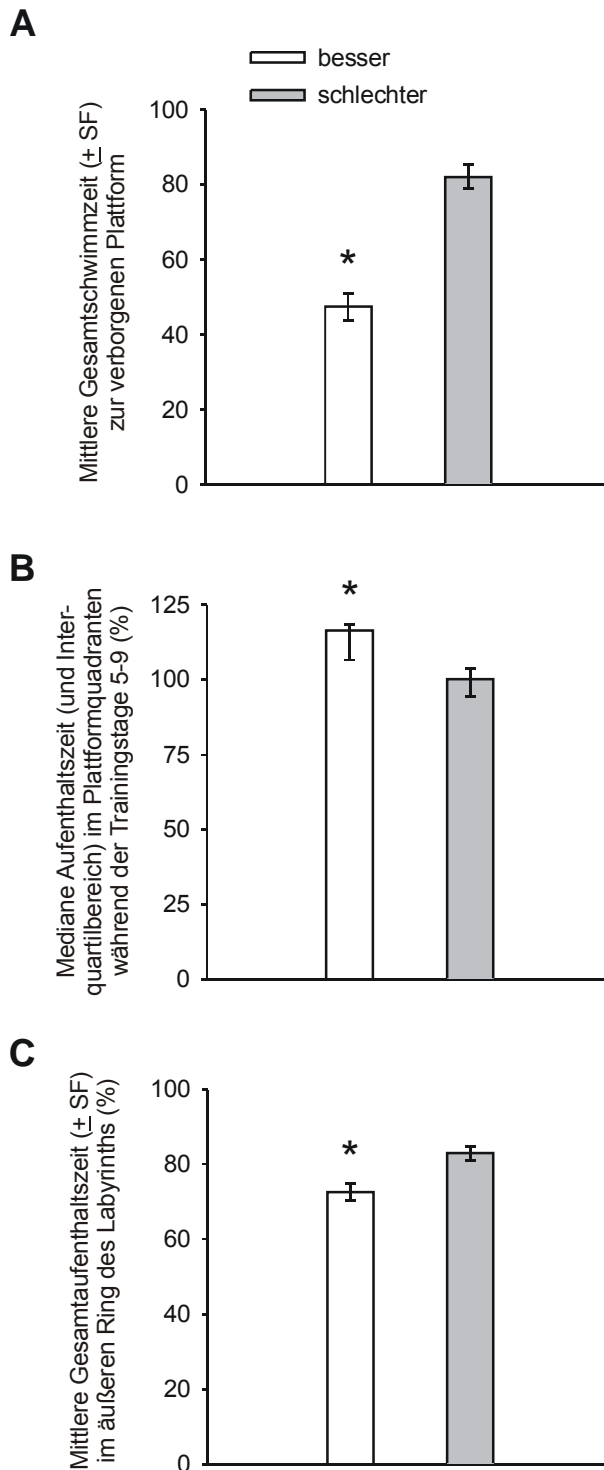


Abb. 1. Lernen im Wasserlabyrinth. (A) Die mittleren (\pm SF) Schwimmzeiten zur verborgenen Plattform pro Tag (basierend auf jeweils 4 Versuchsdurchgängen) wurden für die besseren ($n = 7$) und schlechteren ($n = 7$) Lerner über neun Trainingstage hinweg gemittelt. Ein Vergleich der Gruppen hinsichtlich der Gesamtwerte (Mittel \pm SF) zeigte, dass die besseren Lerner signifikant weniger Zeit als die schlechteren Lerner benötigten, um auf die Plattform zu entkommen ($*P = < 0.008$). (B) Die mittleren (\pm SF) Aufenthaltszeiten im Plattformquadranten (% der Schwimmdauer zur verborgenen Plattform) pro Tag wurden einer Baseline (Performanz an Tag 1 = 100%) angeglichen und gemittelt. Ein Vergleich der Mediane der Lernergruppen zeigte, dass die besseren Lerner ($n = 7$) während der Trainingstage 5-9 mehr Zeit im Plattformquadranten verbrachte als die schlechteren Lerner ($n = 7$) ($*P = 0.04$). (C) Die mittleren (\pm SF) Aufenthaltszeiten im äußeren Ring des Labyrinths (% der Schwimmdauer zur verborgenen Plattform) wurden über neun Trainingstage jeweils für die besseren ($n = 7$) und schlechteren ($n = 7$) Lerner gemittelt. Ein Gruppenvergleich hinsichtlich der Gesamtwerte zeigte, dass die besseren Lerner signifikant weniger Zeit im äußeren Ring verbrachten als die schlechteren Lerner ($*P = < 0.008$).

Die beiden Gruppen unterschieden sich (bei einem Signifikanzniveau von $P \leq 0.01$) nicht hinsichtlich der Performanz im Extinktionsdurchgang („Probe Trial“) ($P = 0.75$, Mann-Whitney Test), inklusive der Schwimgeschwindigkeit [$E(1,12) = 1.22$, $P = 0.29$]. Die bessere Lernergruppe unterschied sich (bei einem Signifikanzniveau von

$P \leq 0.004$) ebenfalls nicht von den schlechteren Lernern bezüglich der mittleren Schwimmdauer über 4 Versuchsdurchgänge zur verborgenen Plattform mit Hinweisreiz [$\underline{E}(1,12) = 3.63, P = 0.08$], war hingegen schneller, auf diese zu entkommen, wenn nur die letzten beiden Durchgänge im Mittel betrachtet wurden [$\underline{E}(1,12) = 5.08, P = 0.04$, siehe Punkt 3.1].

3.2.4.2 Das Offenfeld

Wie schon unter Punkt 3.1 erwähnt, unterschieden sich die Lernergruppen (bei einem Signifikanzniveau von $P \leq 0.008$) nicht hinsichtlich der Anzahl der Aufrichtungen an Tag 1 [$\underline{E}(1,12) = 0.32, P = 0.29$, einseitig] und Tag 2 [$\underline{E}(1,12) = 0.36, P = 0.28$, einseitig] der Offenfeldtestungen. Neue Analysen zeigten ebenfalls keinen Gruppenunterschied in der Dauer der Aufrichtungen an Tag 1 [$\underline{E}(1, 12) = 0.58, P = 0.46$] und Tag 2 [$\underline{E}(1, 12) = 0.07, P = 0.80$] oder den Zeitpunkten, an denen eine Aufrichtung zum ersten Mal stattfand (Tag 1: $P = 0.75$ und Tag 2: $P = 0.85$, Mann-Whitney Tests).

3.2.4.3 *In vitro* elektrophysiologische Untersuchungen

Baseline-Messungen im Striatum. Das charakteristische Feldpotenzial, welches durch die Stimulation des kortikalen weißen Gewebes evoziert wurde (Abb. 2A), bestand aus zwei negativen Spikes, wobei der erste ein Faserpotenzial und die direkte Aktivierung der „Medium Spiny“ Neurone abbildete, und der zweite eine synaptisch induzierte Welle (Abb. 2B). Es ergaben sich keine Gruppenunterschiede zwischen den besseren ($42.3 \pm 2.5 \mu\text{A}$) und schlechteren ($40.7 \pm 1.4 \mu\text{A}$) Lernern hinsichtlich der Stimulusintensitäten, die eine minimale synaptische Antwort (1T) evozierten ($P = 0.12$, t -Test). Die Feldpotenziale erreichten ihr Maximum bei Reizschwellenintensitäten von 2.5-3T. Die besseren ($1.13 \pm 0.08 \text{ mV}$, $n = 7$) und schlechteren ($1.33 \pm 0.19 \text{ mV}$, $n = 6$) Lerner unterschieden sich nicht bei den maximalen Amplituden der Feldpotenziale ($P = 0.14$, t -Test). Bei Stimulationsintensitäten $> 3T$ nahmen die Amplituden der Feldpotenziale ab, vielleicht aufgrund einer direkten Aktivierung inhibitorischer Interneurone. Bei beiden Gruppen konnte eine stabile Baseline für mindestens 20 Min. vor Gabe des 100 Hz Tetanus gemessen werden.

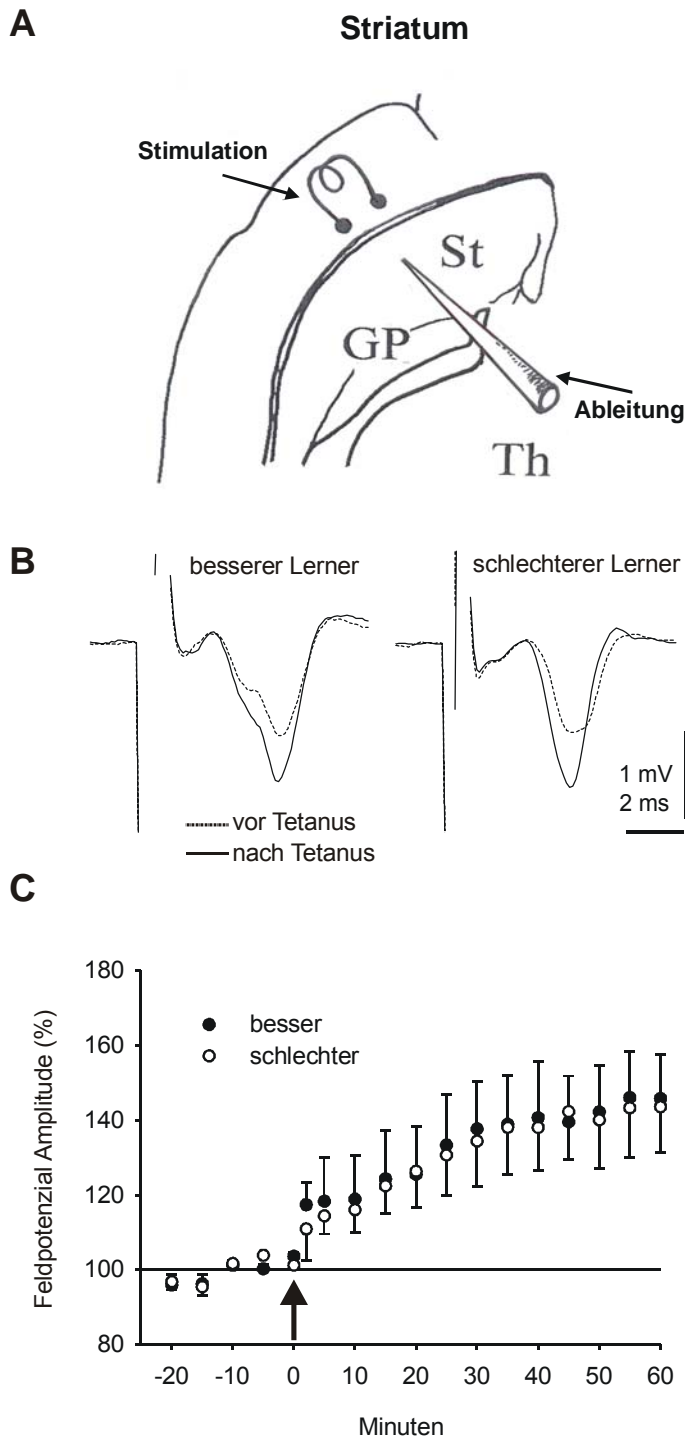


Abb. 2. Synaptische Plastizität im dorsalen Striatum. (A) Corticostriatale Fasern (weißes Gewebe) wurden mit einer bipolaren Reizelektrode stimuliert und Feldpotenziale wurden im dorsalen Striatum gemessen. Der Abstand zwischen Stimulations- und Ableitungselektrode betrug ca. 2 mm. (B) Beispiele von Feldpotenzialen, die in einem besseren (links) und in einem schlechteren (rechts) Lerner gemessen wurden. Die oberen Spuren zeigen Kontrollantworten vor Gabe des Tetanus (50 % der maximalen Amplitude) und die überlagerten unteren Spuren die potenzierten Antworten 55-60 Min. nach dem Tetanus. Jede Spur beträgt ein Durchschnittswert von 10 Antworten. (C) Der zeitliche Verlauf der Antworten in der Gruppe der besseren (n = 7) und schlechteren (n = 6) Lerner. Der Tetanus wurde an Zeitpunkt t = 0 (Pfeil) gegeben. Jeder Punkt repräsentiert einen Durchschnittswert von 10 Antworten, die alle 20 Sekunden gemessen wurden. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der durchschnittlichen (+ und - SF) Feldpotenzial Amplituden während der Baseline dar.

Kurz- und Langzeitpotenzierung im Striatum. Die Kurz- und Langzeitpotenzierung (STP bzw. LTP) wurden im dorsalen Striatum jedes Tieres (n = 13) gemessen. STP und LTP im Mittel (\pm SF) betragen 121.55 (\pm 12.12) bzw. 145.84 (\pm 11.77) in der Gruppe der besseren Lerner (n = 7) und 119.19 (\pm 6.62) bzw. 143.34 (\pm 12.51) in der Gruppe der schlechteren Lerner (n = 6). Wie sich in Abb. 2C zeigt, unterschieden sich die Gruppen weder in Bezug auf STP [$F(1, 11) = 0.03$, $P = 0.44$, einseitig] noch

in Bezug auf LTP ($P = 0.5$, Mann-Whitney Test, einseitig). In beiden Gruppen waren die Amplituden der Feldpotenziale 55-60 Min. (LTP) nach Gabe des Tetanus größer als an Zeitpunkt 0 (Baseline) (bessere Lerner: $[F(1, 6) = 11.41, P = 0.02]$; schlechtere Lerner: $P = 0.046$, Wilcoxon-Test).

3.2.4.4 Die quantitative RT-PCR

ChAT mRNA. Für die Gruppen der besseren ($n = 7$) und schlechteren ($n = 7$) Lerner wurden dann die Mittel (\pm SF) der Gen Expression von ChAT im dorsalen Striatum ermittelt. Wie in Abb. 3A zu sehen ist, exprimierten die besseren Lerner signifikant (bei einem Signifikanzniveau von $P \leq 0.01$) mehr ChAT mRNA als die schlechteren Lerner $[F(1, 12) = 27.06, p = 0.0002]$.

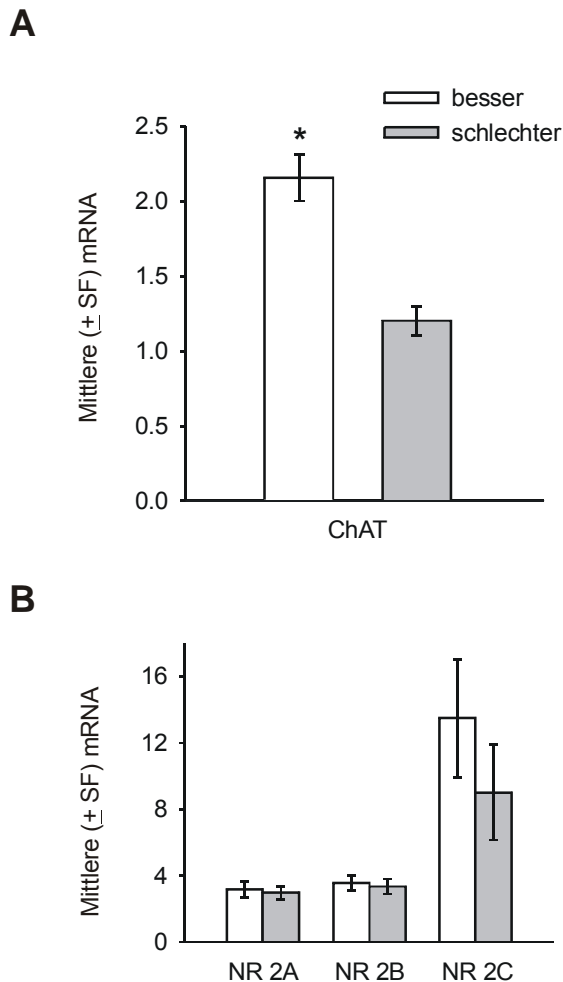


Abb. 3. Gen Expression im dorsalen Striatum. Die Gen Expression von ChAT (A) und den NMDA-NR2 (B) Untereinheiten wurden bei den besseren ($n = 7$) und schlechteren ($n = 7$) Lernern nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ - Methode von Winer et al. (1999) quantifiziert und für jede Gruppe gemittelt. Die besseren Lerner wiesen signifikant mehr ChAT mRNA im Striatum auf als die schlechteren Lerner ($*P < 0.01$). Die Gruppen unterschieden sich nicht hinsichtlich der Menge der mRNA von NR2A, NR2B und NR2C ($P > 0.01$).

NMDA-NR2A, -NR2B und -NR2C mRNA. Überraschenderweise unterschieden sich die Lernergruppen nicht hinsichtlich der Menge der mRNA der NMDA Rezeptoruntereinheiten NR2A $[F(1, 12) = 0.11, P = 0.37, einseitig]$, NR2B $[F(1, 12) =$

0.11, $P = 0.37$, einseitig] und NR2C [$E(1, 12) = 0.97$, $P = 0.17$, einseitig] (siehe Abb. 3B).

3.2.4.5 Korrelationen zwischen STP, LTP, ChAT und den NMDA Untereinheiten NR2A, NR2B und NR2C

Es ist bekannt, dass die Induktion von LTP im Striatum von cholinergen und glutamatergen Eingängen abhängig ist. In der gegenwärtigen Studie wurde untersucht, ob STP und LTP mit der Expression des cholinergen Gens ChAT und den NMDA Rezeptor Untereinheiten NR2A, NR2B und NR2C korreliert. Die Ergebnisse wiesen keine bedeutsamen Korrelationen zwischen den Variablen weder in der Gruppe der besseren Lerner ($0.43 \leq P \leq 0.98$) noch in den schlechteren Lernern ($0.23 \leq P \leq 0.92$) auf. Ähnliche niedrig waren die Korrelationen zwischen der mRNA von ChAT und den NMDA Rezeptor Untereinheiten ($0.4 \leq P \leq 0.73$ bzw. $0.5 \leq P \leq 0.58$ für die Gruppen der besseren bzw. der schlechteren Lerner).

3.2.4.6 Korrelationen zwischen dem Verhalten im Wasserlabyrinth und STP, LTP, ChAT und den NMDA Untereinheiten NR2A, NR2B und NR2C

Um die Hypothesen, dass STP, LTP, ChAT und die NMDA Rezeptor Untereinheiten mit dem Lernen und dem Gedächtnis im Wasserlabyrinth zusammenhängen, zu testen, wurden die verschiedenen Lernparameter, die während der Akquisitionsphase erhoben wurden, d.h. die mittleren Gesamtschwimmzeiten zur verborgenen Plattform, die Aufenthaltszeiten im Plattformquadranten und im äußeren Ring des Labyrinths, sowie die Leistungen während des Probe Trials und der Aufgabe mit sichtbarer Plattformposition mit den oben genannten neuronalen Markern korreliert.

STP und LTP. In der Gruppe der besseren Lerner korrelierte LTP negativ mit den mittleren Gesamtschwimmzeiten (Mittel über neun Trainingstage) zur verborgenen Plattform ($r(P) = -0.84$, $p = 0.02$). Demnach war ein schnelleres Entkommen auf die Plattform mit mehr LTP im Striatum verknüpft. Im Fall von STP betrug der Korrelationskoeffizient -0.71 ($P = 0.07$). Im Gegensatz hierzu waren die Korrelationskoeffizienten in der Gruppe der schlechteren Lerner eher niedrig (STP $r(P) = 0.56$, $P = 0.25$; LTP: $r(S) = 0.06$, $P = 0.91$) (siehe Abb. 4A).

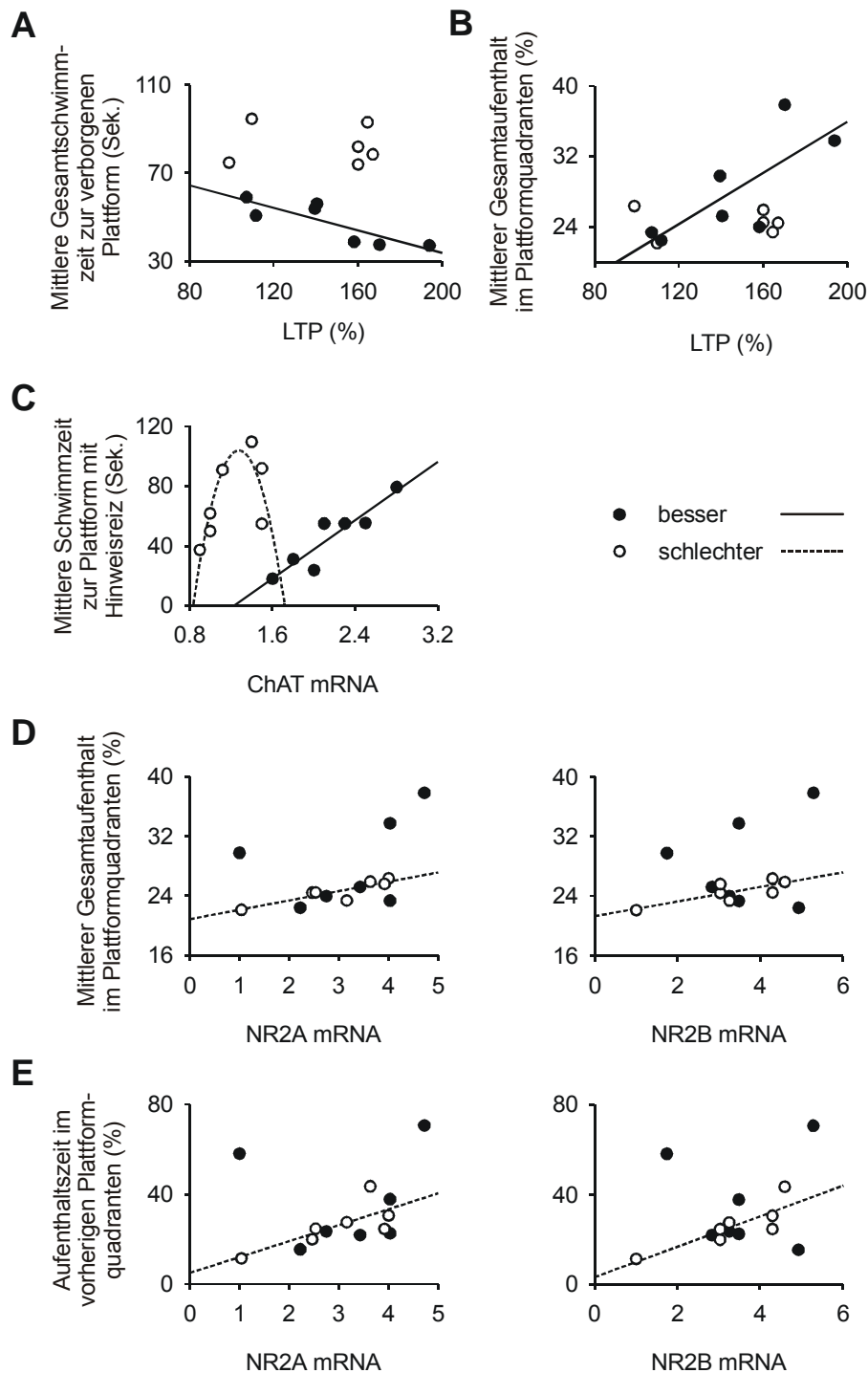


Abb. 4. Korrelationen zwischen der Performanz im Wasserlabyrinth und LTP sowie der mRNA von ChAT und den NMDA-NR2 Untereinheiten im dorsalen Striatum. In der Gruppe der besseren Lerner (n = 7) korrelierte LTP negativ mit den (A) mittleren Gesamtschwimmzeiten zur verborgenen Plattform (mittlere Schwimmzeiten pro Tag im Mittel über neun Trainingstage) und positiv mit den (B) mittleren Gesamtaufenthaltszeiten im Plattformquadranten (mittlere Aufenthaltszeiten pro Tag im Mittel über neun Trainingstage) während der Akquisition (beide P -Werte < 0.05; die Regressionslinien sind für die besseren Lerner aufgezeichnet). In der Gruppe der schlechteren Lerner (n = 6) waren die Korrelationskoeffizienten niedrig ($P > 0.05$). (C) Die mRNA von ChAT im dorsalen Striatum korrelierte in der Gruppe der besseren Lerner (n = 7) positiv mit den mittleren Schwimmzeiten (Mittel über vier

Durchgänge) zur Plattform mit Hinweisreiz ($P < 0.05$). In der Gruppe der schlechteren Lerner ($n = 7$) wurde die Korrelation als quadratische Funktion dargestellt ($P = 0.08$). NMDA-NR2A (D, links) und –NR2B (D, rechts) korrelierten positiv ($P < 0.05$) in der Gruppe der schlechteren Lernern ($n = 7$; Regressionslinien sind für diese Gruppe dargestellt) mit den mittleren Gesamtaufenthaltszeiten im Plattformquadranten während der Akquisition im Wasserlabyrinth. Ebenfalls in der Gruppe der schlechteren Lerner korrelierten NMDA-NR2A (E, links) und –NR2B (E, rechts) mit den Aufenthaltszeiten im vorherigen Plattformquadranten während des Probe Trials ohne Plattform ($P < 0.05$). In der Gruppe der besseren Lerner waren diese Korrelationen nicht bedeutsam ($P > 0.05$).

In der Gruppe der besseren Lerner korrelierten die mittleren Gesamtaufenthaltszeiten im Plattformquadranten während der Akquisition positiv mit STP ($r(P) = 0.75$, $p = 0.05$) und LTP ($r(P) = 0.76$, $p = 0.046$) (siehe Abb. 4B); eine längere Aufenthaltszeit im Plattformquadranten war mit mehr S- und LTP im Striatum assoziiert. In der Gruppe der schlechteren Lerner waren die Korrelationskoeffizienten zwischen den Variablen (STP: $r(P) = -0.65$, $p = 0.16$; LTP: $r(S) = -0.35$, $p = 0.50$) nicht bedeutsam.

Interessanterweise korrelierten die mittleren Gesamtaufenthaltszeiten im äußeren Ring des Labyrinths, ein Lernmaß, welches nicht unbedingt räumlicher Natur ist, weder in der Gruppe der besseren Lerner noch bei den schlechteren Lernern mit STP und LTP [besser: $r(P) = 0.02$, $P = 0.96$ bzw. $r(P) = -0.05$, $P = 0.92$; schlechter: $r(P) = 0.11$, $P = 0.84$ bzw. $r(S) = -0.23$, $P = 0.66$].

Die Korrelationen zwischen der Performanz im Probe Trial und S- und LTP waren ebenfalls nicht bedeutsam, weder in der Gruppe der besseren Lerner [$r(P) = 0.67$, $P = 0.1$ bzw. $r(P) = 0.5$, $P = 0.26$] noch bei den schlechteren Lernern [$r(P) = -0.55$, $P = 0.26$ bzw. $r(S) = -0.17$, $P = 0.74$].

Auch die mittleren Schwimmzeiten zur Plattform mit Hinweisreiz waren nicht offensichtlich mit dem Expressionsgrad von STP und LTP assoziiert, weder bei den besseren [$r(P) = 0.4$, $P = 0.38$ and $r(P) = -0.03$, $P = 0.95$] noch bei den schlechteren Lernern [$r(P) = 0.56$, $P = 0.16$ and $r(S) = 0.64$, $P = 0.17$].

ChAT mRNA. In der Gruppe der besseren Lerner ergab sich eine positive Korrelation zwischen der Gen Expression von ChAT und den Schwimmzeiten zur Plattform mit Hinweisreiz; mehr ChAT mRNA korrelierte mit längeren Schwimmzeiten zur Plattform [$r(P) = 0.92$, $P = 0.003$] (Abb. 4C). Der Korrelationskoeffizient in der Gruppe der schlechteren Lerner betrug $r(P) = 0.58$ ($P = 0.17$). Wie in Abb. 4C zu sehen ist, schien der Zusammenhang zwischen ChAT mRNA und den

Schwimmzeiten zur Plattform bei den schlechteren Lernern kurvenlinear zu sein; indem eine quadratische Funktion den Daten angepasst wurde, konnten 73 % der Varianz im Fluchtverhalten durch die Varianz in der Gen Expression von ChAT erklärt werden ($P = 0.076$).

Alle anderen Verhaltensmaße, die im Wasserlabyrinth erhoben wurden, korrelierten nicht offensichtlich mit der Expression von ChAT, weder bei den besseren ($0.56 \leq P \leq 0.88$) noch bei den schlechteren Lernern ($0.57 \leq P \leq 0.97$).

NMDA-NR2A, *-NR2B* und *-NR2C* mRNA. Im Gegensatz zu den oben genannten Ergebnissen korrelierte die Gen Expression der NMDA Untereinheiten mit der Wasserlabyrinthperformanz bei den schlechteren Lernern. In dieser Gruppe korrelierten mehr NMDA-NR2A und *-NR2B* mRNA mit einer längeren Aufenthaltszeit im Plattformquadranten während der gesamten neun Trainingstage mit verborgener Plattform [$r(P) = 0.88$, $P = 0.009$ bzw. $r(P) = 0.80$, $P = 0.03$] (Abb. 4D) und während des Probe Trials ohne Plattform [$r(P) = 0.76$, $P = 0.048$ bzw. $r(P) = 0.85$, $P = 0.02$] (Abb. 4E). Die Korrelationskoeffizienten $r(P)$ zwischen den Schwimmzeiten zur verborgenen Plattform und der mRNA von NR2A und NR2B im Striatum betragen -0.70 ($P = 0.08$) bzw. -0.72 ($P = 0.07$). In der Gruppe der besseren Lerner hingegen waren die Korrelationskoeffizienten zwischen den Variablen nicht bedeutsam ($0.36 \leq P \leq 0.93$). Die Korrelationen zwischen NR2C und der Performanz im Wasserlabyrinth waren für beide Lernergruppen nicht bedeutsam (besser: $0.43 \leq P \leq 0.98$; schlechter: $0.1 \leq P \leq 0.96$).

3.2.4.7 Korrelationen zwischen der Offenfeldexploration und STP, LTP, ChAT und den NMDA Untereinheiten NR2A, NR2B und NR2C

Als nächstes wurden die oben genannten neuronalen Variablen mit dem Explorationsverhalten im Offenfeld korreliert. In Projekt I (Punkt 3.1) wurde bereits über den Zusammenhang zwischen dem Lernen im Wasserlabyrinth und der Exploration im Offenfeld berichtet.

STP und LTP. In der Gruppe der besseren Lerner korrelierte die Anzahl der Aufrichtungen an Tag 1 und Tag 2 der Offenfeldtestungen positiv mit dem Expressionsgrad von LTP im Striatum [$r(P) = 0.80$, $P = 0.03$ bzw. $r(P) = 0.82$, $P = 0.03$]. Die Korrelationskoeffizienten zwischen STP und den Aufrichtungen betragen 0.42 ($P = 0.35$) an Tag 1 und 0.63 ($P = 0.13$) an Tag 2. Demnach korrelierten mehr Aufrichtungen mit einem höheren Grad an LTP bei den besseren Lernern (Abb. 5A).

Die Korrelationskoeffizienten zwischen den Variablen in der Gruppe der schlechteren Lerner waren hingegen nicht bedeutsam ($0.2 \leq P \leq 0.64$).

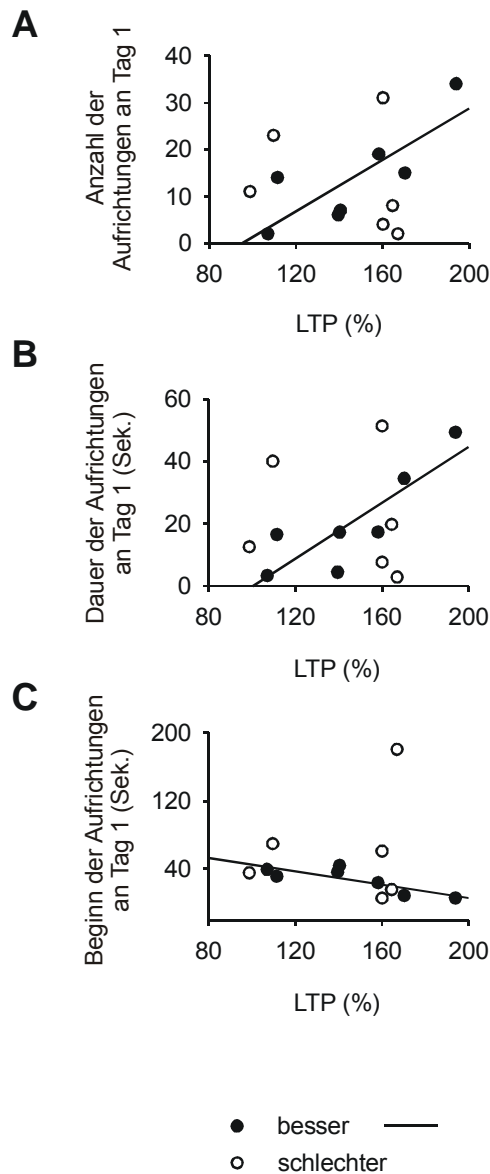


Abb. 5. Korrelationen zwischen der Performanz im Offenfeld und LTP im dorsalen Striatum. LTP im Striatum korrelierte positiv ($P < 0.05$) mit der Anzahl (A) und der Dauer (B) der Aufrichtungen, und negativ ($P < 0.05$) mit dem Beginn (C) der Aufrichtungen in den besseren Lernern ($n = 7$, die Regressionslinien sind für diese Gruppe eingezeichnet) an Tag 1 im Offenfeld. In der Gruppe der schlechteren Lerner waren die Korrelationskoeffizienten zwischen den Variablen nicht bedeutsam ($P > 0.05$).

Ebenfalls in der Gruppe der besseren Lerner korrelierte die Dauer der Aufrichtungen positiv mit LTP [$r(P) = 0.85$, $P = 0.02$] an Tag 1 der Testungen (Abb. 5B). Im Fall von STP betrug die Korrelation 0.61 ($P = 0.15$). Für Tag 2 der Testungen erreichten die Korrelationen zwischen der Dauer der Aufrichtungen und STP und LTP die Werte 0.63 ($P = 0.13$) bzw. 0.71 ($P = 0.08$). In der Gruppe der schlechteren Lerner waren die Korrelationen auch in diesem Fall nicht bedeutsam ($0.46 \leq P \leq 0.74$). Bei den besseren Lernern korrelierte der Beginn der Aufrichtungen (der Zeitpunkt, an dem die erste Aufrichtung zum ersten Mal ausgeführt wurde) negativ mit LTP im Striatum

[$r(P) = -0.82, P = 0.03$]; je früher die Tiere begannen sich aufzurichten, umso mehr LTP wurde gemessen (Abb. 5C). Die Korrelation mit STP betrug $-0.63 (P = 0.13)$. In der Gruppe der schlechteren Lerner waren die Variablen nicht offensichtlich miteinander assoziiert ($0.27 \leq P \leq 0.83$).

ChAT mRNA. Keine der oben genannten Explorationsvariablen schien in einem bedeutsamen Zusammenhang mit der Gen Expression von ChAT im Striatum zu stehen, weder in der Gruppe der besseren Lerner ($0.27 \leq P \leq 0.99$) noch bei den schlechteren Lernern ($0.44 \leq P \leq 0.7$).

NMDA-NR2A, -NR2B und -NR2C mRNA. In der Gruppe der schlechteren Lerner korrelierte die mRNA von NR2A und NR2C mit dem Beginn der Aufrichtungen an Tag 1 [$r(S) = -0.75, P = 0.05$ bzw. $r(S) = -0.86, P = 0.01$]; d.h., mehr NR2A und NR2C mRNA ging mit einem früheren Beginn der Aufrichtungen einher. An Tag 2 erreichten die Korrelationskoeffizienten $r(S)$ die Werte $-0.68 (P = 0.09)$ bzw. $-0.71 (P = 0.07)$. Keine der anderen Variablen korrelierte augenscheinlich miteinander, weder in der Gruppe der schlechteren Lerner ($0.33 \leq P \leq 0.75$) noch bei den besseren Lernern ($0.08 \leq P \leq 0.99$).

Eine Zusammenfassung der Korrelationen, die bei den besseren und schlechteren Lernern einen P -Wert von ≤ 0.05 erreichten, sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1. Zusammenfassung der Korrelationen der besseren (B) und schlechteren (S) Lerner mit P -Werten ≤ 0.05

	GEN EXPRESSION			ELEKTROPHYSIOLOGIE		
	ChAT	NMDA-NR2A	NMDA-NR2B	NMDA-NR2C	STP	LTP
WASSERLABYRINTH						
Schwimmzeiten zur verborgenen Plattform						B (-)
Schwimmzeiten im Plattformquadranten		S (+)	S (+)		B (+)	B (+)
Schwimmzeiten im vorherigen Plattformquadranten (Probe Trial)		S (+)	S (+)			
Schwimmzeiten zur Plattform mit Hinweisreiz (Cued Version)	B (+)					
OFFENFELD						
Anzahl der Aufrichtungen an Tag 1						B (+)
Anzahl der Aufrichtungen an Tag 2						B (+)
Dauer der Aufrichtungen an Tag 1						B (+)
Beginn der Aufrichtungen an Tag 1		S (-)		S (-)		B (-)

TP = Kurzzeitpotenzierung; LTP = Langzeitpotenzierung; ChAT = Cholin Acetyltransferase; (+) = positive Korrelation; (-) = negative Korrelation.

3.2.5 Diskussion

Einer der Hauptbefunde dieser Studie war, dass die besseren und schlechteren Lerner, die sich im Erlernen eines Wasserlabyrinths unterschieden, sich auch in der Gen Expression von ChAT unterschieden, jedoch nicht im Expressionsgrad der NMDA-Untereinheiten oder der STP und LTP im dorsalen Striatum (DS). Der Level der Performanz im Wasserlabyrinth und Offenfeld konnte durch die Varianz in der Gen Expression von ChAT, NMDA-NR2A und -NR2B und den Amplituden von LTP im DS teilweise erklärt werden; in der Gruppe der besseren Lerner korrelierte LTP

positiv mit dem Platzlernen im Wasserlabyrinth und mit dem Explorationsverhalten im Offenfeld. Weniger ChAT mRNA korrelierte mit einem schnelleren Entkommen auf die Plattform mit Hinweisreiz. In der Gruppe der schlechteren Lerner korrelierten NMDA-NR2A und -NR2B positiv mit dem Platzlernen und -gedächtnis im Wasserlabyrinth. Ebenfalls in dieser Gruppe korrelierten NR2A und NR2C negativ mit dem Beginn der Aufrichtungen im Offenfeld.

3.2.5.1 Ein höhere Gen Expression von ChAT im Striatum koinzidiert mit einer besseren Lernleistung in alten Ratten

In mehreren Studien wurde berichtet, dass die Aktivität von ChAT im Striatum bei alten Tieren reduziert, unverändert oder erhöht war im Vergleich zu jungen Tieren (z.B., Ingram et al., 1983; Ogawa et al., 1994; Colombo und Gallagher, 1998; Baxter et al., 1999). Wenn schlechtere alte Lerner mit besseren verglichen wurden, war die Aktivität von ChAT entweder reduziert oder unverändert (Gallagher et al., 1990; Aubert et al., 1995; Stemmelin et al., 2000). Insbesondere die mRNA von ChAT wurde als unverändert befunden, wenn alte mit jungen Ratten verglichen wurden (Ogawa et al., 1994) oder als herunterreguliert in Patienten, bei denen die Alzheimersche Krankheit diagnostiziert wurde (Boissiere et al., 1997). In der gegenwärtigen Studie exprimierten die schlechteren alten Lerner weniger ChAT mRNA im DS als die besseren alten Lerner. Dieses Ergebnis geht mit der allgemeinen Befundlage der Altersforschung einher, die eine verringerte Funktion des cholinergen Systems als einen Faktor ansieht, der zum Auftreten von schweren Demenzen beiträgt (Bartus et al., 1982; Härtig et al., 2002).

Der Gruppenunterschied im Expressionsgrad von ChAT könnte mit mehreren der vorgefundenen Verhaltensdefiziten der schlechteren Lerner einhergehen, z.B. den höheren Schwimmzeiten zur verborgenen und/oder signalisierten Plattform, der Abwesenheit einer Platzpräferenz für den Plattformquadranten, der Persistenz am Beckenrand zu schwimmen und der verringerten Gedächtnisleistung bei einem inhibitorischen Vermeidungslerntest (für den letzteren Befund, siehe Punkt 3.1). Hiermit übereinstimmend wurden im Wasserlabyrinth und im inhibitorischen Vermeidungslerntest Defizite im Flucht- bzw. Vermeidungslernen nach striatalen Läsionen gefunden (Green et al., 1967; Whishaw et al., 1987; Popoli et al., 1994; Devan und White, 1999). Ebenso spielt das Striatum eine wichtige Rolle in der Verarbeitung von Belohnung (Schulz, 1998; Gold, 2003) und könnte daher verschiedene Formen des Lernens über Verstärkungsprozesse beeinflussen, u.a.

das räumliche Lernen; Verstärker könnten als solche funktionieren, indem sie direkt auf Konsolidierungsprozesse Einfluss nehmen (Huston et al., 1977). In der gegenwärtigen Studie korrelierte die mRNA von ChAT jedoch nur mit einer Verhaltensvariable, und zwar mit der Performanz während der Aufgabe mit sichtbarer Plattformposition im Wasserlabyrinth. Diese Assoziation fügt sich mit anderen Befunden zusammen, die auf eine Mitwirkung des striatalen Acetylcholins bei Stimulus-gelenktem Verhalten schließen lassen. Z.B. wurde festgestellt, dass die cholinergen Interneurone des Striatum (TANs) speziell auf sensorische Stimuli antworten, die während des sensorisch-motorischen Lernens Verstärkung signalisieren (Aosaki et al., 1994). Das cholinerge System kann jedoch nicht das einzige System sein, welches die Assoziationen zwischen Stimulus und Verstärkung vermittelt; z.B. sind auch die dopaminergen Neurone des Striatums daran beteiligt, das Lernen von auf Verstärkung hindeutenden Stimuli zu vermitteln. Diese Neurone kodieren Fehler und Unsicherheit bei der Signalisierung von Verstärkung (Schultz, 1998; Waelti et al., 2001; Fiorillo et al., 2003).

Interessanterweise korrelierte der Level der ChAT mRNA bei den besseren Lernern mit längeren Schwimmzeiten zur Plattform mit Hinweisreiz, d.h. einer schlechteren Performanz, obwohl die besseren Lerner als Gruppe mehr ChAT mRNA aufwiesen als die schlechteren Lerner. Bei den schlechteren Lernern schien der Zusammenhang zwischen den Variablen kurvenlinear zu sein. Demnach war der Zusammenhang zwischen der Gen Expression von ChAT und dem Striatum-medierten Lernen bei den alten Tieren nicht-monoton; diese Form der Komplexität in den Zusammenhängen könnte die scheinbaren Widersprüche in der Literatur bezüglich der Rolle von ChAT beim Altern teilweise erklären (Ogawa et al., 1994; Boissiere et al., 1997). Nicht-monotone Zusammenhänge sind bei alten Tieren beispielsweise zwischen dem Lernen im Wasserlabyrinth und der LTP im Hippocampus oder zwischen dem Lernen im Wasserlabyrinth und der Exploration im Offenfeld gefunden worden (für eine detaillierte Beschreibung, siehe Schulz und Huston, 2002; Schulz et al., 2002).

3.2.5.2 Die NMDA-NR2 Rezeptor Untereinheiten mRNA im Striatum korreliert mit dem Verhalten der alten schlechteren Lerner

Der glutamaterge Eingang vom Cortex in das Striatum ist für das Striatum-medierte Lernen von kritischer Bedeutung (Da Cunha et al., 2002). Die Blockade der NMDA Rezeptoren durch Gabe von MK-801 führte vermutlich durch die Blockade des

corticostriatalen glutamatergen Eingangs zu einer vermehrten Lokomotion und einer reduzierten Aufmerksamkeit (Dai und Carey, 1994). Kürzlich wurde auf die differenzielle Beteiligung der NMDA Rezeptor Untereinheiten NR1/NR2A-D ($\zeta 1/\epsilon 1-4$ in Mäusen) an der Hirn- und Verhaltensplastizität hingewiesen. Einige Studien stellten eine Verbindung zwischen der Aktivität von NMDA-NR2B und dem Lernen und Gedächtnis in Rodentien her (Tang et al., 1999), obwohl NR2A auch in Verhaltensvorgängen impliziert wurde (Sakimura et al., 1995; Kiyama et al., 1998). Mit zunehmendem Alter wurde $\epsilon 2$ (NR2B) im Cortex, Striatum und Hippocampus von Mäusen als verringert befunden (Magnusson, 2000). Diese Studien legen nahe, dass sich besser- und schlechterlernende alte Tiere im Expressionsgrad der NR2 Untereinheiten unterscheiden, dies konnte in der gegenwärtigen Studie jedoch nicht verifiziert werden. Es wurden jedoch mehrere Korrelationen zwischen der Untereinheiten mRNA und der Performanz im Wasserlabyrinth und im Offenfeld gefunden.

In der Gruppe der schlechteren Lerner korrelierten NMDA-NR2A und –NR2B mit der Performanz im Wasserlabyrinth, d.h. mit den Aufenthaltszeiten im Plattformquadranten während der Akquisition und mit den Aufenthaltszeiten im vorherigen Plattformquadranten während der Extinktion (Probe Trial); eine bessere Performanz ging mit einem höheren Expressionsgrad einher. Man könnte jedoch hinterfragen, ob die Verhaltensleistungen der schlechteren Lerner tatsächlich eine Varianz der räumlichen Lern- und Gedächtniskapazität darstellen, oder eher eine allgemeine Verhaltensfunktion, da sich die meisten Tiere am oder unter dem Zufallsniveau bewegten. Interessanterweise beobachtete Cain (1998), dass Ratten nach Gabe von NMDA-Antagonisten Defizite im Erlernen der allgemeinen Anforderungen einer Wasserlabyrinthaufgabe zeigten, wie z.B. im Aufklettern auf die Plattform oder von der Wand weg und in das Zentrum des Wasserlabyrinths zu schwimmen, welches nahe legt, dass die Aktivität der NMDA-Rezeptoren wichtig für die Selektion von adaptiven Verhaltensstrategien ist und somit zur optimalen Performanz beiträgt. In der Gruppe der schlechteren Lerner korrelierte auch die Exploration im Offenfeld mit der Gen Expression der NMDA Untereinheiten; mehr NR2A und NR2C mRNA korrelierten mit einem früheren Beginn der Aufrichtungen. Ein früher Beginn einer Aufrichtung könnte auf eine hohe Motivation, die neue Umgebung zu explorieren, hinweisen; eine Interaktion mit Emotionen, wie z.B. Ängstlichkeit, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Man könnte erwarten,

dass Motivationsfaktoren auch der Frequenz oder der Dauer der Aufrichtungen unterliegen würden, diese Variablen korrelierten aber nicht mit der Expression von NR2 bei den schlechteren Lernern. Die Dauer oder die Persistenz explorativen Verhaltens wurde im Vergleich zur Anzahl der Aufrichtungen eher als Indikator für Aufmerksamkeitsprozesse anstelle der reinen Lokomotion interpretiert (Dai und Carey, 1994). Interessanterweise korrelierten in der gegenwärtigen Studie alle drei Explorationsvariablen mit LTP im Striatum in der Gruppe der besseren Lerner.

3.2.5.3 Die Langzeitpotenzierung im Striatum

Die Stimulierung der NMDA- und der M1-ähnlichen muskarinergen Rezeptoren, die sich auf den „Medium Spiny“ Neuronen im Striatum befinden, ist eine Bedingung für die Induktion von LTP an corticostriatalen Synapsen (Calabresi et al., 1992a, 1999; Zhang et al., 2001). Man könnte demnach erwarten, dass der Gruppenunterschied in der Gen Expression von ChAT, der in der gegenwärtigen Studie gefunden wurde, STP und LTP beeinflussen könnte; die besser- und schlechterlernenden alten Tiere exprimierten jedoch ähnlich viel STP und LTP. In anderen Berichten wurde darauf hingewiesen, dass die endogene Ausschüttung von ACh nur für die Potenzierung striataler EPSPs von Bedeutung ist, da M1-Antagonisten zwar die Ausbildung von LTP verhinderten, sich jedoch nicht auf die Baseline EPSPs auswirkten (Calabresi et al., 1999; Centonze et al., 2003). Dieses könnte darauf hindeuten, dass der Level von ACh in der gegenwärtigen Studie während der Tetanisierung in den Lernergruppen nicht unterschiedlich war oder für die Induktion von STP und LTP genügte, obwohl mehr ChAT mRNA in den besseren Lernern zu finden war. Die Level von ChAT korrelierten auch nicht mit STP und LTP, was weiterhin darauf hindeutet, dass die Parameter in ihrer Funktion unabhängig voneinander waren. Funktionelle Differenzen zwischen ChAT und LTP ergaben sich auch durch ihre Zusammenhänge mit unterschiedlichen Verhaltensvariablen; während ChAT mit der Performanz in der Aufgabe mit sichtbarer Plattformposition korrelierte, korrelierte LTP mit dem Platzlernen im Wasserlabyrinth, wobei eine bessere Performanz in den besseren Lernern mit mehr LTP einherging.

In der Gruppe der besseren Lerner korrelierten STP und LTP im Striatum auch mit der Anzahl und Dauer sowie mit dem Beginn der Aufrichtungen im neuen Offenfeld, d.h. mit Markern der Exploration. Bezüglich der schon seit langem geführten Debatte, ob LTP ein neuronales Substrat von Lern-, Gedächtnis- und verwandten Prozessen darstellt (Shors und Matzel, 1997; Martin und Morris, 2002), bekräftigen

die gegenwärtigen Ergebnisse diesen Link, obwohl STP und LTP keine kausalen Faktoren darstellten, welche die Gruppenunterschiede im Verhalten der besseren und schlechteren Lerner erklären konnten. Die Korrelationen zwischen STP, LTP und dem Explorationsverhalten sind besonders interessant hinsichtlich der Prämisse, dass LTP ein Äquivalent eines Aufmerksamkeits- oder Erregbarkeitsapparats sein könnte, der bei Anwesenheit von besonders kritischen Informationen im Umfeld angekurbelt wird (Shors und Matzel, 1997). Obwohl die Exploration dafür ausschlaggebend sein kann, ob und wie gut etwas gelernt wird, ist sie essenziell mit Aufmerksamkeitsprozessen verknüpft (Berlyne, 1966a, b; Berlyne, 1969). Die Abwesenheit ähnlicher Korrelationen in der Gruppe der schlechteren Lerner könnte auf interagierende dritte Variablen hinweisen, die sich auf die Zusammenhänge auswirkten (vergleiche auch Schulz und Huston, 2002; Schulz et al., 2002). Einer dieser Einflüsse könnte von Veränderungen in den Zusammenhängen zwischen der Expression der NMDA Untereinheiten und dem untersuchten Verhalten herrühren, da fast ausschließlich in der Gruppe der schlechteren Lerner Zusammenhänge zwischen den Untereinheiten mRNAs und der Performanz im Wasserlabyrinth und Offenfeld vorhanden waren.

3.2.5.4 Die Informationsverarbeitung im Striatum und Hippocampus verläuft parallel

Die Verhaltensdefizite der schlechteren Lerner, z.B. in der Akquisition des Wasserlabyrinths, könnten auf einer Dysfunktion des Striatums und/oder des Hippocampus basieren. Läsionen beider Strukturen führten zu einer Störung im Platzlernen im Wasserlabyrinth (Sagratella et al., 1994; Popoli et al., 1994; Morris et al., 1982) und Läsionen des Striatums mit quinolinischer Säure führten zu einer selektiven Reduzierung der hochfrequenten Potenzierung im Gyrus dentatus (Sagratella et al., 1994). McDonald und White (1994) stellten die Hypothese auf, dass der Hippocampus und das dorsale Striatum (DS) zwei voneinander unabhängige Gedächtnissysteme darstellen, die parallel an der Informationsverarbeitung teilnehmen. Dieser Ansicht nach verarbeitet und speichert der Hippocampus Informationen über Zusammenhänge zwischen Reizen im Umfeld, während das Striatum mit dem Lernen von S-R Assoziationen verbunden ist, d.h. einer Form des Lernens, bei der ein spezifischer Stimulus eine Reaktion auslöst, die eine Belohnung nach sich zieht. Beide Formen des Lernens könnten bei der Produktion von Verhalten eine synergistische Rolle spielen (Packard und Teather,

1998; Devan und White, 1999) und teilen ähnliche neurochemische Grundlagen, z.B. die Modulation durch Glutamat (Packard und Teather, 1997). In der hiesigen Studie wurden Korrelationen zwischen dem Platzlernen im Wasserlabyrinth, dem Explorationsverhalten im Offenfeld und dem Expressionsgrad von LTP in der Hippocampus-Region CA1 (Schulz et al., 2002) als auch im dorsalen Striatum in denselben Tieren gefunden, d.h. in den besseren Lernern einer Gruppe alter Ratten, die residuale Lernleistungen im Wasserlabyrinth aufwiesen. Dieses deutet daraufhin, dass in diesen Tieren das Erkundungsverhalten sowie das Lernen und Gedächtnis in beiden Hirnstrukturen parallel verarbeitet werden. Diese Auffassung bestätigend fanden wir eine positive Korrelation zwischen STP und LTP in beiden Hirnregionen in derselben Tiergruppe (siehe Abb. 6).

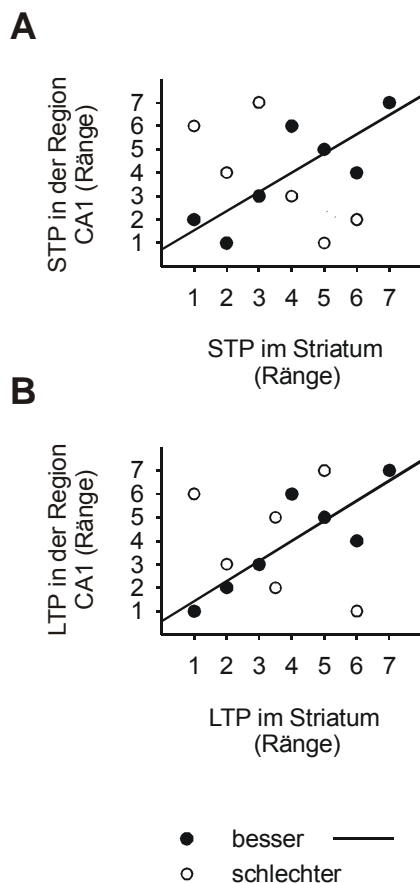


Abb. 6. Korrelationen zwischen S- und LTP im dorsalen Striatum und der Hippocampus-Region CA1. In der Gruppe der besseren Lerner korrelierten (A) STP im Striatum und in der Hippocampus-Region CA1 sowie (B) LTP in diesen Regionen positiv miteinander [$r(S) = 0.82, P = 0.02$ bzw. $r(S) = 0.86, P = 0.01$]. In der Gruppe der schlechteren Lerner waren diese Variablen nicht eindeutig miteinander assoziiert [$r(S) = -0.77, P = 0.07$ bzw. $r(S) = -0.32, P = 0.54$]. Die Daten sind als Ränge dargestellt; niedrigere Ränge stehen für einen hohen Expressionsgrad von S- und LTP. Die Regressionslinien sind zur Illustration für die besserlernenden Tiere aufgezeigt. Die Hippocampus-Daten stammen aus Projekt I (Punkt 3.1).

Zusammenfassend zeigten die Befunde, dass sich alte Tiere mit besseren und schlechteren Lernleistungen im Wasserlabyrinth auch in der Gen Expression von ChAT im DS unterschieden, nicht aber in der Expression der Untereinheiten des NMDA Rezeptors und auch nicht im Expressionsgrad von STP und LTP.

Zusammenhänge zwischen der Performanz im Wasserlabyrinth und Offenfeld und den neuronalen Parametern ergaben sich für die Lernergruppen auf differenzielle Art und Weise; z.B. korrelierte das Platzlernen im Wasserlabyrinth und das Explorationsverhalten im Offenfeld in der Gruppe der besseren Lerner mit LTP, wohingegen die Performanz in denselben Tests in den schlechteren Lernern mit der Expression der NMDA-NR2 Untereinheiten korrelierte. Zusammen mit den unter Punkt 3.1 beschriebenen Daten zeigten die Ergebnisse weiterhin, dass elektrophysiologische Prozesse im Striatum und im Hippocampus ähnliche Aspekte des Verhaltens im Wasserlabyrinth und Offenfeld vermitteln.

3.3 Die „Sliding Window Correlation“ Methode zur Aufdeckung verborgener Korrelationen: Die Existenz von Subgruppen in alten Ratten

3.3.1 Zusammenfassung

Die „Sliding Window Correlation“ Methode wurde von uns entwickelt, um Populationen auf mögliche Heterogenität in den Zusammenhängen zwischen Variablen zu untersuchen. Diese Prozedur beinhaltet die Berechnung von Korrelationskoeffizienten (R) für überlappende, aufeinanderfolgende Segmente covariierender Punktwerte. Die Verteilung der resultierenden R s über die Rangfolge einer Stichprobe kann Fluktuationen im Grad und in der Valenz von R aufzeigen. Die Methode wurde auf Verhaltensdaten alter Ratten angewandt, die entsprechend ihrer Performanz im Wasserlabyrinth rangiert wurden und welche mit der Exploration im Offenfeld und mit dem Konflikt- oder Angstverhalten in einer Black/White Box korreliert wurde. Die Ergebnisse wiesen für verschiedene Segmente der Population im Grad variierende und in der Valenz entgegengesetzte Korrelationskoeffizienten auf, die in Korrelationsanalysen über die gesamte Stichprobe verdeckt blieben. Z.B. waren die R s in den besseren Labyrinthlernern am höchsten bei einem Zusammenhang zwischen besserer Lernfähigkeit, mehr Offenfeldexploration und weniger Angst in der Black/White Box, wohingegen die R s in den mittleren Lernern am höchsten bei einem Zusammenhang zwischen besserer Lernfähigkeit, weniger Offenfeldexploration und mehr Angst in der Black/White Box waren. Demnach kann die „Sliding Window Correlation“ Methode zusammen mit einer gängigen – d.h. die gesamte Stichprobe umfassenden - Korrelationsanalyse angewandt werden, um zu untersuchen, ob und in welchem Bereich einer Werteverteilung etwaige Subgruppen existieren. Dies kann vor allem von Bedeutung sein, wenn Korrelationsanalysen über die gesamte Stichprobe zu keinen signifikanten Ergebnissen führen.

3.3.2 Einleitung

Bei einer Korrelationsanalyse wird im Allgemeinen untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen zwei Datensätzen besteht. Jedoch existiert manchmal ein signifikanter Zusammenhang nur für einen Teil der Stichprobenpunkte, der durch eine Korrelation über die gesamte Stichprobe maskiert werden kann. Alte Tiere weisen z.B. erhebliche interindividuelle Differenzen in Lern- und Gedächtnismaßen auf (Rapp und Amaral, 1992; Hasenöhrle et al., 1997; Sykova et al., 2002). Dies wirft

die Frage auf, ob die Enden der Verteilung, d.h. die besseren und schlechteren Lerner, unterschiedliche Subgruppen von Tieren darstellen (Baxter und Gallagher, 1996). In einem solchen Fall kann erwartet werden, dass sich diese Gruppen in anderen Charakteristiken als im Lernen und Gedächtnis selbst oder dessen neuronalen Äquivalenzen unterscheiden. Ebenso können sich solche Subgruppen auch in den Korrelationen mit anderen behavioralen und biologischen Variablen unterscheiden, z.B. in der Größenordnung (niedrig-hoch) und/oder in der Valenz (positiv-negativ) der Korrelationskoeffizienten (R). Verschiedene Studien zeigten z.B., dass sich bessere und schlechtere alte Lerner in ihrer Reaktivität auf Neuheit (Rowe et al., 1998), in der Wasseraufnahme während des Hell/Dunkel-Zyklus (Gallagher und Burwell, 1989), in der Thigmotaxis im Wasserlabyrinth (Schulz et al., 2002), und in der negativen Feedback-Regulation durch die HPA-Achse (Issa et al., 1990) unterscheiden. Überdies konnten wir kürzlich zeigen, dass der Expressiongrad der Langzeitpotenzierung im Hippocampus und im Striatum, das Explorationsverhalten im Offenfeld und die Lernleistungen im Wasserlabyrinth in alten Tieren miteinander korrelierten, die als bessere Lerner eingestuft waren, nicht aber in Tieren, die als schlechtere Lerner galten (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2004). Besser- und schlechterlernende alte Ratten unterschieden sich ebenfalls in den Korrelationen mit verschiedenen Stresshormonen, wie CORT und ACTH (Meijer et al., 2005).

Obwohl die Durchführung von Korrelationen für einzelne Segmente der Werteverteilung (z.B. für die besseren und schlechteren Lerner) auf mögliche Fluktuationen in der Größenordnung und/oder Valenz von R hinweisen kann, ist dieser Ansatz nicht genügend systematisch. Für den Fall, dass Variationen in R existieren, ist deren genaue Lokalisierung innerhalb der rangierten Werteverteilung wünschenswert. In diesem Bericht stellen wir eine einfache Prozedur dar, die „Sliding Window Correlation“ (SWC) Methode, welche es ermöglicht gegebenenfalls existierende Variationen systematisch aufzudecken. Diese Prozedur beinhaltet die Durchführung von Korrelationsanalysen für teilweise überlappende, aufeinanderfolgende Segmente rangierter Punktwerte und das Plotten der resultierenden R s. Im Folgenden wurde gezeigt, dass diese Prozedur nicht nur das Vorhandensein und den Grad der Heterogenität in einer Co-Variation aufdeckt, sondern auch den Verlauf solcher Interaktionen über die Stichproben rangierter Punktwerte. Um solche Ergebnisse zu illustrieren, wurde die Performanz alter

Ratten, einen Ort im Wasserlabyrinth zu lernen, rangiert und mit dem Explorationsverhalten in einem Offenfeld korreliert. Das Wasserlabyrinthlernen wurde ebenfalls mit der Performanz in einer Black/White Box, einem Test, der Angst und Exploration misst, korreliert.

3.3.3 Materialien und Methoden

3.3.3.1 Die Versuchstiere

Die Experimente wurden entsprechend den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und von der Bezirksregierung Düsseldorf genehmigt. In Experiment 1 wurden 31 männliche, 28-30 Monate alte Wistar-Ratten ($531.77 \text{ g} \pm 12.01 \text{ SF}$) (Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) entsprechend ihrer Lernleistung im Wasserlabyrinth rangiert. Das Lernleistungsvermögen wurde über die durchschnittliche Zeit, die zum Erlernen der Aufgabe benötigt wurde, definiert. In Experiment 2 wurden 27 männliche, 26 Monate alte Wistar-Ratten ($553.70 \text{ g} \pm 14.03 \text{ SF}$) auf dieselbe Weise rangiert. Es wurden nur solche Tiere berücksichtigt, die keine Anzeichen von physischer Schwäche oder Krankheit aufwiesen. Die 31 Tiere des ersten Experimentes wurden in einem 12-stündigem Hell/Dunkel Rhythmus gehalten (Licht an um 07:00 Uhr), wohingegen die 27 Tiere des zweiten Experimentes einem umgekehrten Rhythmus ausgesetzt waren (Licht an um 19:00 Uhr), so dass diese Beobachtungen während der aktiven Nachtphase der Tiere gemacht wurden. Die Experimente 1 und 2 wurden von vornherein für andere Zwecke durchgeführt, so dass jegliche Unterschiede in den Protokollen beabsichtigt waren. Die Tiere wurden in Gruppen mit 2-3 Ratten pro Käfig gehalten. Futter (Altromin, gepresst) und Wasser standen frei zur Verfügung.

3.3.3.2 Das Wasserlabyrinth

Das runde Labyrinth hatte einen Durchmesser von 185 cm und bestand aus schwarzem Polyethylen. Es wurde zu einer Höhe von 30 cm mit $20 \pm 1 \text{ °C}$ warmem Wasser gefüllt. 1.5 cm unter der Wasseroberfläche war eine aus PVC angefertigte Plattform angebracht, deren Durchmesser 18 cm betrug. Die Plattform konnte an vier verschiedene Orte im Labyrinth verschoben werden, jeweils in die Mitte eines Quadranten. Jedem Tier wurde ein zufällig ausgewählter Quadrant (Zielquadrant) zugeteilt, in dem sich die Plattform während der gesamten Akquisitionsphase befand. Zusätzlich wurden vier Startpunkte gewählt, die dem Uhrzeigersinn nach jeweils gleichweit voneinander entfernt waren. Täglich wurden die Tiere einer zufällig

ausgewählten Sequenz entsprechend an jedem der vier Startpunkte einmal in das Labyrinth gelassen. Die Sequenz war für jedes Tier gleich. Hinweisreize in der Umgebung des Labyrinths, wie z.B. Poster, eine Tafel und ein Schrank, dienten zur räumlichen Orientierung. Die Reize wurden von vier 75-W Glühbirnen angestrahlt und hierdurch hervorgehoben. Diffuses Deckenlicht trug ebenfalls zur Beleuchtung des Labyrinths bei und sorgte für eine Helligkeit von ≈ 6.5 Lux auf der Wasseroberfläche. Computerisierte Systeme für die Verhaltensanalyse befanden sich hinter einer Barriere vom Labyrinth entfernt. Eine Kamera war ≈ 2 m über dem Labyrinth angebracht.

Mindestens 30 Minuten vor Beginn der Experimente, wurden die Ratten in einen Warteraum gebracht und bis kurz vor den Testungen in einem Transportkäfig gehalten. Am Anfang eines Versuchsdurchgangs wurden die Tiere einzeln im Labyrinth platziert, wobei sie der Wand des Beckens entgegen blickten. Jedes Tier durchlief einen 2-minütigen Adaptationsdurchgang in Abwesenheit einer Plattform, so dass es sich an die neue Wassersituation gewöhnen konnte und die allgemeine Schwimmfähigkeit überprüft werden konnte. Am nächsten Tag begann das 9-tägige Training mit verborgener Plattform. In dieser Phase hatten die Tiere die Möglichkeit, den Ort der Plattformposition zu erlernen und auf die Plattform zu entkommen. Pro Tag wurden 4 Trainingsdurchgänge durchgeführt. Ein Trainingsdurchgang war beendet, wenn das Tier die Plattform erklimmt hatte oder 2 Minuten verstrichen waren. Nach Ablauf eines 2-Minutenintervalls wurde die Ratte vom Versuchsleiter zur Plattform geleitet. Das Tier verweilte dann 30 Sekunden auf der Plattform. Hiernach wurde das Tier für 60 Sekunden in einem Transportkäfig gehalten und anschließend der nächste Durchgang gestartet. Nach vier Durchgängen in Experiment 1 und nach zwei in Experiment 2 wurden die Ratten mit Papiertüchern abgetupft und durch die Wärme von zwei 75-W Glühbirnen getrocknet. In Experiment 2 wurden jeden dritten Tag zwei Durchgänge am Morgen und zwei am Nachmittag durchgeführt. Alle Versuchsdurchgänge wurden auf Video aufgezeichnet und mit ETHOVISION software (Noldus, Wageningen, Niederlande) analysiert. Die Versuche fanden am Tag zwischen 9.00 und 17.00 Uhr statt.

Für jeden Trainingsdurchgang wurden die Schwimmzeiten und –distanzen bis zum Erreichen der verborgenen Plattform gemessen. Die Schwimmzeiten und –distanzen korrelierten miteinander für jeden Trainingstag (alle P -Werte ≤ 0.000006). Aus diesem Grunde wurden nur die Schwimmzeiten als Index für die Lernleistung

berücksichtigt. Um die Performanz während der gesamten Akquisition zu rangieren, wurden die vier Versuchsdurchgänge pro Tag und alle neun Trainingstage gemittelt (mittlere Gesamtschwimmzeiten).

3.3.3.3 Das Offenfeld

Das Offenfeld bestand aus dunkelgrauem Plexiglas mit einer Bodenfläche von 60 x 60 cm und einer Wandhöhe von 39 cm. Die Arena war nach oben hin offen. Während der Experimente war die Arena dunkel beleuchtet (ca. 0.3 Lux im Zentrum des Offenfeldes). Eine Videokamera (SONY, DCR-TR V20E) hing ca. 1 m über dem Zentrum des Feldes, alle Durchgänge wurden gefilmt. Ein Weitspektrumrauschgenerator erzeugte ein Rauschen von 60 dB.

In Experiment 1 begannen die Offenfeldversuche ca. 4 Tage nach dem Wasserlabyrinthexperiment und in Experiment 2 fanden diese vor dem Wasserlabyrinthtest statt. Die Tiere wurden einzeln im Offenfeld platziert, wobei der Kopf immer einer der Wände entgegen gerichtet war. In Experiment 1 konnten die Tiere das Offenfeld am ersten Testtag für 10 Min. explorieren und in Experiment 2 für 20 Min. Ein zweiter – 24 Std. nach dem ersten stattfindenden - Durchgang dauerte in beiden Experimenten jeweils 10 Min. In Experiment 2 durchliefen die Tiere an einem dritten Testtag eine Objekt Exploration. Experiment 1 fand zwischen 20:00 und 01:00 Uhr und Experiment 2 zwischen 08:00 und 18:00 Uhr statt.

Für die Korrelationsanalysen in diesem Bericht wurde die Anzahl der Aufrichtungen während der ersten 10 Min. am ersten Testtag gemessen. Eine Aufrichtung wurde gezählt, wenn beide Vorderpfoten vom Boden gelöst und in die Luft oder an eine Wand gerichtet waren.

3.3.3.4 Die Black/White Box

Die aus PVC angefertigte Black/White Box (49 x 70 x 58 cm) bestand aus einem schwarzen und einem weißen Abteil, die durch einen offenen Durchgang (9.5 x 9.5 cm) miteinander verbunden waren. Das weiße Abteil (24.5 x 35 x 29 cm) wurde mit einer 25 W Lampe beleuchtet, die ca. 50 cm über dem Boden platziert war. Eine Videokamera (SONY, DCR-TR V20E) hing ca. 1 m über der Box, alle Versuche wurden aufgezeichnet. Ein Weitspektrumrauschgenerator erzeugte ein Rauschen von 60 dB.

Der Test begann ca. 2 Tage nach den Offenfeldversuchen in Experiment 1 und dauerte 10 Min. Ein Tier wurde von einem Transportkäfig aus gegenüber dem

Durchgang in das weiße Abteil gesetzt, dass der Kopf in Richtung Wand zeigte. Die Experimente fanden zwischen 20:00 und 01:00 Uhr statt.

Neben anderen Variablen wurde die Zeit, die insgesamt im schwarzen Abteil verbracht wurde, gemessen und für die Korrelationsanalysen in diesem Bericht verwendet.

3.3.3.5 Die „Sliding Window Correlation“ Methode

Alle 31 Tiere aus Experiment 1 und alle 27 Tiere aus Experiment 2 wurden der Lernfähigkeit nach, d.h. bezüglich der mittleren Gesamtschwimmzeiten zur verborgenen Plattform im Wasserlabyrinth, von gut bis schlecht rangiert. Dann wurden Rangordnungskorrelationen zwischen der Lernfähigkeit und den jeweils zugehörigen Werten einer Co-Variante berechnet und zwar für jeweils zehn Tiere, angefangen bei den ersten zehn und dann der Rangordnung nach, wobei der nächst schlechtere Rang immer mit aufgenommen und der erste Rang des vorherigen Intervalls ausgenommen wurde (Tabelle 1).

Tabelle 1. Die "Sliding Window Correlation" Methode angewandt auf die Rangordnung der im Wasserlabyrinth erbrachten Leistungen, die mit Variable X korreliert wurden.

Co-Variante X	x x
Lernen (rangiert)	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31
Korrelation 1	-----
Korrelation 2	-----
Korrelation 3	-----
	Usw.
	Korrelation 22 -----

Die SWC Methode wurde für die Variablen Lernfähigkeit im Wasserlabyrinth (mittlere Gesamtschwimmzeiten zur verborgenen Plattform) und Exploration im Offenfeld (Anzahl der Aufrichtungen), in den Experimenten 1 und 2 separat durchgeführt. In Experiment 1 wurde die Prozedur ebenfalls für die Variablen Lernfähigkeit im Wasserlabyrinth und Aufenthaltszeit im dunklen Abteil der Black/White Box als Co-Variante durchgeführt.

3.3.3.6 Korrelationen über die gesamte Stichprobe

Um die Zusammenhänge zwischen den oben genannten Variablen für alle Tiere gemeinsam zu untersuchen, wurden ebenfalls Rangordnungskorrelationen nach Spearman durchgeführt, jedoch über die gesamte Stichprobe. Der Shapiro-Wilk Test wurde angewendet, um die Verteilungen der Variablen auf Normalität hin zu überprüfen und ergab P -Werte ≥ 0.05 (das Signifikanzniveau) für die Variablen Wasserlabyrinthlernen und Angst in der Black/White Box in Experiment 1 sowie für die Variablen Wasserlabyrinthlernen und Offenfeldexploration in Experiment 2. Für diese Variablen wurden ebenfalls Regressionsanalysen für lineare und kurvenlineare Funktionen durchgeführt, logarithmische, inverse, quadratische, kubische und exponentielle Funktionen miteingenommen.

3.3.4 Ergebnisse

Die Verteilungen der Variablen Wasserlabyrinthlernen (niedrigere mittlere Gesamtschwimmzeiten zeigen besseres Lernen an) und Offenfeldexploration (Anzahl der Aufrichtungen) sind für die Tiere beider Experimente in Abb. 1 aufgeführt. Die Mittelwerte (\pm SF) der jeweiligen Verteilungen sind ebenfalls dargestellt.

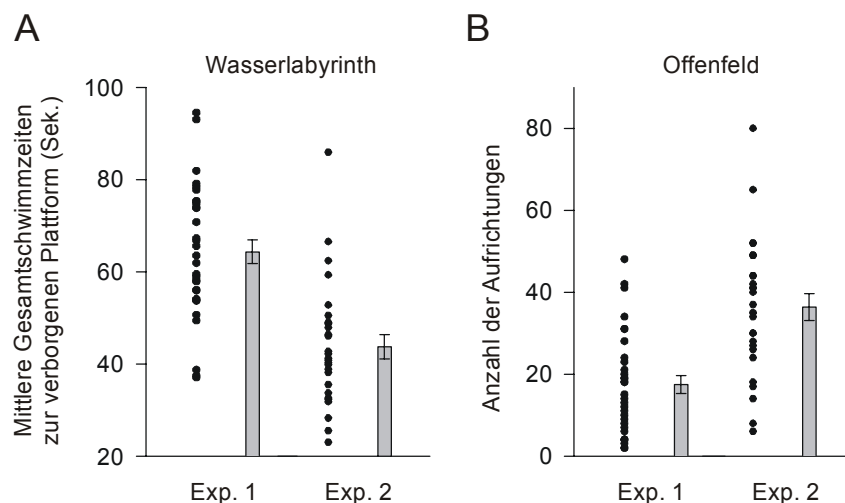


Abb. 1. Wasserlabyrinthlernen und Offenfeldexploration in alten Ratten. Die Werteverteilungen und Mittelwerte (\pm SF) der Variablen Wasserlabyrinthlernen und Offenfeldexploration sind separat für Experiment 1 ($n = 31$) und Experiment 2 ($n = 27$) dargestellt. Die mittleren Schwimmzeiten zur verborgenen Plattform im Wasserlabyrinth wurden für neun Trainingstage gemittelt und sind als mittlere Gesamtschwimmzeiten dargestellt. Die Anzahl der Aufrichtungen als Index für exploratives Verhalten wurden in einem für die Tiere neuen Offenfeld gemessen.

Anschließend wurden Korrelationsanalysen über die gesamte Stichprobe durchgeführt. Sie ergaben keine bedeutsame Korrelation zwischen dem Lernen im Wasserlabyrinth (mittlere Gesamtschwimmzeiten) und der Exploration im Offenfeld (Anzahl der Aufrichtungen) ($r = -0.09$; $P = 0.6$) in Experiment 1 (Abb. 2A). In Experiment 2 (Abb. 2B) betrug der Korrelationskoeffizient 0.3 ($P = 0.1$).

Da die Werte der Variablen in Experiment 2 normal verteilt waren, wurden ebenfalls Regressionsanalysen durchgeführt. Von den untersuchten Funktionen (linear und kurvenlinear) näherten sich die lineare, logarithmische, quadratische und kubische Funktion unseren Daten am Besten an: es wurden jedoch nur 12 % der Varianz in der Offenfeldexploration durch die Varianz im Wasserlabyrinthlernen erklärt (Abb. 2B).

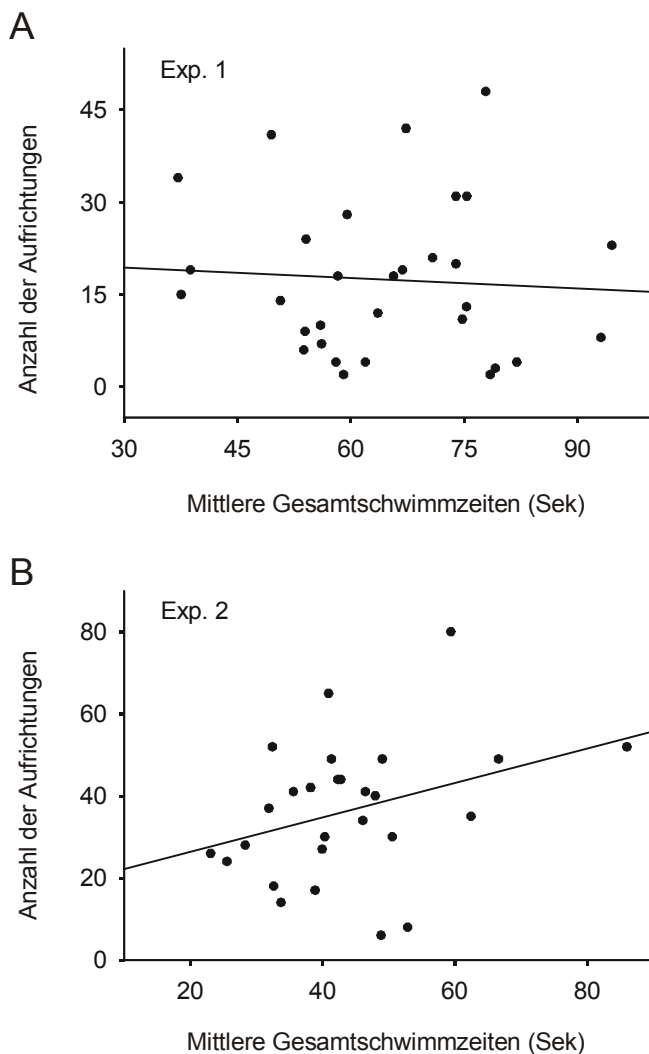


Abb. 2. Korrelationsanalysen über die gesamte Stichprobe zwischen den Variablen Wasserlabyrinthlernen und Offenfeldexploration. Die mittleren Gesamtschwimmzeiten zur verborgenen Plattform im Wasserlabyrinth und die Anzahl der Aufrichtungen im Offenfeld wurden jeweils für die Tiere aus Experiment 1 ($n = 31$) (A) und Experiment 2 ($n = 27$) (B) korreliert. Zur Illustration wurden lineare Regressionslinien an die Daten angepasst. Rangordnungskorrelationen nach Spearman wurden durchgeführt und ergaben P -Werte > 0.05 in beiden Experimenten.

Die SWC Methode, die für die Variablen Wasserlabyrinthlernen und Offenfeldexploration als Co-Variante durchgeführt wurde, ergab 22 Korrelationskoeffizienten in Experiment 1 (Abb. 3A) und 18 in Experiment 2 (Abb. 3B). Die Koeffizienten wurden für jedes Intervall mit 10 Tieren auf der Y-Axe aufgezeichnet, wobei sich die Intervalle auf der X-Achse der Rangordnung nach vom besseren zum schlechteren Lernen bewegen.

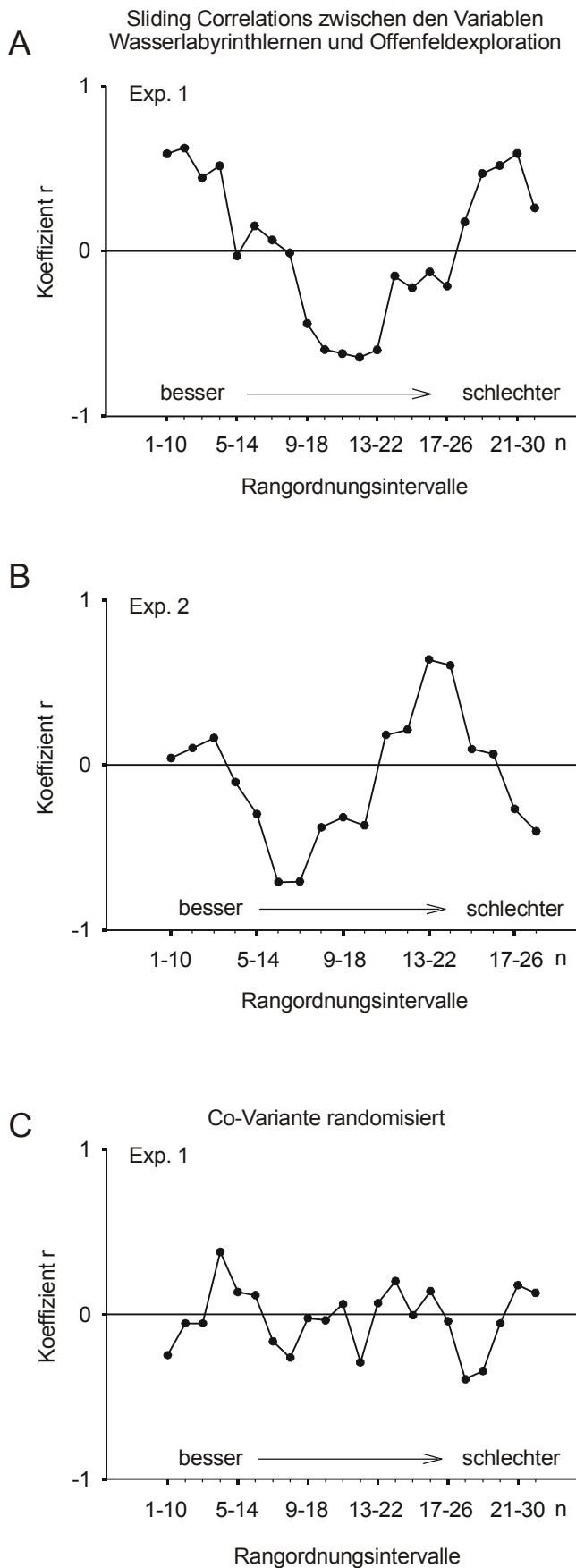


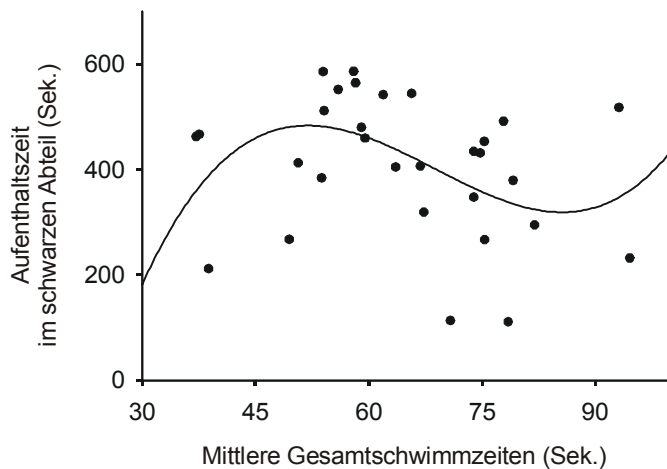
Abb. 3. Sliding Correlations zwischen den Variablen Wasserlabyrinthlernen und Offenfeldexploration. In Experiment 1 (A) ergab die SWC Methode 22 Rangordnungskoeffizienten zwischen den Variablen Lernen im Wasserlabyrinth und Exploration im Offenfeld und 18 in Experiment 2 (B), wobei ein Koeffizient für je ein Intervall mit 10 Tieren steht, die der Rangordnung im Lernen nach von besser bis schlechter rangiert wurden. Die Korrelationskoeffizienten (R_s) wurden auf der Y-Axe aufgetragen. In beiden Experimenten zeigten positive R_s , dass besseres Lernen im Wasserlabyrinth (abgeleitet von den mittleren Gesamtschwimmzeiten zur verborgenen Plattform) mit mehr Explorationsverhalten (Anzahl der Aufrichtungen im Offenfeld) korrelierte. Negative R_s zeigten, dass besseres Lernen im Wasserlabyrinth mit weniger Explorationsverhalten korrelierte. Eine Sliding Correlation „Kontrolle“ wurde ebenfalls durchgeführt (C), indem die Performanz im Offenfeld randomisiert und wie zuvor mit dem Verhalten im Wasserlabyrinth für jedes Intervall korreliert wurde. Die resultierenden R_s waren, wie erwartet, zufällig über das Koordinatensystem verstreut.

Die Ergebnisse weisen komplexe Verteilungen der Korrelationskoeffizienten über die Rangordnungen der alten Ratten in beiden Experimenten auf. In beiden Experimenten erreichten die R_s hohe positive Werte (wobei besseres Lernen mit mehr Exploration korrelierte) sowie hohe negative Werte (wobei besseres Lernen mit weniger Exploration korrelierte). In Experiment 1, im Bereich der besseren Lerner, waren die höchsten R_s positiv; für diese Tiere korrelierte besseres Lernen mit mehr Exploration im Offenfeld. Im Bereich der mittleren Lerner waren die höchsten R_s negativ, so dass besseres Lernen mit weniger Exploration einherging. Bei den eher schlechteren Lernern befanden sich die Koeffizienten hauptsächlich im positiven Bereich. In Experiment 2, im Bereich der mittleren Lerner, waren die höchsten R_s ebenfalls negativ, so dass besseres Lernen mit weniger Exploration einherging. Im schlechteren Lernbereich waren die Koeffizienten positiv und negativ. Folglich deuten beide Experimente auf die mögliche Existenz von unterschiedlichen Subgruppen alter Tiere hin, für die der Grad der Lernfähigkeit entweder mit mehr oder mit weniger Explorationsverhalten assoziiert war. Um zu untersuchen, ob die Heterogenität innerhalb der Verteilungen von R auf Zufall beruhte, bildeten wir eine zufällige Werteverteilung der Offenfelddaten und führten die SWC Methode wie zuvor durch. Die Ergebnisse in Abb. 3C zeigen eine auf Zufall basierende Verteilung von R_s zwischen der Rangordnungsvariable Wasserlabyrinthlernen und einer randomisierten Co-Variante. In diesem Fall betrug der Korrelationskoeffizient für die gesamte Stichprobe -0.04 ($P = 0.82$).

Für die Tiere aus Experiment 1 wurden ebenfalls die Variablen Wasserlabyrinthlernen und Angst in einer Black/White Box, d.h. die Aufenthaltszeiten im schwarzen Abteil, miteinander korreliert. Eine Analyse über die gesamte Stichprobe ergab einen Koeffizienten von -0.3 ($P = 0.1$). Regressionsanalysen für diese Variablen zeigten, dass die kubische Linie den Datenverlauf am Besten anpassen konnte: 18% der Varianz im Verhalten in der Black/White Box konnte durch die Varianz im Wasserlabyrinthlernen erklärt werden (im Vergleich zu 6% bei einer geraden Linie) (Abb. 4A).

A

Korrelation über die gesamte Stichprobe zwischen den Variablen Lernen im Wasserlabyrinth und Aufenthaltszeit im schwarzen Abteil der Black/White Box



B

Sliding Correlations zwischen den Variablen Wasserlabyrinthlernen und Aufenthaltszeit im schwarzen Abteil der Black/White Box

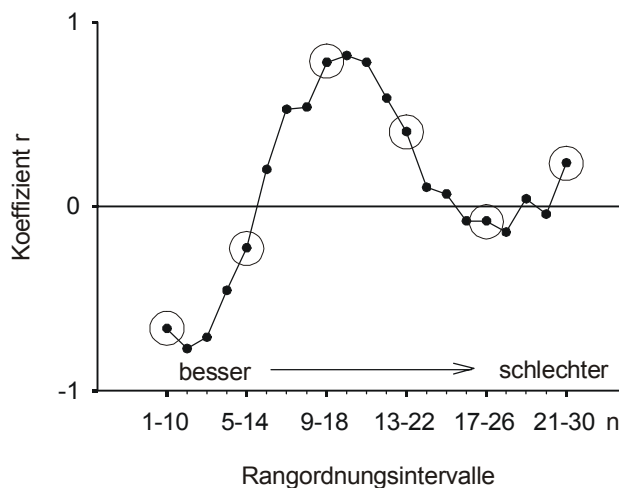


Abb. 4. Korrelationen zwischen den Variablen Wasserlabyrinthlernen und Aufenthaltszeit im dunklen Abteil einer Black/White Box. (A) Eine Rangordnungskorrelation nach Spearman über die gesamte Stichprobe aus Experiment 1 ($n = 30$) zwischen den Variablen mittlere Gesamtschwimmzeit (Sek.) zur verborgenen Plattform im Wasserlabyrinth und Aufenthaltszeit (Sek.) im schwarzen Abteil einer Black/White Box ergab einen P-Wert > 0.05 . Zur Illustration wurden die Rohdaten aufgezeichnet und eine kubische Regressionslinie den Daten angepasst. (B) Die SWC Methode ergab 21 Rangordnungskoeffizienten zwischen den Variablen Lernen im Wasserlabyrinth (abgeleitet von den mittleren Gesamtschwimmzeiten) und Aufenthaltszeit im schwarzen Abteil der Black/White Box, wobei ein Koeffizient für jeweils ein Intervall mit zehn Tieren steht. Ein positiver Koeffizient zeigt an, dass besseres Lernen im Wasserlabyrinth mit mehr Aufenthaltszeit im dunklen Abteil korrelierte, wohingegen eine negative Korrelation anzeigt, dass besseres Lernen im Wasserlabyrinth mit weniger Aufenthaltszeit im schwarzen Abteil einherging. Die Kreise (O) weisen auf die Topographie einer Korrelationsverteilung hin, die entstehen würde, wenn die Anzahl zu welcher jedes Tier zu den Analysen beiträgt reduziert würde, indem man in Vierer- anstelle von Einzelschritten die Rangordnung hinabgleiten würde.

Im Anschluss wurde die SWC Methode angewendet, deren Ergebnisse in Abb. 4B zu sehen sind. Wie zuvor erstreckten sich die Korrelationskoeffizienten von stark negativ bis stark positiv. Im Bereich der besseren Lerner wiesen die höchsten R_s einen Zusammenhang zwischen besserem Lernen im Wasserlabyrinth und weniger Aufenthaltszeit im schwarzen Anteil der Black/White Box auf, wohingegen im Bereich der mittelmäßigen Lerner die höchsten R_s einen Zusammenhang zwischen besserer Lernfähigkeit und mehr Aufenthalt im schwarzen Anteil aufwiesen. Für extrem schlechte Lerner konnten nur niedrige R_s zwischen den Variablen festgestellt werden. Eine SWC Kontrolle wurde in Abb. 4B in Form von Kreisen für jedes vierte Intervall der Korrelationsverteilung eingezeichnet. Würde man nur die eingekreisten R_s betrachten, läge eine geringere Teilnahmehäufigkeit der jeweiligen Tiere an den Korrelationsanalysen vor, wobei die Größe der Intervalle konstant gehalten würde ($n = 10$). Auf diese Art wurde die allgemeine Topographie der Verteilung beibehalten, Informationen bezüglich der Breite der Sattelpunkte gingen jedoch hierbei verloren.

3.3.4.1 Zusammenhänge zwischen Exploration und Angst in Abhängigkeit von der Lernfähigkeit

Es wird angenommen, dass die Black/White Box einen Konflikt auslöst zwischen der Motivation eine neue Umgebung zu explorieren und der Präferenz, im schwarzen Anteil zu verweilen, die ein Indikator für Angst darstellt. Daher hypothetisierten wir, dass das Explorationsverhalten im Offenfeld in einem Zusammenhang mit dem Verhalten in der Black/White Box steht. Eine Korrelationsanalyse zwischen den Variablen, die über die gesamte Stichprobe durchgeführt wurde, ergab einen Koeffizienten von -0.2 ($P = 0.3$). Die Daten sind in Abb. 5A dargestellt.

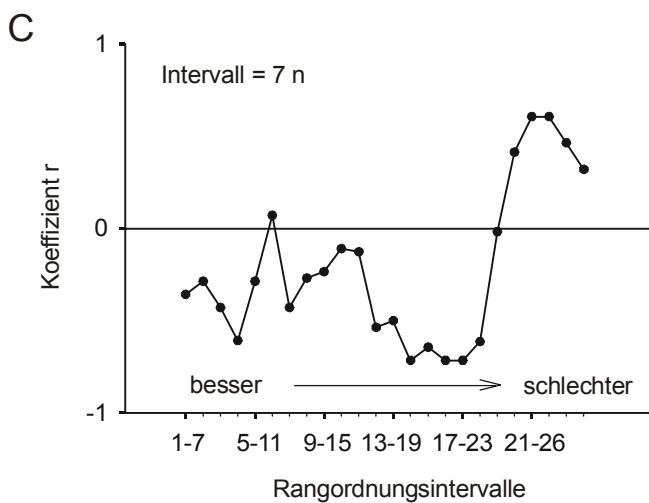
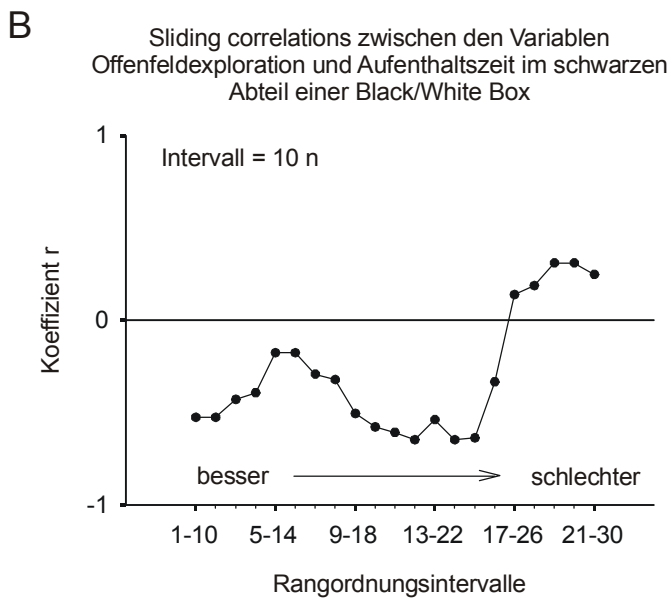
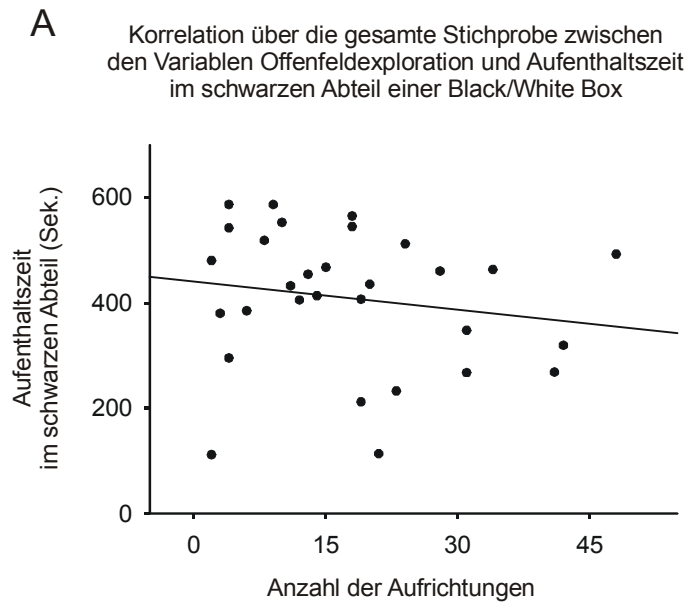


Abb. 5. Korrelationen zwischen den Variablen Offenfeldexploration und Aufenthaltszeit im dunklen Abteil einer Black/White Box. (A) Korrelation zwischen den Variablen Anzahl der Aufrichtungen im Offenfeld und Aufenthaltszeit im schwarzen Abteil einer Black/White Box über die gesamte Stichprobe aus Experiment 1 ($n = 30$) ($P > 0.05$). Zur Illustration wurden Rohdaten aufgezeichnet und eine lineare Regressionslinie an die Daten angepasst. (B) Für die SWC Methode wurden die Tiere dem Lernvermögen im Wasserlabyrinth nach von besser bis schlechter rangiert und die Korrelationen zwischen den Variablen Anzahl der Aufrichtungen im Offenfeld und Aufenthaltszeit (Sek.) im dunklen Abteil der Black/White Box durchgeführt. Die Prozedur ergab 21 Korrelationskoeffizienten, einen für jedes Intervall mit zehn Tieren. (C) Die SWC Methode wurde für dieselben Variablen wie in (B) durchgeführt, jedoch mit einer Intervallgröße von jeweils sieben Tieren. In den Korrelationsverteilungen (B) und (C) deutet ein positiver Koeffizient auf einen Zusammenhang zwischen mehr Exploration und mehr Aufenthaltszeit im dunklen Abteil hin, wohingegen ein negativer Koeffizient auf einen Zusammenhang zwischen mehr Exploration und weniger Aufenthaltszeit im dunklen Abteil hindeutet.

Eine weitere Anwendung der SWC Methode besteht darin, die Zusammenhänge zweier Variablen als Korrelationsverteilung darzustellen, die für die Intervalle einer dritten Variablen berechnet wurden. Hier wurde untersucht, zu welchem Ausmaß Exploration und Angst miteinander über die Ränge des Wasserlabyrinthlernens korrelieren (Abb. 5B). Für die besseren und mittleren Lerner der Rangfolge waren die R_s im negativen Bereich, d.h. mehr Aufrichtungen im Offenfeld korrelierten mit weniger Aufenthaltszeit im schwarzen Abteil der Black/White Box. Für die schlechteren Lerner waren die R_s im positiven Bereich.

Für die - mit denen in Abb. 5B identischen - Variablen wurden die R_s ebenfalls für eine Intervallgröße von sieben anstelle von zehn Tieren berechnet. Ein kleineres Intervall wurde genutzt, um eine detailliertere Korrelationsverteilung zu erhalten. Die Ergebnisse in Abb. 5C zeigen eine ähnliche Verteilung von R_s wie jene, die mit einem größeren Intervall gewonnen wurden. Einige der Koeffizienten, vor allem im Bereich der mittleren und schlechteren Lerner, wurden größer. Die eher niedrigeren Koeffizienten, z.B. im Bereich der besseren Lerner, wurden kleiner.

3.3.5 Diskussion

Die gegenwärtigen Experimente untersuchten die Zusammenhänge zwischen den Variablen Wasserlabyrinthlernen, Exploration eines neuen Offenfeldes und Angst in einer Black/White Box, um die SWC Methode zu illustrieren. Im Gegensatz zur Korrelationsanalyse über die gesamte Stichprobe untersucht die SWC Methode Zusammenhänge zwischen Variablen für aufeinanderfolgende Segmente einer Werteverteilung. Durch die Anwendung der SWC Methode konnten Korrelationen aufgedeckt werden, deren Größe und Valenz über die Rangordnung alter Tiere hinweg variierten und die im Verborgenen blieben, wenn eine Korrelationsanalyse über die gesamte Stichprobe angewendet wurde. Während die Korrelationsanalysen über die gesamte Stichprobe alter Ratten, die unterschiedliche Lernleistungen im Wasserlabyrinth aufwiesen, niedrige R_s zwischen den Variablen ergaben, ergab die SWC Methode hohe und niedrige und positive und negative R_s für verschiedene Segmente oder Fenster der Rangordnung im Lernen. Dies deutet daraufhin, dass die hier untersuchte Population alter Tiere heterogen war bezüglich der Art, wie die Variablen miteinander korrelierten. Sie könnte demnach aus verschiedenen Subgruppen bestehen, die unterschiedliche Charakteristiken im Verhalten aufweisen. Weiterhin konnte die SWC Methode die Veränderungen in Größe und Valenz der

Koeffizienten innerhalb der Korrelationsverteilung genau lokalisieren und deren Entstehung darstellen.

3.3.5.1 Ergebnisse der Sliding Window Correlation Methode bezüglich der Zusammenhänge im Verhalten

Das Lernen im Wasserlabyrinth und die Offenfeldexploration. Die Überprüfung der Zusammenhänge zwischen dem Lernen im Wasserlabyrinth und der Exploration im Offenfeld mit der SWC Methode ergab, dass für verschiedene Segmente der Rangordnung im Lernen die Performanz im Wasserlabyrinth mit mehr und weniger Explorationsverhalten im Offenfeld in zwei unabhängigen Experimenten korrelierte. Die Heterogenität in diesem Zusammenhang bestätigt vorhergehende Befunde, die zeigten, dass für eine Gruppe der besseren Lerner, aber nicht für die schlechteren Lerner, besseres Lernen im Wasserlabyrinth mit mehr Explorationsverhalten einherging (Punkt 3.1). Durch die Anwendung der SWC Methode erhielten wir hohe positive R_s zwischen denselben Variablen für den Bereich der besseren Lerner in Experiment 1, nicht aber in Experiment 2. Unterschiede in den Korrelationsverteilungen zwischen den Experimenten, die zu unterschiedlichen Zwecken durchgeführt wurden, könnten auf Unterschiede im Alter sowie den Protokollen der jeweiligen Experimente zurückzuführen sein.

Überraschenderweise jedoch ergaben die Korrelationsverteilungen in beiden Experimenten auch Segmente mit hohen R_s , die auf einen negativen Zusammenhang zwischen der Performanz im Wasserlabyrinth und der Exploration im Offenfeld hindeuten, so dass besseres Lernen im Wasserlabyrinth mit weniger Exploration einherging. Der Wechsel von einem positiven (im Bereich der besseren Lerner) zu einem negativen (im Bereich der mittleren Lerner) Zusammenhang wurde durch einen ebenmäßigen, schrittweisen Wechsel in der Größenordnung sowie der Valenz der Korrelationskoeffizienten deutlich (am Besten in Experiment 1 zu sehen). Erklärungen dafür, dass die Performanz im Wasserlabyrinth mit beidem, mehr und weniger Explorationsverhalten, korrelierte, könnten in Zusammenhängen mit weiteren Variablen, z.B. dem Konfliktverhalten in einer Black/White Box, gefunden werden (siehe unten).

Letztlich wiesen die Ergebnisse der SWC Methode auf niedrige und hohe sowie positive und negative R_s für den Bereich der schlechteren Lerner in beiden Experimenten auf. Von diesem Blickwinkel heraus überrascht es nicht, dass wir unter Punkt 3.1 keine bedeutsamen Korrelationen zwischen den Variablen

Wasserlabyrinthlernen und Offenfeldexploration in der Gruppe der alten schlechteren Lerner fanden (Schulz et al., 2002).

Kurz gefasst ergaben Korrelationsanalysen zwischen den Variablen Wasserlabyrinthlernen und Offenfeldexploration, die über die gesamte Stichprobe durchgeführt wurden, niedrige R_s , wohingegen die SWC Methode ein differenziertes Bild abgab: für verschiedene Segmente der Rangordnung im Lernen waren die R_s positiv und negativ, welche sich folglich in einer Korrelationsanalyse über die gesamte Stichprobe gegeneinander aufhoben. Die schrittweise Entwicklung von positiven und negativen Sattelpunkten über die Korrelationsverteilung hinweg deutet daraufhin, dass die alten Tiere heterogen bezüglich der Zusammenhänge zwischen den Datensets waren und dass verschiedene Segmente der Verteilung von R_s die Existenz von Subgruppen verschiedener Verhaltensphänotypen innerhalb der alten Tierpopulation reflektieren.

Das Lernen im Wasserlabyrinth und das Konfliktverhalten in der Black/White Box. In Experiment 1 hatten wir die Möglichkeit, die Tiere weiterhin auf den Zusammenhang zwischen der Performanz im Wasserlabyrinth und dem Konfliktverhalten in der Black/White Box zu untersuchen. Der Konflikt in der Black/White Box besteht darin, ein neues Umfeld zu explorieren, welches Angst auslöst, da es hell beleuchtet ist, bzw. es zu vermeiden, welches die Angst reduziert und den Aufenthalt im alternativen dunklen Abteil erhöht (Crawley und Goodwin, 1980). Angst kann durch die Gabe von Anxiolytika reduziert werden und in der Black/White Box äußern sich anxiolytische Effekte in der Aufenthaltszeit, die proportional weniger im dunklen Abteil verbracht wird (Costall et al., 1989). In der gegenwärtigen Studie ergab die SWC Methode, die auf die Variablen Lernen im Wasserlabyrinth und Aufenthaltszeit im dunklen Abteil der Black/White Box angewandt wurde, durchaus interessante Ergebnisse: für den Bereich der besseren Lerner ergaben sich hohe R_s in die Richtung, dass besseres Lernen mit weniger Angst einherging. Zu bemerken ist hierbei, dass Angst in der Black/White Box in umgekehrter Richtung mit Exploration korreliert (Costall et al., 1989). Demnach können unsere Ergebnisse so interpretiert werden, dass besseres Lernen mit weniger Angst und mit mehr Exploration einhergeht. Für die besseren Lerner wurde zuvor ein Zusammenhang in diese Richtung zwischen den Variablen Wasserlabyrinthlernen und Offenfeldexploration etabliert (siehe Abb. 3A).

Interessanterweise ergab sich im Bereich der besseren bis mittleren Lernsegmente ein schrittweiser Wechsel der Korrelationskoeffizienten in die entgegengesetzte Richtung, so dass im Bereich der mittleren Lerner hohe R_s zwischen besserer Lernfähigkeit im Wasserlabyrinth und mehr Angst beobachtet wurden. Entsprechend hierzu erhielten wir zuvor für dasselbe Segment hohe R_s , die einen Zusammenhang zwischen besserer Lernfähigkeit und weniger Offenfeldexploration aufwiesen (Abb. 3A). Weiterhin konnte für den Bereich der schlechteren Lerner kein bedeutsamer Zusammenhang zwischen den Variablen Performanz im Wasserlabyrinth und Angst festgestellt werden, ebenso wie das Lernen in einem inkonsistenten Zusammenhang mit der Offenfeldexploration stand (Abb. 3A).

Auf diese Weise wurde noch einmal deutlich, warum die Korrelationsanalyse über die gesamte Stichprobe keinen bedeutsamen Zusammenhang zwischen den untersuchten Variablen ergab: für verschiedene Segmente der Korrelationsverteilung waren die Variablen auf unterschiedliche Weise miteinander assoziiert, d.h. positiv und negativ; eine Korrelationsanalyse, die alle Werte der Stichprobe beinhaltet, maskierte solch differenzierte Zusammenhänge.

Die Offenfeldexploration und das Konfliktverhalten in der Black/White Box. Wir wendeten ebenfalls eine Variante der SWC Methode an, um den Zusammenhang zwischen Offenfeldexploration und dem Verhalten in einer Black/White Box zu untersuchen, da das letztere dem Konflikt unterliegt, die Box zu explorieren oder – der durch Angst induzierten Motivation entsprechend - im schwarzen Abteil der Black/White Box zu verweilen. Demnach führten wir eine SWC Analyse für diese Variablen durch, wobei die Rangordnung auf einer dritten Variablen basierte, nämlich der Performanz im Wasserlabyrinth. Interessanterweise lagen die Koeffizienten für die meisten Intervalle der Rangordnung im negativen Bereich, so dass weniger Offenfeldexploration mit mehr Angst korrelierte. Im Gegensatz hierzu lagen die R_s für die Segmente der schlechteren Lerner hauptsächlich im positiven Bereich. Folglich ermöglichte die SWC Methode erneut die Aufdeckung einer Heterogenität in dem untersuchten Zusammenhang innerhalb der alten Tierpopulation.

3.3.5.2 Die Sliding Window Correlation Methode mit unterschiedlichen Intervallgrößen

Zu Beginn setzten wir bei den SWC Analysen die Intervallgröße auf eine arbiträre Zahl von zehn Tieren fest, obwohl natürlich auch andere Intervallgrößen eingesetzt werden könnten. Im Allgemeinen wird die Korrelationsverteilung detaillierter, umso

kleiner die Intervalle sind (siehe beispielsweise Abb. 5B im Vergleich zu Abb. 5C). Der Einsatz kleinerer Intervalle könnte von Nutzen sein, wenn der Einfluss eines Ausreißers innerhalb der Rangordnung untersucht werden soll, vor allem wenn die Vermutung besteht, dass dieses Individuum besonders zur Größenordnung eines Koeffizienten beiträgt. Ebenso kann die optimale Intervallgröße für die Aufdeckung von Sattelpunkten variieren und der Einsatz von kleineren Fenstern kann hierbei helfen diese aufzudecken. Auf der anderen Seite kann ein Koeffizient bei kleineren Intervallgrößen, z.B. bei fünf oder weniger Tieren, auch an Bedeutung verlieren. Im Vergleich hierzu können größere Intervallgrößen die Verteilung von R_s glätten. Obwohl die allgemeine Topographie der Korrelationsverteilung bei größeren Intervallen wahrscheinlich beibehalten wird, könnten kleinere Veränderungen unerkant bleiben. Bei sehr großen Stichproben könnten große Intervalle die Berechnungen jedoch vereinfachen. In solchen Fällen können bestimmte Segmente der Rangordnung erneut mit kleineren Intervallen überprüft werden.

3.3.5.3 Die mehrmalige Teilnahme eines Individuums bei der Sliding Window Correlation Methode

Eine mögliche Einschränkung der SWC Methode betrifft die Frequenz, zu welcher ein bestimmtes Tier zum Wert eines Korrelationskoeffizienten beiträgt. Angenommen, die Intervallgröße beträgt zehn, dann wird das erste Tier der Rangordnung nur einmal in der SWC Analyse vorkommen, das zweite Tier wird zweimal vorkommen, das dritte Tier dreimal usw., wohingegen das zehnte und die darauffolgende Tiere je zehn Mal zur Analyse beitragen. Die letzten neun Tiere der Rangordnung kommen dann wieder neunmal bzw. die darauffolgenden Tiere achtmal, siebenmal usw. in der Analyse vor. Demnach könnte die Topographie der Korrelationsverteilung möglicherweise durch die Frequenz, zu welcher das Gewicht eines Tieres beiträgt, beeinflusst werden. Angenommen, das erste Tier der Rangordnung, in dieser Studie ein besserer Lerner, trägt auf erhebliche Art zu einer bestimmten Valenz und Größenordnung eines Korrelationskoeffizienten bei, dann würde das Wegfallen dieses Tieres die nächste Korrelation der Rangordnung erheblich verlagern und einen starken Abfall oder eine starke Steigung in der Korrelationsverteilung verursachen. Wäre das Tier öfter in die Korrelationsanalysen mit eingegangen, könnte ein jeweiliger Sattelpunkt (positiv oder negativ) aus mehreren sich ähnelnden R_s bestehen und breiter werden. Obwohl sich das Ausmaß solch eines Sattelpunktes nicht korrigieren lässt, kann man trotzdem

sicherstellen, dass die allgemeine Topographie der Korrelationsverteilung durch dieses Manko nicht beeinflusst wird. In Anbetracht dessen schlagen wir vor, eine SWC Kontrolle zu berechnen, indem die Frequenz, zu welcher jedes Tier zur Korrelationsanalyse beiträgt, minimiert wird. Anstatt um jeweils ein Tier die Rangordnung hinabzugleiten, könnte man z.B. in Vierschritten hinabgleiten (wobei die Intervallgröße jedoch konstant gehalten wird) oder in Schritten, die so groß sind wie das Intervall selbst. In der gegenwärtigen Studie wurde diese Kontrollprozedur (siehe Kreise in Abb. 4B) angewandt; das Hinabgleiten in Vierschritten ergab eine ähnliche Topographie der Korrelationsverteilung wie das Hinabgleiten in Einerschritten.

3.3.5.4 Die Sliding Window Correlation Methode ist ein deskriptives Instrument

Die SWC Methode stellt ein deskriptives Instrument dar, welches in Verbindung mit der Korrelationsanalyse über die gesamte Stichprobe genutzt werden kann. Da viele Koeffizienten mit der neuen Prozedur berechnet werden, wäre es nicht gerechtfertigt, ohne eine Adjustierung für mögliche Typ I Fehler über Signifikanzniveaus zu reden. In dieser Studie wurde die Größenordnung der R_s als ein „Effektmaß“ betrachtet. In Verbindung mit Korrelationsanalysen über die gesamte Stichprobe kann die SWC Methode zusätzliche Informationen bezüglich der Heterogenität innerhalb der Korrelationsverteilung liefern. Solche Informationen können besonders nützlich sein, wenn Korrelationsanalysen über die gesamte Stichprobe - entgegengesetzt der Hypothese - keine signifikanten Resultate ergeben. Weiterhin dienen sie der Generierung neuer Hypothesen. Selbst im Falle von signifikanten Korrelationen über die gesamte Stichprobe kann die SWC Methode die Segmente innerhalb der rangierten Werteverteilung feststellen, die für die Korrelation verantwortlich sind und kann mögliche Segmente aufweisen, die eine Heterogenität im Zusammenhang zeigen. Die Prozedur kann in jedem Forschungsgebiet angewendet werden, das Korrelationsanalysen einsetzt und kann ebenso genutzt werden, um Effekte von unabhängigen oder Subjektvariablen auf die Topographie der Korrelationsverteilung zu untersuchen. Als eine mögliche Kontrolle empfehlen wir eine randomisierte Werteverteilung als Co-Variante einzusetzen. Die Ergebnisse der auf randomisierten Daten beruhenden SWC Analyse können dann mit einer auf echten Daten beruhenden Analyse verglichen werden. In einem solchen Vergleich konnten wir den Grad der Streuung der R_s illustrieren, die man mit randomisierten Kontrollwerten erzielen kann. Interessanterweise konnten wir beobachten, dass selbst

randomisierte Werte kleinere Sattelpunkte hervorrufen können; die eher schrittweise Veränderung in der Größenordnung und Valenz der Koeffizienten über eine weite Reichweite von Rängen - wie bei den eigentlichen Daten beobachtbar - blieb in der Kontrollkondition jedoch aus.

3.3.6 Fazit

Die SWC Methode kann heterogene oder nicht-monotone Korrelationsverteilungen aufdecken, die auf die Präsenz von unterschiedlichen Subgruppen innerhalb einer Rangordnung hindeuten. Als eine komplementäre Methode zur üblichen Korrelationsanalyse über die gesamte Stichprobe bietet die SWC Methode die Möglichkeit, den Grad der Heterogenität oder Homogenität eines Zusammenhangs zwischen Variablen über eine Rangordnung zu visualisieren. Wir konnten zeigen, dass nicht nur die Größenordnung, sondern auch die Valenz eines Zusammenhangs zwischen Verhaltensmaßen über die Reichweite einer Rangordnung stark variieren kann. Diese Heterogenität bietet sich dazu an, Hypothesen bezüglich der Existenz von Subgruppen zu generieren, die sich aus der Unterschiedlichkeit in den Zusammenhängen ergeben. Obwohl wir anhand von Verhaltensdaten alter Ratten zeigen konnten, dass die SWC Methode bei der Aufdeckung solcher Subgruppen nützlich ist, kann die Methode Anwendung in jedem Forschungsgebiet finden, das der Analyse von Zusammenhängen zwischen Variablen nachgeht.

3.4 Die extinktions-induzierte „Hoffnungslosigkeit“ im Wasserlabyrinth und deren neurochemischen Korrelate in alten und adulten Ratten

3.4.1 Zusammenfassung

Es wurde hypothetisiert, dass die durch die Entnahme der Plattform induzierte Extinktion des zuvor erlernten Fluchverhaltens im Wasserlabyrinth ein negatives Befinden induziert, einschließlich immobiles Verhalten, von welchem angenommen wird, dass es „Hoffnungslosigkeit“ reflektiert, wenn es im Forced Swimming Test auftritt. 27 alte und 8 adulte Tiere (26 bzw. 3 Monate alt) wurden im Wasserlabyrinth für 9 Tage mit verborgener Plattform (Akquisition) und anschließend für 7 Tage ohne Plattform (Extinktion) getestet. Wie erwartet, zeigten beide Altersgruppen immobiles Verhalten, das sich über die Extinktionsdurchgänge hinweg schrittweise erhöhte, wobei die alten Tiere mehr Immobilität aufwiesen als die adulten. Um zu untersuchen, ob die altersbedingten Unterschiede in der Immobilität auf die Lernfähigkeit während der Akquisition zurückzuführen waren, wurden die alten Tiere aufgrund der mittleren Gesamtschwimmzeiten zur Plattform während der Akquisition in bessere, mittlere und schlechtere Lerner ($n = 9$ pro Gruppe) unterteilt und miteinander sowie mit den adulten Tieren verglichen. Die Vergleiche zeigten, dass die alten schlechteren Lerner die meiste Immobilität unter den alten Tieren aufwiesen. Die Gesamtdauer der Immobilität wurde dann mit den Botenstoffkonzentrationen, die post-mortem im Hippocampus und im ventralen Striatum gemessen wurden, korreliert. Im ventralen Striatum korrelierten Acetylcholin, Dopamin und der Metabolit DOPAC mit dem Level der Immobilität bei den alten Ratten, wohingegen Norepinephrin mit diesem Verhalten bei adulten Tieren korrelierte. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass multiple Extinktionsdurchgänge im Wasserlabyrinth eine Immobilität induzieren, die eine behaviorale „Hoffnungslosigkeit“ reflektieren könnte und dass striatale Botenstoffkonzentrationen mit dem Grad derselben korrelieren. Die extinktions-induzierte Hoffnungslosigkeit stellt ein konzeptionelles und empirisches Modell der menschlichen Depression in Aussicht, welche die Konsequenz des Verlustes von Verstärkern ist.

3.4.2 Einleitung

Die Depression ist eine der am häufigsten vorkommenden psychiatrischen Erkrankungen, die mit dem Altern assoziiert wird, und stellt einen Risikofaktor für die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen, wie z.B. der Alzheimerschen Krankheit, dar (Gareri et al., 2002). In Tiermodellen, welche die Symptome der Depression zu simulieren versuchen, wurde dem Altern jedoch bisher nur wenig Aufmerksamkeit zugedacht. Ein bedeutendes Tiermodell, welches Umweltfaktoren als hauptursächlich für die Entstehung einer Depression ansieht, beruft sich auf das Konzept der gelernten Hilflosigkeit, um die Effekte von unkontrollierbarem Stress zu umschreiben, die u.a. einen Motivationsverlust, Lern- und Emotionsdefizite beinhalten (Overmier und Seligman, 1967). Ein Derivat dieses Modells, der sogenannte Forced Swimming Test, misst die Passivität im Verhalten nach unentrinnbarem Schwimmstress (Porsolt et al., 1977). Dieser Test wird oftmals dazu genutzt, um die Effektivität von Antidepressiva zu erforschen. Der Chronic Mild Stress Test simuliert die Anhedonie, ein mit der Depression assoziiertes Symptom, das sich als eine Subsensitivität für Verstärkung bemerkbar macht (Willner et al., 1992). Die gegenwärtige Studie wurde mit der Absicht durchgeführt, nach Hinweisen auf eine depressive Symptomatik in einem Test zu suchen, der sensitiv für altersbedingte Defizite im räumlichen Lernen und Gedächtnis ist, nämlich das Wasserlabyrinth (Morris, 1984). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass alte Tiere in der Akquisition des Wasserlabyrinths Defizite im Vergleich zu adulten Tieren aufzeigen (Gallagher und Burwell, 1989; Markowska et al., 1989), aber nur wenige Berichte haben sich mit der Extinktion von erlerntem Verhalten befasst, obwohl die Extinktion - als Folge des Entzugs von Verstärkung - wahrscheinlich eine Hauptquelle von Stress und Hoffnungslosigkeit, insbesondere bei alten Menschen ist. Z.B. sind schmerzliche Verluste durch Tod, Isolation und Invaliditätsfälle mit depressiven Symptomen in älteren Menschen assoziiert (Lepine und Bouchez, 1998).

Im Wasserlabyrinth lernen die Tiere über mehrere Versuchsdurchgänge eine verborgene Plattform, ein Verstärker, zu lokalisieren und auf diese zu entkommen und werden später auf ihr „Gedächtnis“ für die Plattformposition in einem „Probe Trial“ getestet, einem Versuchsdurchgang, der ohne Plattform stattfindet. Der „Probe Trial“ liefert ein Maß für die Extinktion, da sich das Verhaltensmuster über den Durchgang hinweg aufgrund der Abwesenheit des Verstärkers, d.h. der Plattform,

verändert. Die gegenwärtige Studie beabsichtigte, die Schwimmuster alter und adulter Ratten in mehreren „Probe Trials“ bzw. Extinktionsdurchgängen im Wasserlabyrinth zu analysieren.

Es ist bekannt, dass die Extinktion von Verhaltensweisen, die zuvor verstärkt wurden, aversiv ist und die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass das Versuchsobjekt aggressiv reagiert (Dollard et al., 1939). Wir hypothesierten, dass mit der Abnahme des zuvor verstärkten Verhaltens während der Extinktion zusätzlich zu aggressiven Reaktionen als Antwort auf die Nicht-Verstärkung auch ein Zustand ähnlich der „gelernten Hilflosigkeit“ induziert wird und sich in Form eines Verhaltens manifestiert, von welchem angenommen wird, dass es „Hoffnungslosigkeit“ reflektiert. Der Forced Swimming Test, bei dem das Tier in einem mit Wasser gefüllten schmalen Zylinder platziert wird, dem es nicht entkommen kann, induziert eine „Hoffnungslosigkeit“, die sich in Form von Immobilität äußert (Porsolt et al., 1977). Entsprechend der Ähnlichkeit der Wassersituation liegt es nahe zu erwarten, dass die Extinktion im Wasserlabyrinth eine „gelernte Hoffnungslosigkeit“ in Form von immobilem Verhalten induzieren könnte. Demnach hypothesierten wir, dass die Immobilität mit den Extinktionsdurchgängen ansteigt und mit der Resistenz zu extinguieren assoziiert ist, d.h., es wurde erwartet, dass eine stärkere Resistenz zu extinguieren mit weniger „Hoffnungslosigkeit“ und daher mit weniger Immobilität einhergeht. Aufgrund des altersbedingten Defizits, sich an Stressoren in der Umwelt anpassen zu können (De Kloet, 1992; Bizon et al., 2001), wurde ebenfalls antizipiert, dass die alten Tiere empfindlicher auf den Stress im Wasserlabyrinth reagieren und mehr Immobilität als die adulten Tiere aufweisen würden.

In der gegenwärtigen Studie wurden ebenfalls neurochemische Korrelate der Immobilität untersucht. In den Analysen, die post-mortem erhoben wurden, lagen die Monoamine und deren Metaboliten im Hippocampus und ventralen Striatum im Vordergrund unserer Untersuchungen. Projektionen vom Hippocampus innervieren das ventrale Striatum und beide Hirnareale sind bei der Vermittlung von depressiven Symptomen beteiligt. Der Hippocampus ist ein bedeutendes Areal, an dem Glucocorticoide ihre Funktion ausüben; dessen Neurone sind bei Stress (Lupien et al., 1998) sowie im Alter (Sapolsky et al., 1985) besonders verwundbar. Das ventrale Striatum - oder spezifischer - der Nucleus Accumbens, ist dafür bekannt, dass er Reaktionen auf Verstärkung und Aversivität vermittelt. Es existieren ebenfalls Befunde, die zeigen, dass dieses Areal bei der Produktion von Anhedonie

nach Chronic Mild Stress eine Rolle spielt, die auch von Veränderungen in der Funktion von Monoaminen begleitet wird (Willner, 1991). Das Striatum enthält auch cholinerge Interneurone, die ebenfalls die aversive Stimulation vermitteln (Pfister et al., 1994). In der gegenwärtigen Studie wurden post-mortem die Konzentrationen von Acetylcholin zusammen mit den Monoaminen Dopamin, Norepinephrin, Serotonin und deren Metaboliten gemessen, um die Zusammenhänge jener mit der Immobilität im Wasserlabyrinth zu untersuchen.

3.4.3 Materialien und Methoden

3.4.3.1 Die Versuchstiere

Die Studie wurde entsprechend den Vorschriften des deutschen Tierversuchsgesetzes durchgeführt und von der Bezirksregierung Düsseldorf genehmigt. Insgesamt 36 männliche, 26 Monate alte und 8 adulte, 3 Monate alte Wistar-Ratten wurden von der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bezogen. Die Tiere wurden in Gruppen mit 2-3 Tieren pro Käfig untergebracht und bei einem umgekehrten 12:12 Hell/Dunkel Rhythmus (Licht an um 19.00 h) gehalten. Futter (Altromin) und Wasser standen frei zur Verfügung.

3.4.3.2 Das Wasserlabyrinth

Das runde Labyrinth hatte einen Durchmesser von 185 cm und bestand aus schwarzem Polyethylen. Es wurde zu einer Höhe von 30 cm mit 20 ± 1 °C warmem Wasser gefüllt. Eine aus PVC angefertigte Plattform, deren Durchmesser 18 cm betrug, befand sich 1.5 cm unter der Wasseroberfläche. Die Plattform konnte an vier verschiedene Orte im Labyrinth verschoben werden und befand sich jeweils in der Mitte eines Quadranten. Jedem Tier wurde ein zufällig ausgewählter Quadrant (Zielquadrant) zugeteilt, in dem sich die Plattform während der gesamten Akquisitionsphase befand. Zusätzlich wurden vier Startpunkte festgelegt, die dem Uhrzeigersinn nach jeweils gleichweit voneinander entfernt waren. Täglich wurden die Tiere einer zufällig gewählten Sequenz entsprechend an jedem der vier Startpunkte einmal in das Labyrinth gelassen. Die Sequenz war für jedes Tier gleich. Hinweisreize in der Umgebung des Labyrinths, wie z.B. Poster, eine Tafel und ein Schrank, dienten zur räumlichen Orientierung. Die Reize wurden von vier 75-W Glühbirnen angestrahlt und hiedurch hervorgehoben. Diffuses Deckenlicht trug ebenfalls zur Beleuchtung des Labyrinths bei und sorgte für eine Helligkeit von ≈ 6.5 Lux auf der Wasseroberfläche. Computerisierte Systeme für die Verhaltensanalyse

waren hinter einer Barriere vom Labyrinth entfernt. Eine Kamera war ≈ 2 m über dem Labyrinth angebracht.

Mindestens 30 Minuten vor Versuchsbeginn, wurden die Ratten in einen Warteraum gebracht und bis kurz vor den Testungen in einem Transportkäfig gehalten. Am Anfang eines Versuchsdurchgangs wurden die Tiere einzeln im Labyrinth platziert, wobei sie der Wand des Beckens entgegen blickten. Jedes Tier durchlief einen 2-minütigen Adaptionsdurchgang in Abwesenheit einer Plattform, so dass es sich an die neue Wassersituation gewöhnen konnte und die allgemeine Schwimmfähigkeit überprüft werden konnte. Am nächsten Tag begann das 9-tägige Training mit verborgener Plattform. In dieser Phase hatten die Tiere die Möglichkeit, den Ort der Plattformposition zu erlernen und auf die Plattform zu entkommen. Pro Tag wurden 4 Trainingsdurchgänge durchgeführt. Ein Trainingsdurchgang war beendet, wenn das Tier die Plattform erklimmt hatte oder 2 Minuten verstrichen waren. Nach Ablauf eines 2-Minutenintervalls wurde die Ratte vom Versuchsleiter zur Plattform geleitet. Das Tier verweilte dann 30 Sekunden auf der Plattform. Hiernach wurde das Tier für 60 Sekunden in einem Transportkäfig gehalten. Nach zwei Durchgängen wurden die Ratten mit Papiertüchern abgetupft und durch die Wärme von zwei 75-W Glühbirnen getrocknet. Es wurden jeden dritten Tag zwei Durchgänge am Morgen und zwei am Nachmittag durchgeführt. Drei Tage nach dem letzten Trainingsdurchgang begann die Extinktion. Die Plattform wurde aus dem Labyrinth entfernt und ein 2-minütiger Extinktionsdurchgang pro Testtag jeden dritten Tag durchgeführt (zusammen 7 Durchgänge). Alle Versuchsdurchgänge wurden auf Video aufgezeichnet und mit ETHOVISION software (Noldus, Wageningen, Niederlande) analysiert. Die Versuche fanden während der nachtaktiven Phase der Tiere zwischen 9.00 und 17.00 Uhr statt.

Für jeden Akquisitionsdurchgang wurde die Schwimmzeit zur verborgenen Plattform gemessen; die vier Durchgänge wurden für jeden Trainingstag gemittelt. Die Abnahme der mittleren Schwimmzeiten über die neun Trainingstage (das Gefälle der Lernkurve) wurde als Lernindex interpretiert. Die mittleren Schwimmzeiten pro Tag wurden nochmals über alle Trainingstage gemittelt (mittlere Gesamtschwimmzeiten) und für Vergleiche zwischen den Altersgruppen genutzt. Darüber hinaus wurden für jeden Trainingstag die Aufenthaltszeiten im Plattformquadranten sowie im mittleren und äußeren Ring des Wasserlabyrinths quantifiziert. Für die statistische Analyse wurden Prozentwerte für die Aufenthaltszeiten in den jeweiligen Arealen des

Labyrinths entsprechend den geschwommen Zeiten bis zum Erreichen der verborgenen Plattform ermittelt. Um die Aufenthaltszeiten in den Ringen zu messen, wurde das Labyrinth in drei, voneinander gleichweit entfernte (am Diameter vom Beckenrand zum Zentrum des Labyrinths gemessen), Ringe unterteilt, d.h. einem äußeren, einen mittleren und einen inneren Ring (jeder Ring war 30.83 cm breit). Die Aufenthaltszeiten in den Arealen, d.h. im vorherigen Plattformquadranten, im äußeren und mittleren Ring des Labyrinths, wurden auch während der Extinktionsphase gemessen. Zusätzlich wurde die Dauer der Immobilität als Index für die „gelernte Hoffnungslosigkeit“ (Porsolt et al., 1977) für jeden Extinktionsdurchgang erhoben. Die Immobilität wurde als Bewegungslosigkeit des gesamten Körpers definiert, wobei sanfte Regungen, die zur Balance notwendig waren, um über Wasser zu bleiben, ebenfalls als Immobilität galten. Das immobile Verhalten wurde nicht als solches gewertet, wenn das Tier die Wand des Beckens berührte.

3.4.3.3 Neurochemische Analysen

Ca. 6 Wochen nach Beendigung der Extinktionsphase wurden die Ratten mit Natrium Pentobarbital (60 mg/kg; i.p.) anästhetisiert und dekapitiert (Sethy und Francis, 1988). Die Gehirne wurden schnell entnommen und koronal geschnitten. Die folgenden Hirnareale wurden auf Eis bilateral entnommen: frontaler Cortex (cortikales Gewebe vor dem Genus des Corpus callosum), ventrales Striatum (Nukleus accumbens, olfaktorisches Tuberkel, vordere Teile des ventralen Pallidums), Neostriatum (vordere Teile des Caudatus-Putamen, wobei der Globus pallidus die hintere Grenze bildete), Hippocampus (vordere Teile der hippocampalen Formation mit den Arealen CA1, CA3 und Gyrus dentatus), Amygdala (vordere Teile der zentralen, medialen und basomedialen Nuklei, hintere Teile der basolateralen und lateralen Nuklei, der corticalen und interpolierten Nuklei, und der sich in der Amygdala befindende Teil des Bed Nukleus der Stria terminalis), Cerebellum (alle Lappen und Nuklei außer dem cerebellaren Pediculus) und Hirnstamm (hintere Teile des Mittelhirns, die gesamte Pons und Medulla oblongata). Hiernach wurde das Hirngewebe gewogen, in eiskalter 0.05 N Perchlorsäure und Ethylhomocholine (EHCh, interner Standard) homogenisiert, zentrifugiert, gefiltert und bei -70°C bis zur Analyse aufbewahrt. Eine Hälfte der Samples (die linke oder rechte Hirnhälfte) wurden nach der Methode von Damsma und Westerink (1991) mit HPLC-EC auf Acetylcholin (ACh) hin untersucht, wobei der interne Standard von Potter et al.

(1983) übernommen wurde. In den anderen Samples wurden Dihydroxyphenylethylamin (DOPAC), Homovanillinsäure (HVA), Dopamin (DA), Norepinephrin (NE), 5-hydroxy-indolethylamin (5-HIAA) und Serotonin (5-HT) mit HPLC-EC gemessen, wobei DHBA als interner Standard genutzt wurde. Für weitere Details bezüglich der neurochemischen Analyse wird auf de Souza Silva (1997, 2000) verwiesen. In der gegenwärtigen Studie haben wir uns auf die Botenstoffkonzentrationen im Hippocampus und ventralen Striatum konzentriert.

3.4.3.4 Statistische Analysen

Die mittleren Schwimmzeiten zur verborgenen Plattform sowie die mittleren Aufenthaltszeiten (in %) in den definierten Arealen des Labyrinths wurden über alle Trainingstage gemittelt, so dass ein mittlerer Gesamtwert für jedes Tier erhoben wurde (alte: $n = 27$, adulte: $n = 8$). Ebenso wurde die Performanz während der Extinktion über alle 7 Testungen gemittelt (sofern nicht anders angegeben). Um die Extinktion während eines Durchgangs zu erfassen, wurde jeder Durchgang in vier 30-sekündige Intervalle unterteilt und separat analysiert.

Für die statistischen Auswertungen wurden alle Daten auf Normalität und Homogenität mit dem Shapiro-Wilks Test bzw. der Levene Statistik untersucht. Diese Untersuchungen ergaben in den meisten Fällen keinen Anlaß dazu, parametrische Analysen durchzuführen. Daher wurde der Mann-Whitney-U Test angewendet, um Gruppenvergleiche durchzuführen. Um Messwiederholungen innerhalb der Gruppen durchzuführen, wurden Friedman oder Wilcoxon Tests angewendet. Die Rangordnungskorrelation nach Spearman wurde genutzt, um weitere Zusammenhänge zwischen den Variablen zu untersuchen. Aufgrund der Vielzahl an Tests, die letztendlich durchgeführt wurden, werden P -Werte ≤ 0.05 nur als Effektmaße präsentiert.

3.4.4 Ergebnisse

3.4.4.1 Die Versuchstiere

Für die statistischen Auswertungen wurden von den insgesamt 44 Tieren 27 alte und 8 adulte Tiere genutzt. Die restlichen 9 Tiere wiesen während der Versuche Anzeichen von physischer Labilität oder Krankheit auf.

3.4.4.2 Die Akquisition im Wasserlabyrinth

Schwimmzeit zur verborgenen Plattform. Pro Tag wurden für die alten ($n = 27$) bzw. adulten ($n = 8$) Tiere die vier Schwimmzeiten zur verborgenen Plattform gemittelt.

Das Gefälle der mittleren Schwimmzeiten über die neun Trainingstage sind in Abb. 1A dargestellt. Vergleiche innerhalb der Gruppen ergaben, dass sowohl für die alten ($P < 0.0001$) als auch für die adulten ($P = 0.001$) Tiere die Zeiten, die benötigt wurden, um auf die Plattform zu entkommen, über die Trainingstage abnahmen. Ein Vergleich zwischen den Gruppen bestätigte die Erwartung, dass alte Tiere im Lernen defizient sind, da die alte Tiergruppe eine höhere mittlere Gesamtschwimmzeit aufwies als die adulte Gruppe ($P < 0.0001$, einseitig, Mann-Whitney Test). Die mittleren Gesamtschwimmzeiten zur verborgenen Plattform betragen $43.85 (\pm 2.61$ SF) und $20.49 (\pm 2.41$ SF) für die alten bzw. adulten Tiere.

Aufenthaltszeiten im Plattform- und den anderen Quadranten. Um den Grad der räumlichen Lernfähigkeit zu erfassen, wurden die mittleren Aufenthaltszeiten im Plattformquadranten (PQ) (% der Schwimmdauer zur verborgenen Plattform) errechnet (siehe Abb. 1B). In beiden Gruppen nahmen die mittleren Aufenthaltszeiten im PQ über die Trainingstage zu (adult: $P = 0.001$; alt: $P = 0.01$). Über die neun Trainingstage gemittelt, schwammen die alten bzw. adulten Tiere 32.4 % und 48.2 % der gesamten Schwimmzeit im Plattformquadranten. Diese Werte liegen somit über der Zufallsschwelle von 25 % und machen eine Platzpräferenz deutlich. Überdies waren die im Plattformquadranten geschwommenen Zeiten höher als die, die in den anderen Quadranten verbracht wurden (links, rechts und gegenüber vom PQ; $P < 0.0001$, $P < 0.0001$ bzw. $P < 0.0001$ bei den alten und alle $P = 0.01$ bei den adulten Tieren; Wilcoxon-Tests) (siehe Fig. 1C). Gruppenunterschiede wurden ebenfalls deutlich; wie erwartet wiesen die adulten Tiere eine höhere Platzpräferenz (gemittelt über neun Trainingstage) für den Plattformquadranten auf als die alten Tiere ($P < 0.0001$, einseitig).

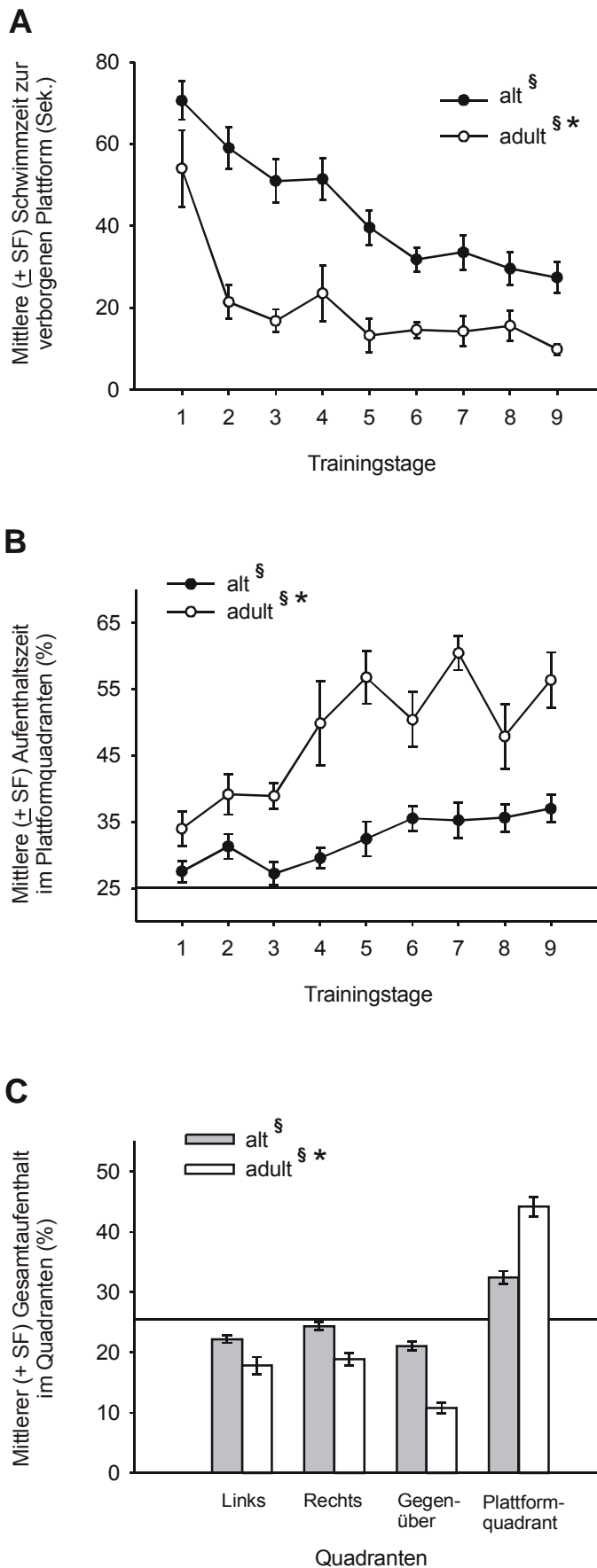


Abb. 1. Lernen im Wasserlabyrinth. (A) Die mittleren Schwimmzeiten der alten ($n = 27$) und adulten ($n = 8$) Tiere zur verborgenen Plattform an neun Trainingstagen. Pro Tag wurden vier Durchgänge gemittelt. Zwischen den Trainingstagen lagen 72 Std. Die Gefälle der Schwimmzeiten über die Trainingstage deuten daraufhin, dass gelernt wurde, die Plattform zu lokalisieren. (B) Die mittleren Aufenthaltszeiten der alten ($n = 27$) und adulten ($n = 8$) Tiere im Plattformquadranten (%) über neun Trainingstage (pro Tag über vier Durchgänge gemittelt). Ein Anstieg der Aufenthaltszeiten im Plattformquadranten (PQ) deutet auf das Erlernen einer Platzpräferenz hin. Die horizontale Linie bei 25 % stellt den Level einer zufälligen Performanz dar. (C) Die Aufenthaltszeiten im Plattformquadranten und in den Quadranten links, rechts und gegenüber vom Plattformquadranten (% der Schwimmdauer bevor die Plattform erreicht wurde und über neun Trainingstage gemittelt). Beide Altergruppen bevorzugten den Plattformquadranten gegenüber den anderen Quadranten. (§ = $P \leq 0.05$ innerhalb einer Gruppe; * = $P \leq 0.05$ zwischen den Gruppen)

Aufenthaltszeiten im äußeren und mittleren Ring des Labyrinths. Eine alternative Strategie, die Schwimmzeiten zur verborgenen Plattform zu reduzieren, die nicht unbedingt räumlicher Natur ist, ist das Lernen, von der Wand des Labyrinths in das Innere zu schwimmen (Cain, 1998). Demnach erfassten wir hier auch die Aufenthaltszeiten im äußeren und mittleren Ring des Labyrinths. Die mittleren Aufenthaltszeiten im äußeren Ring sind für die beiden Altersgruppen in Abb. 2A dargestellt, wohingegen die mittleren Aufenthaltszeiten im mittleren Ring in Abb. 2B zu sehen sind. Die Ergebnisse zeigen, dass beide Altersgruppen lernten, von der Wand in das Innere des Labyrinths zu schwimmen; über die Trainingstage hinweg fielen die Aufenthaltszeiten im äußeren Ring (alt: $P < 0.0001$; adult: $P = 0.0005$) und stiegen im mittleren Ring an (alt: $P < 0.0001$; adult: $P = 0.001$). Vergleiche zwischen den Gruppen ergaben, dass die alten Tiere mehr Zeit im äußeren Ring ($P = 0.001$) und weniger Zeit im mittleren Ring ($P = 0.001$) verbrachten als die adulten Tiere.

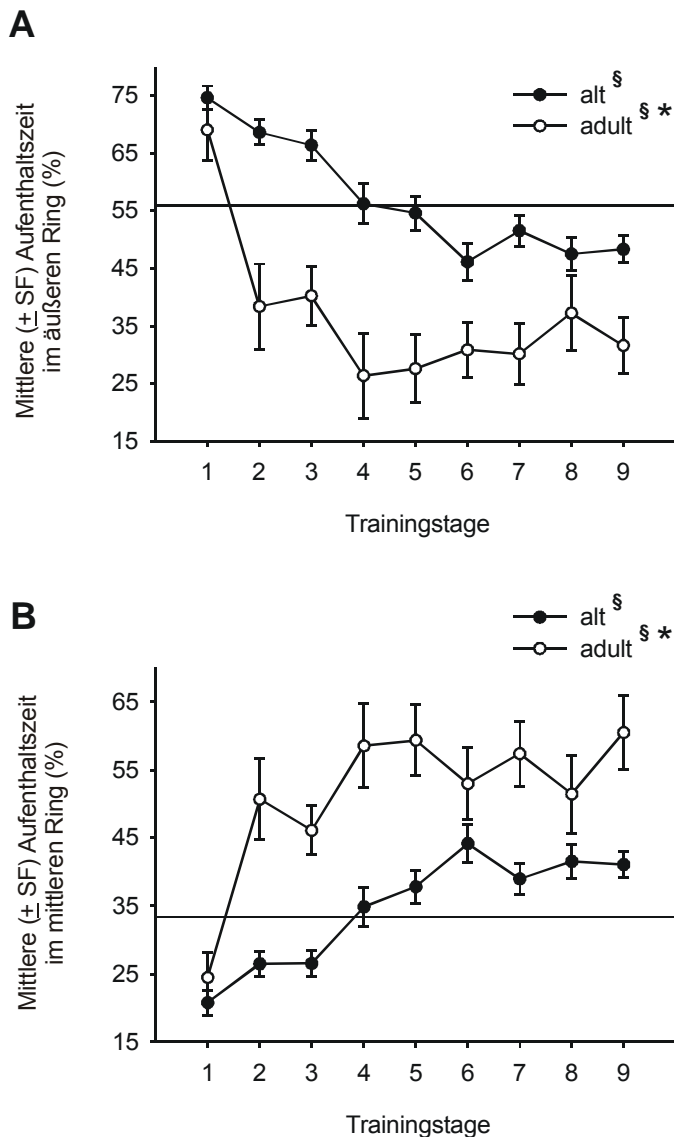


Abb. 2. Aufenthaltszeiten im äußeren und im mittleren Ring während der Akquisition.

Mittlere Aufenthaltsdauer der alten ($n = 27$) und adulten ($n = 8$) Tiere im äußeren (A) und mittleren (B) Ring des Wasserlabyrinths pro Trainingstag mit verborgener Plattform. Ein Gefälle der Aufenthaltszeiten im äußeren Ring wurde bei beiden Gruppen über die Trainingstage sichtbar. Die Durchschnittswerte lagen am letzten Trainingstag bei oder unter dem Zufallswert von ca. 56 % der geschwommenen Zeit (horizontale Linie). Die Steigung der Aufenthaltszeiten im mittleren Ring (B) deutet daraufhin, dass die Gruppen lernten in das Innere des Labyrinths zu schwimmen. Beide Altersgruppen erlernten die Platzpräferenz und hielten sich länger in diesem Areal auf als zu einem zufälligen Wert von 33 % (horizontale Linie) der gesamten Schwimmzeit. (§ = $P \leq 0.05$, innerhalb der Gruppen; * = $P \leq 0.05$, zwischen den Gruppen)

Das eigentliche Ziel dieser Studie bestand darin, das Verhalten während der Extinktion, d.h. mehrerer nicht-verstärkter ohne Plattform stattfindende Schwimmdurchgänge im Wasserlabyrinth zu untersuchen, die mehreren verstärkten Durchgängen bei vorhandener Plattform folgten. Im Einklang mit traditionellen Lerntheorien wurde erwartet, dass die Verstärkung eines Verhaltens mit der Resistenz, dieses Verhalten zu extinguieren, einhergehen würde (Williams, 1938). Z.B. wurde erwartet, dass der Grad der Platzpräferenz für den Plattformquadranten im Wasserlabyrinth während der Akquisition mit dem Grad der Platzpräferenz für den vorherigen Plattformquadranten während der Extinktion korreliert. Es wurde auch erwartet, dass andere Verhaltensweisen, die während der Verstärkung des

Fluchtverhaltens unterdrückt wurden, wie z.B. das Schwimmen im äußeren Ring des Labyrinths, während der Extinktion zum ursprünglichen Expressionsgrad zurückkehren würden. Weiterhin wurde erwartet, dass die Extinktion immobiles Verhalten auslöst.

3.4.4.3 Die Extinktion im Wasserlabyrinth

Aufenthaltszeiten im vorherigen Plattformquadranten. Bei Betrachtung der 2-minütigen Extinktionsdurchgänge zeigten die adulten Tiere nur ein bescheidenes Gefälle in der im vorherigen Plattformquadranten (VPQ) geschwommen Zeit ($P = 0.099$). Die alten Tiere schwammen beständig im VPQ, ohne eine sichtbare Senkung der Extinktionskurve ($P = 0.67$). Um zu erörtern, ob die Dauer der Durchgänge mit der Performanz während der Extinktion interagiert, wurden die Aufenthaltszeiten im VPQ auch separat für die ersten, zweiten, dritten und letzten 30 Sek. jedes Durchgangs ausgewertet. Die Extinktionskurven beider Gruppen sind für das erste Intervall jedes Durchgangs in Abb. 3A dargestellt. Vergleiche innerhalb der Gruppen ergaben ein Gefälle in der Platzpräferenz für den VPQ über die ersten 30 Sek. jedes Durchgangs bei den adulten Tieren ($P = 0.02$), nicht aber bei den alten Tieren ($P = 0.72$). Keine der Gruppen wies ein bedeutsames Gefälle in den Extinktionskurven auf, die aus den zweiten, dritten und letzten Intervallen jedes Durchgangs berechnet wurden (adult: $P = 0.45$, $P = 0.13$ bzw. $P = 0.83$; alt: $P = 0.48$, $P = 0.98$ bzw. $P = 0.76$). Gruppenunterschiede ergaben sich jedoch in allen Fällen; die Platzpräferenz für den VPQ (gemittelt über alle 7 Durchgänge) war in den adulten Tieren stärker ausgeprägt als in den alten Tieren, wenn die jeweiligen Durchgänge gesamt oder auch die jeweiligen Intervalle separat (Abb. 3B) betrachtet wurden (2 Min.: $P = 0.0005$, einseitig; 0-30 Sek.: $P = 0.001$; 30-60 Sek.: $P = 0.004$; 60-90 Sek.: $P = 0.004$; 90-120 Sek.: $P = 0.045$).

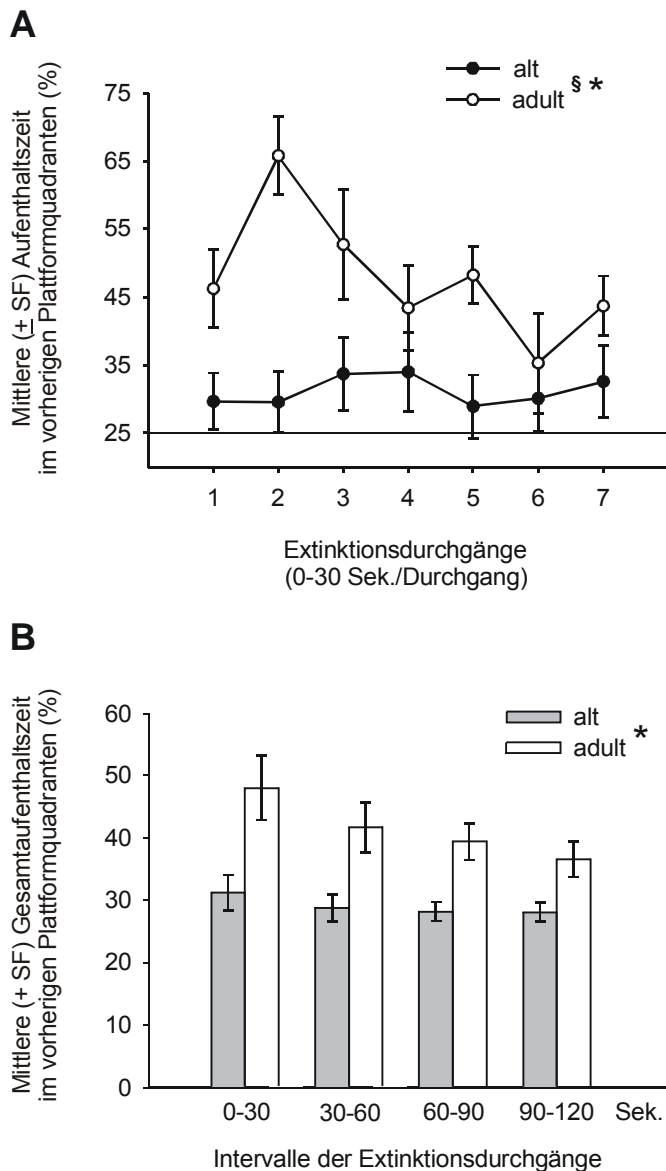


Abb. 3. Aufenthaltszeit im vorherigen Plattformquadranten während der Extinktion. (A) Mittlere Aufenthaltszeiten im vorherigen Plattformquadranten (%) während der ersten 30 Sek. der jeweiligen Extinktionsdurchgänge, die im Abstand von 72 Std. aufeinander folgten. In der Gruppe der adulten Ratten ($n = 8$) weist die Senkung der Aufenthaltszeiten im vorherigen Plattformquadranten (VPQ) eine Extinktion der Platzpräferenz auf. Bei den alten Tieren war keine Senkung zu verzeichnen. Die horizontale Linie bei 25 % steht für eine Performanz, die dem Zufall entsprechen würde. (B) Die mittlere Aufenthaltszeit im VPQ (%), über sieben Durchgänge gemittelt) wurde separat für vier unterschiedliche Intervalle der 2-minütigen Durchgänge analysiert, d.h. für die ersten, zweiten, dritten und vierten 30 Sek. Das Gefälle der Aufenthaltszeiten über die Intervalle, wie es bei den adulten Tieren zu sehen ist ($P = 0.08$), deutet auf eine Extinktion der Platzpräferenz innerhalb der Durchgänge (und gemittelt für sieben Durchgänge) hin. Bei den alten Tieren war die Platzpräferenz für den VPQ während der verschiedenen Intervalle der 2-minütigen Durchgänge ähnlich. (§ = $P \leq 0.05$, innerhalb einer Gruppe; * = $P \leq 0.05$, zwischen den Gruppen)

Aufenthaltszeiten im äußeren und mittleren Ring. Die Aufenthaltszeiten im äußeren Ring (%) während der Extinktionsdurchgänge sind in Abb. 4A aufgeführt. Beide Gruppen zeigten einen Anstieg in den Aufenthaltszeiten im äußeren Ring über die Durchgänge (alt: $P < 0.0001$; adult: $P = 0.004$). Ein Vergleich zwischen den Altersgruppen ergab keinen Unterschied bezüglich den mittleren Gesamtaufenthaltszeiten (über sieben Durchgänge gemittelt) ($P = 0.81$).

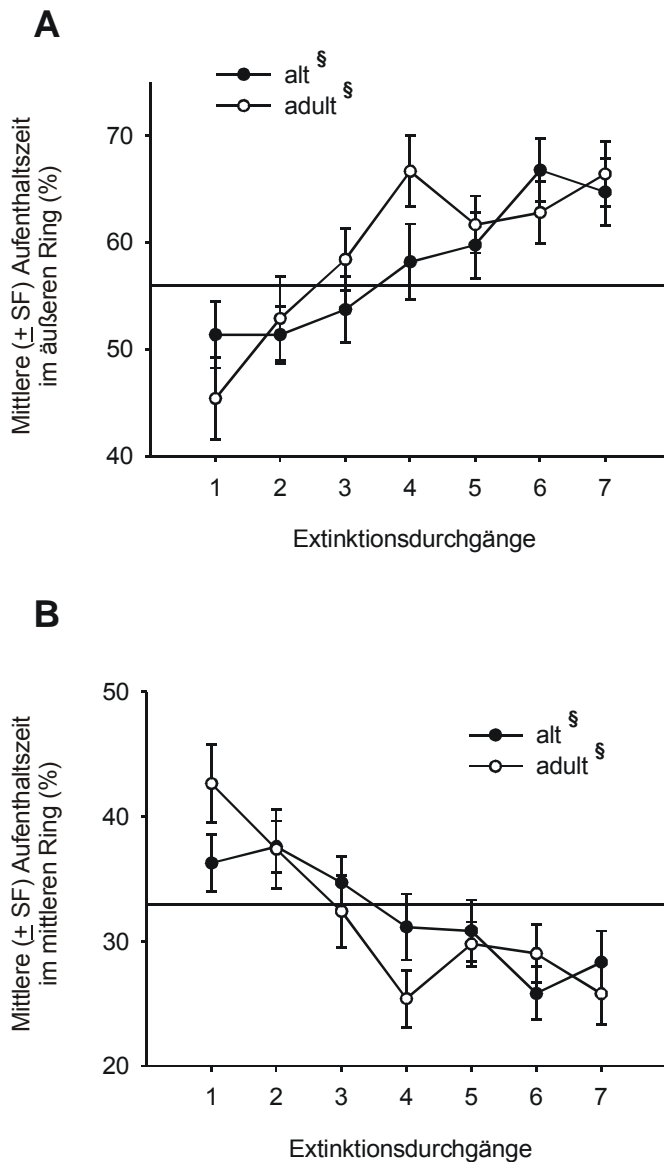


Abb. 4. Aufenthaltszeiten im äußeren und mittleren Ring während der Extinktion. Dargestellt sind die Leistungen der alten ($n = 27$) und adulten ($n = 8$) Tiere über sieben Tage Extinktion. (A) Die Aufenthaltszeiten im äußeren Ring wurden für jeden Durchgang gemessen und stiegen über die Durchgänge für beide Altersgruppen auf ähnliche Weise an. (B) Die Aufenthaltszeiten im mittleren Ring wurden für jeden Durchgang für beide Altersgruppen gemessen. Die Gruppen zeigten ein ähnliches Gefälle in der Platzpräferenz während der Extinktionsdurchgänge. (§ = $P \leq 0.05$, innerhalb einer Gruppe; * = $P \leq 0.05$, zwischen den Gruppen)

Die Aufenthaltszeiten (%) im mittleren Ring des Wasserlabyrinths während der Extinktionsdurchgänge sind in Abb. 4B dargestellt. Beide Altersgruppen zeigten ein Gefälle in den Aufenthaltszeiten in diesem Areal über die Durchgänge (alt: $P < 0.0001$; adult: $P = 0.001$). Wie in Abb. 4B zu erkennen ist, ergab sich kein Gruppenunterschied bezüglich der Gesamtpromanz über sieben Durchgänge ($P = 0.94$).

Die extinktions-induzierte Immobilität. Es wurde hypothetisiert, dass der aufgrund des Entfernens der Plattform entstehende Verlust von Verstärkung während der Extinktion, ein negatives Befinden und eine Veränderung im Verhalten, nämlich die Entstehung von Immobilität, verursachen würde. Wie erwartet, konnte während der Durchgänge eine stetig ansteigende Immobilität beobachtet werden, welche der im

Forced Swimming Test beobachtbaren Immobilität, die als Ausdruck von „Hoffnungslosigkeit“ bezeichnet wird, ähnelte. Bei den alten ($P = 0.0005$, einseitig) und adulten ($P = 0.007$, einseitig) Tieren steigerte sich die Dauer der Immobilität über die 2-minütigen Durchgänge (Abb. 5A). Ein Vergleich der Gruppen zeigte, dass die alten Tiere mehr Immobilität während der ersten 5 Durchgänge aufwiesen als die adulten ($P = 0.039$, einseitig), nicht jedoch während der gesamten 7 Durchgänge ($P = 0.22$, einseitig).

Außer der Dauer der Immobilität (Abb. 5A), erhöhte sich während der Durchgänge auch die Anzahl der Tiere, die immobil wurden (Abb. 5B). Abb. 5B zeigt, dass während der ersten 5 Extinktionsdurchgänge mehr alte als adulte Tiere immobil wurden. Am Ende der Durchgänge wiesen in beiden Altersgruppen jedoch ca. 60 % der Tiere eine Immobilität auf.

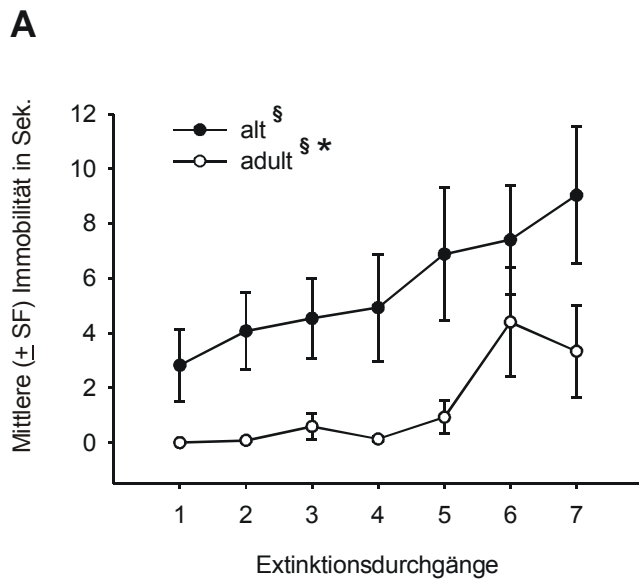
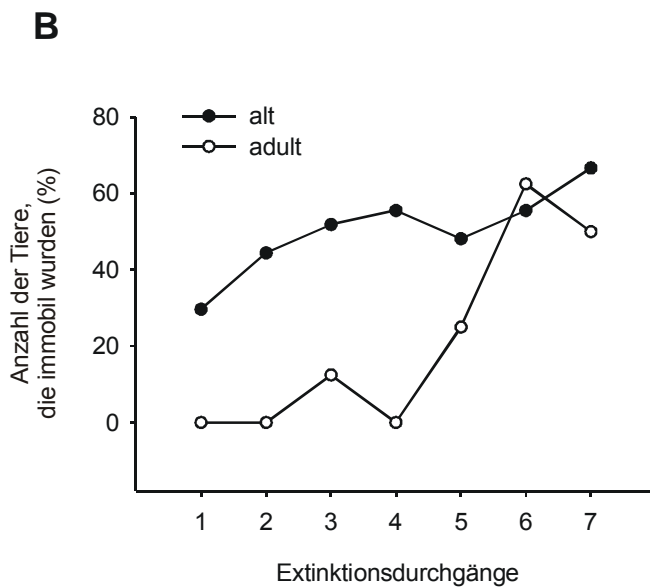


Abb. 5. Extinktions-induzierte Immobilität. (A) Die Dauer der Immobilität bei den alten ($n = 27$) und adulten ($n = 8$) Tieren während jedes Extinktionsdurchgangs. In beiden Gruppen erhöhte sich die Immobilität über die Durchgänge. (B) Die Anzahl der Tiere, die pro Durchgang mindestens 1 Sek. lang immobil wurden, wurden gezählt und deren Anzahl als prozentualen Anteil der gesamten Stichprobe dargestellt. In beiden Gruppen stieg die Anzahl der Tiere, die immobil wurden, während der Durchgänge an. (§ = $P < 0.05$, innerhalb eine Gruppe; * = $P < 0.05$, zwischen den Gruppen)



Die Immobilität wurde auch separat für die unterschiedlichen Zeitintervalle analysiert, d.h. für die ersten, zweiten, dritten und letzten 30 Sek. jedes Durchgangs. Die Daten der alten Tiere sind in Abb. 6A und die der adulten Tiere in Abb. 6B aufgeführt.

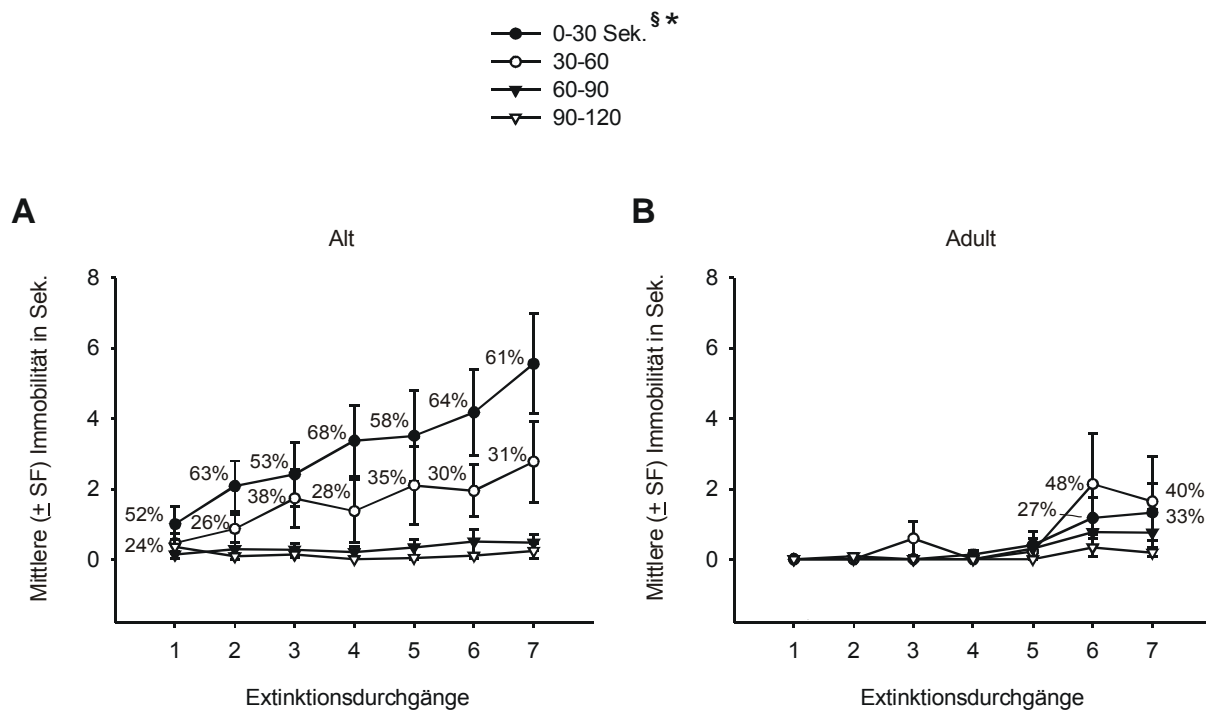


Abb. 6. Extinktions-induzierte Immobilität während der verschiedenen Zeitintervalle. Die mittlere (\pm SF) Dauer der Immobilität in den alten (A) und adulten (B) Tieren ist jeweils separat für jedes Zeitintervall der Extinktionendurchgänge aufgeführt. Die Prozentwerte stellen den Anteil der Gesamtimmobilität dar, die jeweils im ersten und zweiten Intervall jedes Durchgangs auftrat. Ca. 90% der Immobilität trat bei den alten Tieren regelmäßig während der ersten Min. jedes Durchgangs auf, bei den adulten Tieren betrug der Anteil 70%. Dies deutet daraufhin, dass Müdigkeitserscheinungen wahrscheinlich nicht die Ursache dieses Verhaltens sind. (§ = $P < 0.05$, innerhalb einer Gruppe; * = $P < 0.05$, zwischen den Gruppen)

In beiden Altersgruppen stieg die Dauer der Immobilität während der ersten 30 Sek. jedes Durchgangs an (alt: $P = 0.0002$; adult: $P = 0.01$), nicht aber während der zweiten 30 Sek. der 2-minütigen Durchgänge (alt: $P = 0.07$; adult: $P = 0.14$). Die dritten und vierten Intervalle wurde nicht weiter analysiert, da die Mediane in beiden Gruppen zu niedrig waren. Wie in Abb. 6 zu erkennen ist, trat die meiste Immobilität bei den alten Tieren in den ersten 30 Sek. oder in beiden Altersgruppen in der ersten Min. jedes Durchgangs auf. Auch aufgeführt sind die prozentualen Anteile der Gesamtimmobilität, die in den ersten und zweiten Intervallen jedes Durchgangs auftraten. Es zeigte sich, dass bei den alten Tieren ca. 60 % der Immobilität während des ersten Intervalls und 30 % während des zweiten Intervalls auftraten.

Bei den adulten Tieren traten ca. 70 % der Gesamtimmobilität während der ersten Min. der letzten beiden Durchgänge auf. Über die Intervalle hinweg fiel die Immobilität (gemittelt über 7 Durchgänge) bei den alten Tieren ab ($P < 0.0001$). Bei den adulten Ratten veränderten sich diese Werte nicht, wenn alle Intervalle betrachtet wurden ($P = 0.30$), fielen jedoch von der ersten zur zweiten Minute ab ($P = 0.03$). Da in jedem Extinktionsdurchgang die meiste Immobilität in der ersten Minute stattfand, sind Müdigkeitserscheinungen nicht die Ursache der Entstehung der Immobilität. Auch kann die Zunahme der Immobilität über die Durchgänge nicht die Folge von Verstärkung am Ende des Durchgangs sein, d.h. auf die Entnahme des Tieres aus dem Labyrinth zurückzuführen sein. Zuletzt zeigten Gruppenvergleiche, dass die adulten Tiere insgesamt weniger Immobilität während der ersten 5 Durchgänge zeigten als die alten Tiere (0-30 Sek. Intervalle: $P = 0.048$), jedoch das Level der alten Tiere erreichten, wenn alle 7 Durchgänge in Betracht gezogen wurden (0-30 Sek. Intervalle: $P = 0.14$). Es ergaben sich keine Gruppenunterschiede, wenn die Werte des zweiten Intervalls verglichen wurden (alle 7 Durchgänge: $P = 0.7$; Durchgänge 1-5: $P = 0.25$).

3.4.4.4 Korrelationen zwischen der Immobilität und der Lernfähigkeit im Wasserlabyrinth

Alte Tiere weisen beträchtliche interindividuelle Differenzen im Wasserlabyrinthlernen auf und es hat sich als nützlich erwiesen, Korrelationen zwischen abhängigen Variablen für Subgruppen, wie z.B. den besseren und schlechteren Lernern, separat durchzuführen, da sich diese im Grad sowie in der Valenz voneinander unterscheiden können, möglicherweise aufgrund einer Nicht-Linearität der kognitiven Maße (Schulz et al., 2002; Schulz und Huston, 2002) oder der Verhaltensdomäne, die sich zum gegebenen Zeitpunkt mit dem Altern verändern (Gallagher und Burwell, 1989; Coleman et al., 2004). Um die Zusammenhänge zwischen dem Ausmaß an Immobilität und der Performanz während der Akquisition zu untersuchen, wurden die alten Tiere aufgrund der mittleren Gesamtschwimmzeiten zur verborgenen Plattform während der Akquisition in bessere, mittlere und schlechtere Lerner unterteilt ($n = 9$ pro Gruppe) und miteinander sowie mit den adulten Tieren verglichen. Wie in Abb. 7 zu erkennen ist, wiesen die schlechteren Lerner die meiste Immobilität im Vergleich zu den besseren ($P = 0.1$) und mittleren ($P = 0.12$) Lernern auf und unterschieden sich bezüglich der mittleren Immobilität (7 Durchgänge gemittelt) von den adulten Tieren ($P = 0.038$). Die besseren und mittleren alten Lerner unterschieden sich nicht

voneinander ($P = 0.82$) und unterschieden sich auch nicht von den adulten Tieren ($P = 0.77$ bzw. $P = 0.86$).

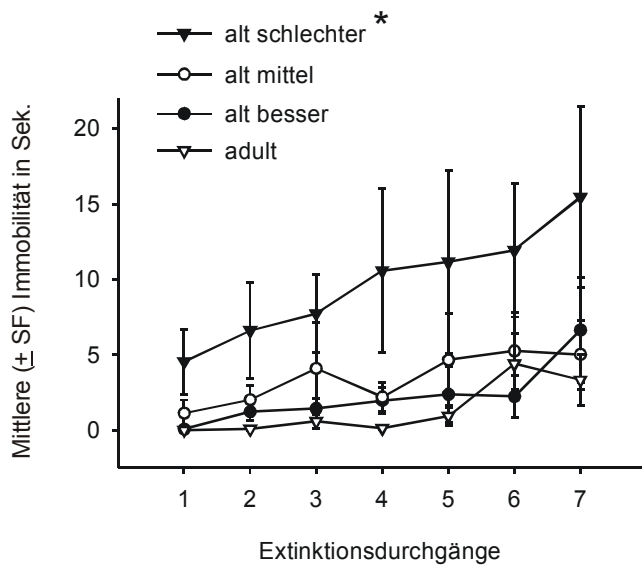


Abb. 7. Zusammenhänge zwischen Immobilität, Lernfähigkeit und Extinktion im Wasserlabyrinth. (A) Die alten Tiere ($n = 27$) wurden in besser-, mittel-, und schlechterlernende Tiere ($n = 9$) aufgrund der Schwimmzeiten zur verborgenen Plattform während der Akquisition eingeteilt. Die Immobilität (Sek.) dieser Tiergruppen und auch die der adulten ($n = 8$) Tiere sind für alle 7 Durchgänge aufgeführt. Die meiste Immobilität wurde von den schlechteren alten Lernern gezeigt. Ein schlechteres Lernvermögen könnte demnach ein Vulnerabilitätsfaktor für die Entstehung von Immobilität sein. (* $P \leq 0.05$, im Vergleich zur adulten Tiergruppe)

3.4.4.5 Korrelationen zwischen der Immobilität und post-mortem Neurotransmitterkonzentrationen

Als nächstes wurden die alten und adulten Tiere auf verschiedene Botenstoffkonzentrationen im Hippocampus und ventralen Striatum analysiert. Diese wurden mit der über die 7 Durchgänge gemittelten Immobilität korreliert. Bei den alten Tieren korrelierten ACh (Abb. 8A), DOPAC (Abb. 8B) und DA (Abb. 8C) im ventralen Striatum mit dem Immobilitätslevel ($r = 0.48$, $P = 0.01$; $r = 0.48$, $P = 0.01$ und $r = 0.5$, $P = 0.008$); höhere Botenstoffkonzentrationen korrelierten mit mehr Immobilität. Die Korrelationen zwischen NE, 5-HIAA, 5-HT, DOPAC/DA, 5-HIAA/5-HT und der Immobilität waren alle nicht bedeutsam ($0.13 < P < 0.96$). Bei den adulten Tieren korrelierte mehr NE im ventralen Striatum mit weniger Immobilität ($r = -0.64$, $P = 0.09$, Abb. 8D). Keine der anderen Variablen korrelierten in dieser Gruppe miteinander ($0.12 < P < 0.87$). Ebenso korrelierten auch nicht die Botenstoffkonzentrationen des Hippocampus mit der Immobilität in den alten ($0.24 < P < 0.88$) oder adulten ($0.3 < P < 0.97$) Tieren.

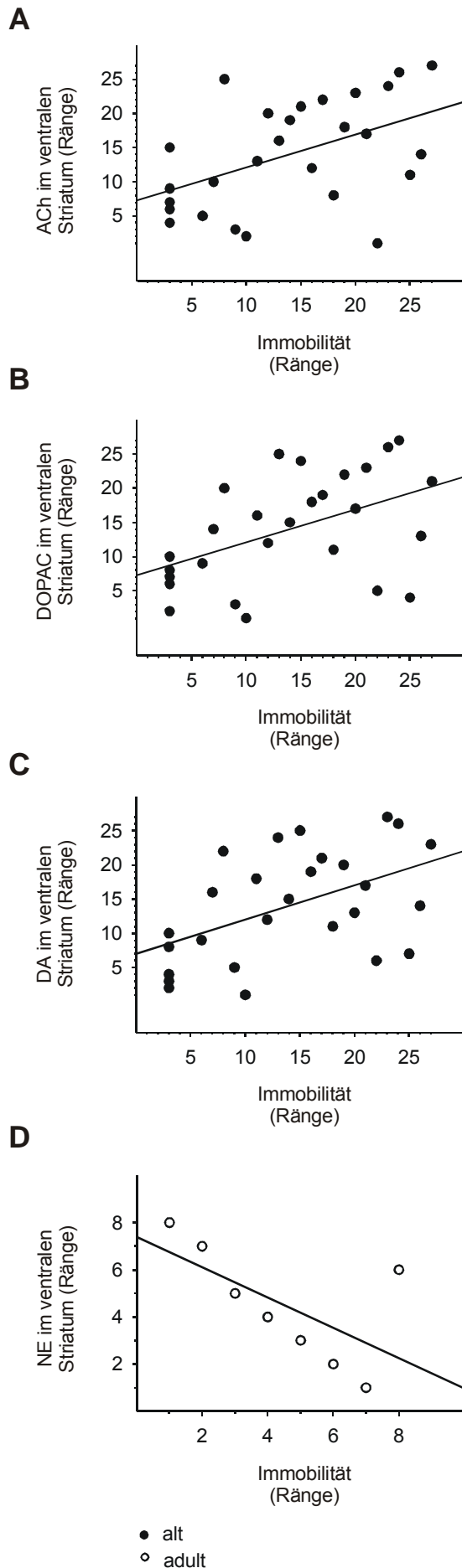


Abb. 8. Korrelationen zwischen Immobilität und Botenstoffkonzentrationen im ventralen Striatum. In der Gruppe der alten Tiere (n = 27) korrelierte die Immobilität positiv mit dem Botenstoffgehalt im ventralen Striatum, einschließlich (A) ACh, (B) DOPAC, and (C) DA. Bei den adulten Tieren (D) korrelierte NE im ventralen Striatum negativ mit dem Immobilitätslevel. Auf der Y-Achse stehen niedrigere Ränge für niedrigere Botenstoffkonzentrationen und auf der X-Achse stehen niedrigere Ränge für weniger Immobilität.

3.4.5 Diskussion

Detaillierte Analysen des Schwimmverhaltens im Wasserlabyrinth in alten und adulten Ratten ergaben typische, mit dem Altern assoziierte Defizite im Wasserlabyrinthlernen; im Vergleich zu adulten Tieren benötigten die alten Tiere mehr Zeit, um auf die Plattform zu gelangen, hielten sich kürzere Zeit im Plattformquadranten und im mittleren Ring des Labyrinths auf und schwammen für längere Zeit an der Wand entlang. Obwohl die alten Tiere während der Extinktionsdurchgänge ohne Plattform eine Platzpräferenz für den vorherigen Plattformquadranten (VPQ) aufwiesen, schien sich diese Präferenz über die Durchgänge nicht zu verringern. Im Gegensatz hierzu nahm die Platzpräferenz für den VPQ bei den adulten Tieren über die Durchgänge ab. In beiden Altersgruppen nahmen die Schwimmzeiten im äußeren Ring des Labyrinths über die Extinktionsdurchgänge zu und im mittleren Ring ab. So weit wie die Immobilität ein negatives emotionales Befinden reflektiert, war die Extinktion hiermit assoziiert; nicht nur der Immobilitätslevel stieg über die Durchgänge an, sondern auch die Anzahl der Tiere, die immobil wurden. Zusätzlich exprimierten die alten Tiere mehr Immobilität als die adulten, welches teilweise durch die schlechtere Performanz während der Akquisition erklärt werden konnte. In beiden Altersgruppen korrelierte die Immobilität mit dem Botenstoffgehalt im ventralen Striatum, obwohl unterschiedliche Botenstoffsysteme in den jeweiligen Gruppen involviert waren.

3.4.5.1 Akquisition im Wasserlabyrinth bei alten und adulten Ratten

Beim Platzlernen repräsentiert das Fluchtverhalten auf eine verborgene Plattform im Wasserlabyrinth einen Verhaltenskomplex, welcher u.a. die Formation einer Assoziation zwischen diskriminativen Reizen im Umfeld und all dem, was unter das Navigationslernen fällt, beinhaltet. Dieser Verhaltenskomplex kann als „operant“ konzeptionalisiert werden, der durch die verstärkenden Eigenschaften der Sicherheit, welche die Plattform mit sich bringt, operant verstärkt wird. Der Prozess der operanten Verstärkung einer Assoziation kann als Konsequenz einer direkten Wirkung von Verstärkern auf die Gedächtnisspur betrachtet werden (Thorndike, 1898; Huston et al., 1977; White, 1996). Demnach werden die Schwimmzeiten zur Plattform über die Trainingsdurchgänge progressiv kürzer und andere Indikatoren des räumlichen Lernens, wie z.B. das Schwimmen im Plattformquadranten, nehmen zu, wie es auch in dieser Studie der Fall war. Weitere Verhaltensweisen, die sich während des Fluchtlernens veränderten, beinhalteten eine progressive Steigerung

des Schwimmens im mittleren Ring des Labyrinths und eine Abnahme im äußeren Ring. Das Wegschwimmen von der Wand in das Innere des Labyrinths könnte eine Form des Prozedurlernens darstellen (Cain, 1998), welches sich zusammen mit dem Navigationslernen verändert. Beide Lernformen stehen jedoch unter der Kontrolle der negativen Verstärkung, die von der Plattform ausgeht, und sind in der Variable „Schwimmzeit zur Plattform“ enthalten.

In der gegenwärtigen Studie konnten altersbedingte Unterschiede im Erlernen des Wasserlabyrinths beobachtet werden; die Verstärkung des räumlichen Lernens, gemessen anhand den Schwimmzeiten zur verborgenen Plattform und im Plattformquadranten, dauerte bei den alten Tieren länger und erreichte im Vergleich zu den adulten Tieren nicht dasselbe Level. Diese Beobachtung entspricht denen anderer Studien (z.B., Rapp et al., 1987; Gage et al., 1989; Frick et al., 1995). Dementsprechend waren bei den alten Tieren auch die Aufenthaltszeiten im mittleren Ring niedriger und die im äußeren Ring höher (siehe auch Yau et al., 1994) als bei den adulten Tieren. Dass die Verstärkung der Fluchtreaktion bei den alten Tieren geringer ausfiel, könnte darauf basieren, dass alte Tiere auf maladaptiven, konkurrierenden Verhaltensweisen beharren, wie z.B. an der Wand entlang zu schwimmen. Alte Tiere weisen eine Rigidität im Verhalten auf und haben Schwierigkeiten damit, auf neue Anforderungen zu reagieren (Stephens et al., 1985; Means und Holsten, 1992). Diese Rigidität dürfte im Wasserlabyrinth sogar verstärkt werden, da alte Tiere intermittierend die Plattform in der gegebenen Zeit nicht selbst erreichen und dafür belohnt werden, indem sie vom Versuchsleiter zur Plattform geleitet werden. Bei solchen Durchgängen zeigen die Tiere oft einen hohen Anteil an Thigmotaxis, welches offensichtlich mit dem Lernen, auf die Plattform zu entkommen, konkurriert (Devan et al., 2003).

3.4.5.2 Extinktion im Wasserlabyrinth bei alten und adulten Ratten

Die Extinktion des zuvor belohnten Verhaltenskomplexes, d.h. auf die Plattform zu entfliehen, wurde erfasst, indem die Tiere multiple Schwimmdurchgänge ohne Plattform erhielten und z.B. die Aufenthaltszeiten im vorherigen Plattformquadranten (VPQ) während der Durchgänge gemessen wurden. Wie erwartet zeigten die adulten Tiere eine stärkere Platzpräferenz für den VPQ als die alten Tiere im Einklang mit der „Resistance-To-Extinction“ Hypothese. Diese Hypothese besagt, dass eine besser gelernte Assoziation auch der Extinktion besser standhält (Williams, 1938). Unerwartet war der Befund, dass die alten Tiere im Gegensatz zu

den adulten keine eindeutige Extinktion der Platzpräferenz aufwiesen, wie aus der fehlenden Veränderung der Präferenz für den VPQ über die Durchgänge zu erkennen ist. Selbst als die Dauer der Durchgänge als mögliche interagierende Variable in Betracht gezogen wurde und die Durchgänge für jeweils vier verschiedene Zeitintervalle separat untersucht wurden, ergab sich das gleiche Bild. Eher als eine adaptive Form der „Resistance-To-Extinction“, könnte die fehlende Veränderung in der Platzpräferenz für den VPQ auch ein Beharren auf dem einmal gelernten Verhalten sein (Stephens et al., 1985; Means und Holsten, 1992), obwohl ebenso angenommen werden kann, dass die Platzpräferenz bei den alten Tieren insgesamt sehr niedrig war, gegebenenfalls zu niedrig, als dass sich eine Extinktion hätte ergeben können. Hinsichtlich der großen Varianz in der Platzpräferenz für den VPQ während der Durchgänge, die sich teilweise bis zur Zufallsschwelle erstreckte, könnte auch angenommen werden, dass die Extinktion der Platzpräferenz zumindest bei einem Teil der Tiere schon bei ersten Durchgang stattgefunden hat.

In Bezug auf das Prozedurlernen wurden die Altersgruppen für ähnlich befunden, denn sie wiesen eine vergleichbare Abnahme in den Aufenthaltszeiten im mittleren Ring und eine Zunahme im äußeren Ring des Labyrinths auf. Während die adulten Tiere folglich eine Extinktion im Navigations- und Prozedurlernen nach der Entnahme der Plattform aufwiesen, beeinflusste die Extinktion besonders das Prozedurlernen bei den alten Tieren.

3.4.5.3 Die extinktions-induzierte Immobilität bei alten und adulten Ratten – Interaktion mit der Lernfähigkeit

Die Extinktion bzw. der Entzug von Verstärkung sind wirksame Aktivatoren der HPA-Achse (McEwen, 2000) und eruieren aggressive Reaktionen in operanten Aufgaben aus (Dollard et al., 1939; Kelly und Hake, 1970; Huston und DeSisto, 1971; Huston, 1978). In der gegenwärtigen Studie hielten wir es für möglich, dass der Entzug von Verstärkung durch das Entfernen der Plattform aus dem Wasserlabyrinth auch eine „gelernte Hoffnungslosigkeit“ induzieren könnte. Die Hoffnungslosigkeit ist bei Patienten mit depressiver Symptomatik oder mit depressions-assoziierten Funktionsstörungen, wie Aggression, assoziiert. Es wird angenommen, dass die „gelernte Hoffnungslosigkeit“ in Tieren im „Forced Swimming Test“ induziert wird; in diesem Test wird das Tier in einen kleinen mit Wasser gefüllten Zylinder platziert, ohne Möglichkeit diesem zu enttrinnen. Die Konsequenz einer solchen Erfahrung äußert sich in immobilem Verhalten, welches, da es durch die Gabe von

Antidepressiva reduziert wird, als depressiver Zustand bezeichnet wird (Porsolt et al., 1977). Dem Verhalten im „Forced Swimming Test“ entsprechend, erwarteten wir, dass eine „gelernte Hoffnungslosigkeit“, gemessen am Grad der Immobilität, auch im Wasserlabyrinth, als Folge der Extinktion, auftreten könnte.

Die gegenwärtige Studie zeigte, dass über multiple Schwimmdurchgänge ohne Plattform die Immobilität und die Anzahl der Tiere, die immobil wurden, in beiden Altersgruppen zunahm. In der adulten Gruppe trat die Immobilität jedoch erst spät, d.h. während der letzten 2-3 von insgesamt 7 Durchgängen auf und betrug in der Gesamtdauer weniger als bei den alten Tieren. Das späte Auftreten der Immobilität bei den adulten Tieren koinzidierte mit der Extinktion der Platzpräferenz für den zuvor belohnten Quadranten, vermutlich als die „Hoffnungslosigkeit“ eingetreten oder gelernt worden war. Umgekehrt könnte die relative Resistenz, das zuvor belohnte Verhalten während der ersten Durchgänge zu extinguieren, ein Indiz für eine noch vorhandene „Hoffnung“ und damit verbundene Erwartung, auf die Plattform entkommen zu können, sein. Wir haben die Immobilität ebenfalls bezüglich einer Interaktion mit dem Lernverhalten untersucht und herausgefunden, dass die letztere Variable, zusätzlich zum Alter, einen Teil der Varianz in der Dauer der Immobilität erklären konnte. Die schlechteren Lerner wiesen von den alten Tieren die meiste Immobilität auf und unterschieden sich statistisch von den adulten Tieren. Ein schlechteres Platzlernen stellte demnach ein Vulnerabilitätsfaktor für den Grad der Ausprägung immobilen Verhaltens dar. In der Tat wurde schlechteres Lernen im Alter schon oft mit einer verminderten negativen Feedback-Regulation der HPA-Achse assoziiert, welches darauf hindeutet, dass diese Tiere vermehrten Stress erfahren (Issa et al., 1990; Yau et al., 1995; Bizon et al., 2001), und welche durch Gabe von Antidepressiva wiederhergestellt werden kann (Rowe et al., 1997). Eine Störung in der Regulation der HPA-Achse wurde mit depressiven Symptomen in Patienten assoziiert (Akil und Morano, 1995) und könnte, zusammen mit einer schlechteren Lernfähigkeit und deren Korrelate, einen Schaltkreis von Faktoren darstellen, der zum Vorkommen dieser Krankheit beiträgt.

3.4.5.4 Neurochemische Korrelate der Immobilität

Obwohl die hippocampale Neurochemie eine Rolle bei genetischen und Umweltmodellen der Depression zu spielen scheint (Yadid et al., 2000), waren in der gegenwärtigen Studie die Botenstoffkonzentration in diesem Areal nicht mit der Immobilität im Wasserlabyrinth assoziiert. Jedoch wurden verschiedene

Korrelationen zwischen den Botenstoffkonzentrationen im ventralen Striatum, einem Areal, das den Nucleus accumbens mit einschließt, und der Immobilität gefunden. Wir fanden z.B. heraus, dass mehr Immobilität mit höheren Konzentrationen von DA sowie dem dopaminergen Metaboliten DOPAC im ventralen Striatum korrelierte. Dieser Befund ist von besonderem Interesse, da Experimente mit anderen Depressionsmodellen wiederholt auf die Rolle des Dopamins im Nucleus accumbens bei einer depressiven Symptomatik hingewiesen haben; Arbeiten mit dem Chronic Mild Stress Modell zeigten z.B., dass die Anhedonie oder die Subsensitivität für Verstärkung, die durch Chronic Mild Stress hervorgerufen wird, mit einer Herabsetzung der Sensitivität post-synaptischer D2-Rezeptoren einhergeht, sekundär zu einer chronischen Erhöhung der Ausschüttung von Dopamin im Nucleus accumbens (Willner, 1991; Stamford et al., 1991; Willner et al., 1992). Der Nucleus accumbens vermittelt die belohnenden Eigenschaften der Verstärkung, aber auch die adaptiven Reaktionen eines Organismus auf Stress und Frustration, wie z.B. die durch die Extinktion von selbst-applizierter Verstärkung verursachten Reaktionen oder solche, die durch die Erfahrung eines aversiven Stimulus, wie z.B. eines intermittierenden Fußschocks herbeigeführt werden (Zangen und Shalev, 2003). In einem genetischen Depressionsmodell weisen Ratten der Flinders Sensitive Line (FSL), d.h. zur Depression neigende Tiere, mehr Immobilität im Forced Swimming Test auf als Kontrolltiere und unterscheiden sich merklich in den post-mortem Botenstoffkonzentrationen u.a. von DA und DOPAC im Nucleus accumbens (Zangen et al., 1999). Bezüglich der Korrelationen zwischen der extinktions-induzierten Immobilität und DA sowie DOPAC stehen die Daten der gegenwärtigen Studie demnach in Einklang mit anderen Studien, welche die biologischen Hintergründe der depressiven Symptomatik untersuchen.

Ebenfalls wurde in der gegenwärtigen Studie eine Korrelation zwischen ACh im ventralen Striatum und der Immobilität in den alten Tieren gefunden. Verschiedene Forschungen weisen daraufhin, dass ACh in diesem Areal Reaktionen auf aversive Ereignisse vermittelt. Das ventrale Striatum erhält cholinerge Projektionen von den sogenannten limbischen Arealen des Gehirns, wie dem Hippocampus und der Amygdala, welche an der Vermittlung der Stressreaktion durch die HPA-Achse beteiligt sind (Herman und Cullinan, 1997). Weiterhin wurde gezeigt, dass ACh im Nucleus accumbens eine Rolle beim Entzug von Suchtdrogen (Rada et al., 1991) und anderen aversiven Ereignissen, wie z.B. Injektionen (Pfister et al., 1994) spielt.

Überdies wurde der zur Depression neigende Rattenstamm FSL selektiv gezüchtet, um im Gegensatz zu den Kontrolltieren eine erhöhte Sensitivität auf cholinerge Drogen aufzuweisen, welches ein Hauptmerkmal der menschlichen Depression darstellt (Yadid et al., 2000). Zusätzlich wurde gezeigt, dass Nikotin sowie klassische Antidepressiva, die - durch Forced Swimming induzierte - Immobilität in diesen Tieren reduzieren (Tizabi et al., 1999; Zangen et al., 1999).

Eine erfolgreiche Behandlung der depressiven Symptomatik bei Patienten basiert zumeist auf Drogen, die das serotonerge und noradrenerge Botenstoffsystem selektiv stimulieren. Dementsprechend wurde die monoaminerge Hypothese zur Entstehung der Depression aufgestellt, die besagt, dass Depressionen durch eine allgemeine Minderung der Neurotransmission von Monoaminen (besonders 5-HT und NE) verursacht wird (z.B., Maes und Meltzer, 1995). Obwohl die gegenwärtigen Daten keinen Zusammenhang zwischen der Immobilität und den Botenstoffkonzentrationen des serotonergen Systems abbilden, korrelierte NE des ventralen Striatums mit der Immobilität in den adulten Tieren. In dieser Gruppe war weniger NE mit mehr Immobilität assoziiert. Dieser Befund stimmt mit der These überein, dass schwerer Stress, wie z.B. unkontrollierbarer Stress, zu einem erhöhten Verbrauch von NE führt, welches durch eine erhöhte Synthese nicht mehr kompensiert werden kann und demnach zu depressiven Symptomen sowie einem Abfall in den NE Konzentrationen führt (Anisman und Zacharko, 1992). In einem anderen Depressionsmodell war jedoch eine höhere Immobilität u.a. mit mehr post-mortem NE im Nucleus accumbens assoziiert (Zangen et al., 1999).

3.4.5.5 Die extinktions-induzierte Immobilität als Depressionsmodell

Zusammenfassend legen die gegenwärtigen Daten eine Verbindung zwischen der Extinktion der gelernten Sicherheit im Wasserlabyrinth und der Entstehung immobilen Verhaltens nahe, wobei letztere im Allgemeinen als eine Simulation der Inaktivität depressiver Patienten verstanden wird. In einer follow-up Studie, in welcher multiple Extinktionsdurchgänge am jeweiligen Testtag und an unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Akquisition im Wasserlabyrinth stattfanden (Topic et al., 2005), konnten wir unsere Befunde, dass sich die Dauer der Immobilität und auch die Anzahl der Tiere, die immobil wurden, über die Durchgänge erhöht, bestätigen. Interessanterweise konnten wir in der gegenwärtigen Studie (und auch in der follow-up Studie) zeigen, dass die meiste Immobilität am Anfang der Extinktionsdurchgänge auftrat (während der ersten von zwei Minuten), welches die

Möglichkeit, dass dieses Verhalten entweder auf Erschöpfung oder auf der Erwartung beruht, dass eine Belohnung folgt, nämlich die Rettung durch den Versuchsleiter, ausschließt. Stattdessen ist dieses Verhalten wahrscheinlich mit der Erfahrung von Nicht-Verstärkung oder „Hoffnungslosigkeit“ verknüpft, wobei bei der letzteren davon ausgegangen wird, dass sie im Forced Swimming Test induziert wird. Ein wichtiger Unterschied zwischen dem Forced Swimming Test und dem gegenwärtigen Modell besteht darin, dass im hiesigen Test die Immobilität mit vorhergehenden Lernerfahrungen interagiert, die im gleichen Instrument gemessen werden und mit der Immobilität direkt in Verbindung gebracht werden können. Bedeutend war ebenso der Befund, dass die neurobiologischen Korrelate der Immobilität in der gegenwärtigen Studie im Einklang mit Depressionsmodellen standen, die das ventrale Striatum als ein wichtiges Areal für die Vermittlung der depressiven Symptomatik beurteilen. Interessanterweise korrelierte die Immobilität in der hiesigen Studie altersabhängig mit unterschiedlichen Botenstoffsystemen. Eine weitere Differenzierung der Faktoren, die zwischen der Hoffnungslosigkeit im Erwachsenen und fortgeschrittenen Alter unterscheiden können, wie z.B. die Lernfähigkeit, könnte auf wichtige Weise Einsicht in die biologischen Hintergründe der Depression verschaffen bzw. für die Suche nach neuen Behandlungsmethoden bei alten Menschen maßgeblich sein. Das gegenwärtige Modell könnte für diese Absichten nützlich sein, da es die gemeinsame Untersuchung von voneinander abhängigen Prozessen, wie Emotionalität, Lernen und Gedächtnis, erlaubt.

4 Allgemeine Diskussion und Ausblick

Zusammenfassend ergaben die Untersuchungen aus den Projekten I, II und III überraschend komplexe Zusammenhänge zwischen den untersuchten Variablen wie dem Lernen im Wasserlabyrinth, der Exploration im Offenfeld, der Angst in einer Black/White Box und den neurobiologischen Variablen STP und LTP im Hippocampus und Striatum und der ChAT und NMDA Rezeptor Untereinheiten mRNA im Striatum, die darauf hindeuten, dass das Altern von einer bedeutenden Heterogenität gekennzeichnet ist. Dies ergibt sich z.B. aus der Erkenntnis, dass es möglich ist, Subpopulationen oder -gruppen zu finden, die sich durch bestimmte Eigenschaften auszeichnen und voneinander unterscheiden. Wie dargestellt, können sich innerhalb eines Spektrums einer Rangordnung alter Tiere Segmente von Individuen befinden, die im Vergleich zu den restlichen Segmenten in ihren Charakteristiken stark abweichen, z.B. in der Valenz ihrer Zusammenhänge zwischen zwei Variablen. Solche Ergebnisse fordern die nähere Ergründung der Verhaltensvarianz, die, wie oben beschrieben, auf den für die Subgruppen unterschiedlich ausgeprägten Einflüssen dritter Variablen basieren könnten und die möglicherweise ein neues Gebiet in der Altersforschung eröffnen. Kurzfristig gesehen stehen Vorhaben zur inhaltlichen Validierung der Subgruppen an, die sich in Projekt III mit der Sliding Window Correlation Methode ergaben. Statistische Vergleiche zwischen den Individuen, für die das Lernen im Wasserlabyrinth positiv mit der Offenfeldexploration korrelierte und jenen, für die der Zusammenhang negativ war, könnten zur Formulierung neuer Hypothesen beitragen. Ein möglicher Ansatz wäre zu untersuchen, in wie weit sich diese Subgruppen in ihrer Exploration im Wasserlabyrinth unterscheiden, die anhand von Aufrichtungen und Rotationen auf der verborgenen Plattform gemessen werden können und von denen man ausgeht, dass sie zum räumlichen Lernen im Wasserlabyrinth beitragen (Sutherland und Dyck, 1984).

Im Allgemeinen stellt sich die Frage, ob sich die Subgruppen, die sich aus den unterschiedlichen Zusammenhängen zwischen den untersuchten Variablen ergaben, erst im Alter entstanden sind oder möglicherweise schon im jüngeren Alter vorhanden waren. Bislang wurde die Verhaltensvarianz in adulten Tieren eher als Fehlervarianz eingestuft, obwohl es möglich wäre, dass im adulten Alter ebenfalls

Subgruppen existieren, die sich in ihren Eigenschaften voneinander unterscheiden. Wie unter Punkt 1.2 erwähnt, stellten Dellu et al. (1994) fest, dass junge, in einer neuen Umgebung besonders aktive Ratten im Alter Gedächtnisdefizite aufwiesen, von denen eine weniger aktive Gruppe verschont blieb. Es ist bekannt, dass der Alterungsprozess nicht immer progressiv fortschreitet und sich Variablen früh im Leben verändern und dann relativ stabil bleiben können, über einen längeren Lebenszeitraum stabil bleiben und sich erst im späteren Alter verändern, oder sich erst in die eine Richtung und später in die entgegengesetzte Richtung ändern (Coleman et al., 2004). Um den Verlauf der sich über den Alterungsprozess entwickelnden interindividuellen Varianzen zu untersuchen, müssten die Tiere demnach mehrfach, in regelmäßigen Abständen, charakterisiert werden.

Die Ergebnisse aus Projekt IV dieser Arbeit deuten daraufhin, dass die interindividuellen Differenzen in der Lernfähigkeit im Alter auch bei der Depressivität eine Rolle spielen. Es zeigte sich, dass besonders die schlechteren Lerner ein hohes Ausmaß an Bewegungslosigkeit, ein möglicher Indikator für eine Depression, im Laufe mehrerer aufeinanderfolgender Extinktionsdurchgänge im Wasserlabyrinth entwickelten. Insgesamt zeigte sich der Test der extinktions-induzierten Depression als besonders sensitiv für die Erfassung von altersrelevanten Depressionen, von denen man weiß, dass sie durch den Verlust von Verstärkung, wie dem Verlust von sozialen Kontakten und Krankheit, ausgelöst werden können (Lepine und Bouchez, 1998). In naher Zukunft werden Studien angestrebt, die zum Ziel haben, das Modell der extinktions-induzierten Depression pharmakologisch durch chronische Applikation von Antidepressiva zu validieren. Der These des Modells entsprechend kann erwartet werden, dass Antidepressiva das Ausmaß der extinktions-induzierten Immobilität verringern und den Extinktionsprozess, von welchem man annimmt, dass er das Auftreten einer Depression verursacht, verlangsamen.

5 Literatur

- Akil, H.A. & Morano, M.I. (1995). Stress. In: F.E. Bloom, D.J. Kupfer, editors. *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. New York: Raven Press, pp. 773-785.
- Anisman, H. & Zacharko, R.M. (1992). Depression as a consequence of inadequate neurochemical adaptation in response to stressors. *British Journal of Psychiatry*, *160*, 36-43.
- Aosaki, T., Tsubokawa, H., Ishida, A., Watanabe, K., Graybiel, A.M., & Kimura, M. (1994). Responses of tonically active neurons in the primate's striatum undergo systematic changes during behavioural sensorimotor conditioning. *Journal of Neuroscience*, *14*, 3969-3984.
- Asztely, F., Erdemli, G., & Kullmann, D.M. (1997). Extrasynaptic glutamate spillover in the hippocampus: Dependence on temperature and the role of active glutamate uptake. *Neuron*, *18*, 281-293.
- Aubert, I., Rowe, W., Meaney, M.J., Gauthier, S. & Quirion, R. (1995). Cholinergic markers in aged cognitively impaired Long-Evans rats. *Neuroscience*, *67*, 277-292.
- Bach, M.E., Barad, M., Son, H., Zhuo, M., Lu, Y.-F., Shih, R., Mansuy, I., Hawkins, R.D., & Kandel, E.R. (1999). Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *96*, 5280-5285.
- Barnes, C.A. (1979). Memory deficits associated with senescence: A Neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, *93*, 74-104.
- Barnes, C.A., Nadel, L., & Honig, W.K. (1980). Spatial memory deficit in senescent rats. *Canadian Journal of Psychology*, *34*, 29-39.
- Barnes, C.A. & McNaughton, B.L. (1985). An age comparison of the rates of acquisition and forgetting of spatial information in relation to long-term enhancement of hippocampal synapses. *Behavioral Neuroscience*, *99*, 1040-1048.
- Barros, D.M., Izquierdo, L.A., Sant'Anna, M.K., Quevedo, J., Medina, J.H., McGaugh, J.L., & Izquierdo, I. (1999). Stimulators of the cAMP cascade reverse amnesia

- induced by intra-amygdala but not intrahippocampal KN-62 administration. *Neurobiology of Learning and Memory*, 71, 94-103.
- Bartus, R.T., Dean, R.L. 3rd, Beer, B., & Lippa, A.S. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, 217, 408-414.
- Baxter, M.G. & Gallagher, M. (1996). Neurobiological substrates of behavioral decline: Models and data analytic strategies for individual differences in aging. *Neurobiology of Aging*, 17, 491-495.
- Baxter, M.G., Frick, K.M., Price, D.L., Breckler, S.J., Markowska, A.L., & Gorman, L.K. (1999). Presynaptic markers of cholinergic function in the rat brain: Relationship with age and cognitive status. *Neuroscience*, 89, 771-780.
- Beal., M.F. (1992). Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Annals of Neurology*, 31, 119-130.
- Beckman, K.B. & Ames, B.N. (1998a). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78, 547-581.
- Beckman, K.B. & Ames, B.N. (1998b). Mitochondrial aging: Open questions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854, 118-127.
- Bergado, J.A., Fernandez, C.I., Gomez-Soria, A., & Gonzales, O. (1997). Chronic intraventricular infusion with NGF improves LTP in old cognitively-impaired rats. *Brain Research*, 770, 1-9.
- Berger-Sweeney, J., Heckers, S., Mesulam, M.-M., Wiley, R.G., Lappi, D.A., & Sharma, M. (1994). Differential effects on spatial navigation of immunotoxin-induced cholinergic lesions of the medial septal area and nucleus basalis magnocellularis. *Journal of Neuroscience*, 14, 4507-4519.
- Berlyne, D.E. (1966a). Curiosity and exploration. *Science*, 153, 25-33.
- Berlyne, D.E. (1966b). Conflict and arousal. *Scientific American*, 215, 82-87.
- Berlyne, D.E. (1969). Arousal, reward and learning. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 159, 1059-1070.
- Bermudez-Rattoni, F., Introini-Collison, I.B., & McGaugh, J.L. (1991). Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88, 5379-5382.

- Birren, J.E. & Fisher, L.M. (1995). Aging and speed of behavior: Possible consequences for psychological functioning. *Annual Review of Psychology*, 46, 329-353.
- Bizon, J.L., Helm, K.A., Han, J.-S., Chun, H.-J., Pucilowska, J., Lund, P.K., & Gallagher, M. (2001). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and corticosterone receptor expression in behaviorally characterized adult and aged Long-Evans rats. *European Journal of Neuroscience*, 14, 1739-1751.
- Bliss, T.V.P. & Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361, 31-39.
- Boissiere, F., Faucheux, B., Agid, Y., & Hirsch, E.C. (1997). Choline acetyltransferase mRNA expression in the striatal neurons of patients with Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 225, 169-172.
- Broadbent, N.J., Squire, L.R., & Clark, R.E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 14515-14520.
- Buzsaki, G. (2002). Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, 33, 325-340.
- Cain, D.P. (1998). Testing the NMDA, long-term potentiation, and cholinergic hypotheses of spatial learning. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22, 181-193.
- Cain, D.P., Saucier, D., Hall, J., Hargreaves, E.L., & Boon, F. (1996). Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under APV or CNQX: Contribution of sensorimotor disturbances to drug-induced acquisition deficits. *Behavioral Neuroscience*, 110, 86-102.
- Calabresi, P., Pisani, A., Mercuri, N.B., & Bernardi, G. (1992a). Long-term potentiation in the striatum is unmasked by removing the voltage-dependent magnesium block of NMDA receptor channels. *European Journal of Neuroscience*, 4, 929-935.
- Calabresi, P., Maj, R., Pisani, A., Mercuri, N.B., & Bernardi, G. (1992b). Long-term synaptic depression in the striatum: Physiological and pharmacological characterization. *Journal of Neuroscience*, 12, 4224-4233.
- Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., & Bernardi, G. (1999). Activation of M1-like muscarinic receptors is required for the induction of corticostriatal LTP. *Neuropharmacology*, 38, 323-326.

- Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Pisani, A., & Bernardi, G. (2000). Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends in Neurosciences*, 23, 120-126.
- Campbell, B.A. & Haroutunian, V. (1981). Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. *Journal of Gerontology*, 36, 338-341.
- Centonze, D., Gubellini, P., Pisani, A., Bernardi, G., & Calabresi, P. (2003). Dopamine, acetylcholine and nitric oxide systems interact to induce corticostriatal synaptic plasticity. *Reviews in the Neurosciences*, 14, 207-216.
- Charpier, S. & Deniau, J.M. (1997). In vivo activity-dependent plasticity at corticostriatal connections: Evidence for physiological long-term potentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94, 7036-7040.
- Coleman, P.D. & Flood, D.G. (1987). Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 8, 521-545.
- Coleman, P., Finch, C., & Joseph, J. (2004). The need for multiple time points in aging studies. *Neurobiology of Aging*, 25, 3-4.
- Collier, T.J. & Coleman, P.D. (1991). Divergence of biological and chronological aging: Evidence from rodent studies. *Neurobiology of Aging*, 12, 685-693.
- Colombo, P.J. & Gallagher, M. (1998). Individual differences in spatial memory and striatal ChAT activity among young and aged rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 70, 314-327.
- Costall, B., Jones, B.J., Kelly, M.E., Naylor, R.J., & Tomkins, D.M. (1989). Exploration of mice in a black and white test box: Validation as a model of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 32, 777-785.
- Crawley, J. & Goodwin, F.K. (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 13, 167-170.
- Cruz, L., Roe, D.L., Urbanc, B., Cabral, H., Stanley, H.E., & Rosene, D.L. (2004). Age-related reduction in microcolumnar structure in area 46 of the rhesus monkey correlates with behavioral decline. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101, 15846-15851.
- Da Cunha, C., Angelucci, M.E.M., Canterai, N.S., Wonnacott, S., & Takahashi, R.N. (2002). The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 22, 227-237.

- Dai, H. & Carey, R.J. (1994). The NMDA antagonist MK-801 can impair attention to exteroceptive stimuli. *Behavioural Brain Research*, 62, 149-156.
- Damsma, G. & Westerink, B.H.C. (1991). A microdialysis and automated on-line analysis approach to study central cholinergic transmission in vivo. In: T.E. Robinson and J.B. Justice Jr (eds.). *Microdialysis in the Neurosciences*. Amsterdam: Elsevier, pp 237-252.
- Dawson, V.L., Dawson, T.M., London, E.D., Bredt, D.S., & Snyder, S.H. (1991). Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88, 6368-6371.
- Dawson, V.L. & Dawson, T.M. (2004). Deadly conversations: Nuclear-mitochondrial cross-talk. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 36, 287-294.
- De Kloet, E.R. (1992). Corticosteroids, stress, and aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 21, 357-371.
- Dellu, F., Mayo, W., Vallee, M., Le Moal, M., & Simon, H. (1994). Reactivity to novelty during youth as a predictive factor of cognitive impairment in the elderly: A longitudinal study in rats. *Brain Research*, 653, 51-56.
- De Souza Silva, M.A., Mattern, C., Häcker, R., Nogueira, P.J.C., Huston, J.P., & Schwarting, R.K.W. (1997). Intranasal administration of the dopaminergic agonist l-DOPA, amphetamine and cocaine increases dopamine activity in the neostriatum: A microdialysis study in the rat. *Journal of Neurochemistry*, 68, 233-239.
- De Souza Silva, M.A., Hasenöhrl, R.U., Tomaz, C., Schwarting, R.K.W., & Huston, J.P. (2000). Modulation of frontal cortex acetylcholine by injection of substance P into the ventral pallidum in the freely-moving vs the anesthetized preparation. *Synapse*, 38, 243-253.
- Deupree, D.L., Turner, D.A., & Watters, C.L. (1991). Spatial performance correlates with in vitro potentiation in young and aged Fischer 344 rats. *Brain Research*, 554, 1-9.
- Deupree, D.L., Bradly, J., & Turner, D.A. (1993). Age-related alterations in potentiation in the CA1 region in F344 rats. *Neurobiology of Aging*, 14, 249-258.
- Devan, B.D. & White, N.M. (1999). Parallel information processing in the dorsal striatum: Relation to hippocampal function. *Journal of Neuroscience*, 19, 2789-2798.

- Devan, B.D., Stouffer, E.M., Petri, H.L., McDonald, R.J., & Olds, J.L. (2003). Partial reinforcement across trials impairs escape performance but spares place learning in the water maze. *Behavioural Brain Research*, *141*, 91-104.
- Diana, G., Scotti de Carolis, A., Frank, C., Domenici, M.R., & Sagratella, S. (1994). Selective reduction of hippocampal dentate frequency potentiation in aged rats with impaired place learning. *Brain Research Bulletin*, *35*, 107-111.
- Diana, G., Domenici, M.R., deCarolis, A.S., Loizzo, A., & Sagratella, S. (1995). Reduced hippocampal CA1 Ca²⁺-induced long-term potentiation is associated with age-dependent impairment of spatial learning. *Brain Research*, *686*, 107-110.
- Dollard, J., Doob, L.W., Miller, N.E., Mowrer, O.H., & Sears, R.R. (1939). *Frustration and Aggression*. New Haven: Yale University Press.
- Doyere, V., Gisquet-Verrier, P., de Marsanich, B., & Ammassari-Teule, M. (2000). Age-related modifications of contextual information processing in rats: Role of emotional reactivity, arousal and testing procedure. *Behavioural Brain Research*, *114*, 153-165.
- Dunnett, S.B., Evenden, J.L., & Iversen, S.D. (1988). Delay-dependent short-term memory deficits in aged rats. *Psychopharmacology*, *96*, 174-180.
- Fiorillo, C.D., Tobler, P.N., & Schultz, W. (2003). Discrete coding of reward probability and uncertainty by dopamine neurons. *Science*, *299*, 1898-1902.
- Fischer, W., Gage, F.H., & Björklund, A. (1989). Degenerative changes in forebrain cholinergic nuclei correlate with cognitive impairments in aged rats. *European Journal of Neuroscience*, *1*, 34-45.
- Fischer, W., Nilsson, O.G., & Björklund, A. (1991). *In vivo* acetylcholine release as measured by microdialysis is unaltered in the hippocampus of cognitively impaired aged rats with degenerative changes in the basal forebrain. *Brain Research*, *556*, 44-52.
- Fischer, W., Chen, K.S., Gage, F.H., & Björklund, A. (1992). Progressive decline in spatial learning and integrity of forebrain cholinergic neurons in rats during aging. *Neurobiology of Aging*, *13*, 9-23.
- Forster, M.J., Dubey, A., Dawson, K.M., Stutts, W.A., & Lal, H. (1996). Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *93*, 4765-4769.

- Frick, K.M., Baxter, M.G., Markowska, A.L., Olton, D.S., & Price, D.L. (1995). Age-related spatial reference and working memory deficits assessed in the water maze. *Neurobiology of Aging*, *16*, 149-160.
- Fridovich, I. (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Annals of the New York Academy of Sciences*, *893*, 13-18.
- Frisch, C., Hasenöhrl, R.U., Haas, H.L., Weiler, H.T., Steinbusch, H.W.M., & Huston, J.P. (1998). Facilitation of learning after lesions of the tuberomammillary nucleus region in adult and aged rats. *Experimental Brain Research*, *118*, 447-456.
- Furtado, J.C.S. & Mazurek, M.F. (1996). Behavioral characterization of quinolinate-induced lesions of the medial striatum: Relevance for Huntington's disease. *Experimental Neurology*, *138*, 158-168.
- Gage, F.H., Dunnett, S.B., & Bjorklund, A. (1989). Age-related impairments in spatial memory are independent of those in sensorimotor skills. *Neurobiology of Aging*, *10*, 347-352.
- Gall, C.M., Hess, U.S., & Lynch, G. (1998). Mapping brain networks engaged by, and changed by, learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, *70*, 14-36.
- Gallagher, M. & Burwell, R. (1989). Relationship of age-related decline across several behavioral domains. *Neurobiology of Aging*, *10*, 691-708.
- Gallagher, M., Burwell, R.D., Kodosi, M.H., McKinney, M., Southerland, S., Vella-Rountree, L., & Lewis, M.H. (1990). Markers for biogenic amines in the aged rat brain: Relationship to decline in spatial learning ability. *Neurobiology of Aging*, *11*, 507-514.
- Gallagher, M., Burwell, R., & Burchinal, M. (1993). Severity of spatial learning impairment in aging: Development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behavioral Neuroscience*, *107*, 618-626.
- Gallagher, M. & Colombo, P.J. (1995). Ageing: The cholinergic hypothesis of cognitive decline. *Current Opinion in Neurobiology*, *5*, 161-168.
- Gallagher, M. & Rapp, P.R. (1997). The use of animal models to study the effects of aging on cognition. *Annual Review of Psychology*, *48*, 339-370.
- Gareri, P., De Fazio, P., & De Sarro, G. (2002). Neuropharmacology of depression in aging and age-related diseases. *Aging Research Reviews*, *1*, 113-134.
- Gill, T.M. & Gallagher, M. (1998). Evaluation of muscarinic M2 receptor sites in basal forebrain and brainstem cholinergic systems of behaviorally characterized young and aged Long-Evans rats. *Neurobiology of Aging*, *19*, 217-225.

- Giuliani, A., Ghirardi, O., Caprioli, A., Di Serio, S., Ramacci, M.T., & Angelucci, L. (1994). Multivariate analysis of behavioral aging highlights some unexpected features of complex systems organization. *Behavioral and Neural Biology*, *61*, 110-122.
- Gold, J.I. (2003). Linking reward expectation to behavior in the basal ganglia. *Trends in Neurosciences*, *26*, 12-14.
- Goodman, Y., Bruce, A.J., Cheng, B., & Mattson, M.P. (1996). Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid β -peptide toxicity in hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry*, *66*, 1836-1844.
- Green, R.H., Beatty, W.W., & Schwartzbaum, J.S. (1967). Comparative effects of septo-hippocampal and caudate lesions on avoidance behavior in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *64*, 444-452.
- Grossberg, S. (1975). A neural model of attention, reinforcement and discrimination learning. *International Review in Neurobiology*, *18*, 263-327.
- Härtig, W., Bauer, A., Brauer, K., Grosche, J., Hortobagyi, T., Penke, B., Schliebs, R., & Harkany, T. (2002). Functional recovery of cholinergic basal forebrain neurons under disease conditions: Old problems, new solutions? *Reviews in the Neurosciences*, *13*, 95-165.
- Hammond, R.S., Tull, L.E., & Stackman, R.W. (2004). On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *82*, 26-34.
- Harman, D. (1956). Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, *2*, 298-300.
- Hartley, D.M., Kurth, M.C., Bjerkness, L., Weiss, J.H., & Choi, D.W. (1993). Glutamate receptor-induced 45Ca^{2+} accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. *Journal of Neuroscience*, *13*, 1993-2000.
- Hasenöhrl, R.U., Söderström, S., Mohammed, A.H., Ebendal, T., & Huston, J.P. (1997). Reciprocal changes in expression of mRNA for nerve growth factor and its receptors TrkA and LNGFR in brain of aged rats in relation to maze learning deficits. *Experimental Brain Research*, *114*, 205-213.
- Hauben, U., D'Hooge, R., Soetens, E., & De Deyn, P.P. (1999). Effects of oral administration of the competitive *N*-methyl-D-aspartate antagonist, CGP 40116,

- on passive avoidance, spatial learning, and neuromotor abilities in mice. *Brain Research Bulletin*, 48, 333-341.
- Herman, J.P. & Cullinan, W.E. (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends in Neurosciences*, 20, 78-84.
- Hoh, T.E., Kolb, B., Eppel, A., Vanderwolf, C.H., & Cain, D.P. (2003). Role of the neocortex in the water maze task in the rat: A detailed behavioral and Golgi-Cox analysis. *Behavioural Brain Research*, 138, 81-94.
- Holsboer, F. (1999). Stress und Hormone. *Spektrum der Wissenschaft*, 3, 50-53.
- Houston, F.P., Stevenson, G.D., McNaughton, B.L., & Barnes, C.A. (1999). Effects of age on the generalization and incubation of memory in the F344 rat. *Learning & Memory*, 6, 111-119.
- Huston, J.P. & DeSisto, M.J. (1971). Interspecies aggression during fixed-ratio hypothalamic self-stimulation in rats. *Physiology and Behavior*, 7, 353-357.
- Huston, J.P., Mueller, C.C., & Mondadori, C. (1977). Memory facilitation by posttrial hypothalamic stimulation and other reinforcers: A central theory of reinforcement. *Biobehavioral Reviews*, 1, 143-150.
- Huston, J.P. (1978). Experimentelle Analyse aggressiven Verhaltens. In: R.A. Stamm and H. Zeier (eds.). *Lorenz und die Folgen, Psychologie des 20. Jahrhunderts*, Vol. VI. Zürich: Kindler Verlag, pp 1019-1050.
- Ingram, D.K., London, E.D., Waller, S.B., & Reynolds, M.A. (1983). Age-dependent correlation of motor performance with neurotransmitter synthetic enzyme activities in mice. *Behavioral and Neural Biology*, 39, 284-298.
- Issa, A.M., Rowe, W., Gauthier, S., & Meaney, M.J. (1990). Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *Journal of Neuroscience*, 10, 3247-3254.
- Izquierdo, I., Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Mello e Souza, T., de Souza, M.M., Quevedo, J., Rodrigues, C., Sant'Anna, M.K., Madruga, M., & Medina, J.H. (1998). Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. *Hippocampus*, 9, 421-427.
- Kelley, A.E. & Iversen, S.D. (1979). Substance P infusion into the substantia nigra of the rat: Behavioral analysis and involvement of striatal dopamine. *European Journal of Pharmacology*, 60, 171-179.

- Kelly, J.F. & Hake, D.F. (1970). An extinction-induced increase in an aggressive response with humans. *Journal of Experimental Analysis of Behavior*, 14, 153-164.
- Kiyama, Y., Manabe, T., Sakimura, K., Kawakami, F., Mori, H., & Mishina, M. (1998). Increased thresholds for long-term potentiation and contextual learning in mice lacking the NMDA-type glutamate receptor $\epsilon 1$ subunit. *Journal of Neuroscience*, 18, 6704-6712.
- Kohler, C., Chan-Palay, V., & Wu, J.Y. (1984). Septal neurons containing glutamic acid decarboxylase immunoreactivity project to the hippocampal region in the rat brain. *Anatomy and Embryology*, 169, 41-44.
- Konrad, H.R., Girardi, M., & Helfert, R. (1999). Balance and aging. *Laryngoscope*, 109, 1454-1460.
- Krauth, J. (1980). Nonparametric analysis of response curves. *Journal of Neuroscience Methods*, 2, 239-252.
- Kullmann, D.M., Erdemli, G., & Asztely, F. (1996). LTP of AMPA and NMDA receptor-mediated signals: evidence for presynaptic expression and extrasynaptic glutamate spill-over. *Neuron*, 17, 461-474.
- Law, A., Dore, S., Blackshaw, S., Gauthier, S., & Quirion, R. (2000). Alteration of expression levels of neuronal nitric oxide synthase and haem oxygenase-2 messenger RNA in the hippocampi and cortices of young adult and aged cognitively unimpaired and impaired Long-Evans rats. *Neuroscience*, 100, 769-775.
- Lawrence, A.D., Sahakian, B.J., Hodges, J.R., Rosser, A.E., Lange, K.W., & Robbins, T.W. (1996). Executive and mnemonic functions in early Huntington's disease. *Brain*, 119, 1633-1645.
- Lee, M.G., Chrobak, J.J., Sik, A., Wiley, R.G., & Buzsaki, G. (1994). Hippocampal theta following selective lesion of the septal cholinergic system. *Neuroscience*, 62, 1033-1047.
- Lepine, J.P. & Bouchez, S. (1998). Epidemiology of depression in the elderly. *International Clinical Psychopharmacology*, 13, S7-S12.
- Lindner, M.D. (1997). Reliability, distribution, and validity of age-related cognitive deficits in the Morris water maze. *Neurobiology of Learning and Memory*, 68, 203-220.

- Lindner, M.D. & Schallert, T. (1988). Aging and atropine effects on spatial navigation in the Morris water task. *Behavioral Neuroscience*, *102*, 621-634.
- Lindner, M.D. & Gribkoff, V.K. (1991). Relationship between performance in the Morris water task, visual acuity, and thermoregulatory function in aged F-344 rats. *Behavioural Brain Research*, *45*, 45-55.
- Lindner, M.D., Plone, M.A., Schallert, T., & Emerich, D.F. (1997). Blind rats are not profoundly impaired in the reference memory Morris water maze and cannot be clearly discriminated from rats with cognitive deficits in the cued platform task. *Cognitive Brain Research*, *5*, 329-333.
- Liu, P. & Bilkey, D.K. (1998). Perirhinal cortex contributions to performance in the Morris water maze. *Behavioral Neuroscience*, *112*, 304-315.
- Luebke, J.I., Chang, Y.-M., Moore, T.L., & Rosene, D.L. (2004). Normal aging results in decreased synaptic excitation and increased synaptic inhibition of layer 2/3 pyramidal cells in the monkey prefrontal cortex. *Neuroscience*, *125*, 277-288.
- Lupien, S.J., de Leon, M., de Santi, S., Convit, A., Tarshish, C., Nair, N.P.V., Thakur, M., McEwen, B.S., Hauger, R.L., & Meaney, M.J. (1998). Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nature Neuroscience*, *1*, 69-73.
- Lynch, M.A. (1998). Analysis of the mechanisms underlying the age-related impairment in long-term potentiation in the rat. *Reviews in the Neurosciences*, *9*, 169-201.
- Maes, M. & Meltzer, H.Y. (1995). The serotonin hypothesis of major depression. In: F.E. Bloom and D.J. Kupfer (eds.). *Psychopharmacology. The Fourth Generation of Progress*. New York: Raven, pp 933-944.
- Magnusson, K.R. (1998). The aging of the NMDA receptor complex. *Frontiers in Bioscience*, *3*, 70-80.
- Magnusson, K.R. (2000). Declines in mRNA expression of different subunits may account for differential effects of aging on agonist and antagonist binding to the NMDA receptor. *Journal of Neuroscience*, *20*, 1666-1674.
- Markowska, A.L., Stone, W.S., Ingram, D.K., Reynolds, J., Gold, P.E., Conti, L.H., Pontecorvo, M.J., Wenk, G.L., & Olton, D.S. (1989). Individual differences in aging: Behavioral and neurobiological correlates. *Neurobiology of Aging*, *10*, 31-43.

- Martin, S.J. & Morris, R.G.M. (2002). New life in an old idea: The synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus*, 12, 609-636.
- Martinez, J.L. Jr. & Rigter, H. (1983). Assessment of retention capacities in old rats. *Behavioral and Neural Biology*, 39, 181-191.
- McDonald, R.J. & White, N.M. (1993). A triple dissociation of memory systems: Hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behavioral Neuroscience*, 107, 3-22.
- McDonald, R.J. & White, N.M. (1994). Parallel information processing in the water maze: Evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus. *Behavioral and Neural Biology*, 61, 260-270.
- McDonald, R.J. & White, N.M. (1995). Hippocampal and nonhippocampal contributions to place learning in rats. *Behavioral Neuroscience*, 109, 579-593.
- McEachern, J.C. & Shaw, C.A. (1996). An alternative to the LTP orthodoxy: A plasticity-pathology continuum model. *Brain Research Reviews*, 22, 51-92.
- McEwen, B.S. (2000). The neurobiology of stress: From serendipity to clinical relevance. *Brain Research*, 886, 172-189.
- McLay, R.N., Freeman, S.M., Harlan, R.E., Ide, C.F., Kastin, A.J., & Zadina, J.E. (1997). Aging in the hippocampus: Interrelated actions of neurotrophins and glucocorticoids. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21, 615-629.
- Means, L.W. & Holsten, R.D. (1992). Individual aged rats are impaired on repeated reversal due to loss of different behavioral patterns. *Physiology and Behavior*, 52, 959-963.
- Means, L.W., Alexander, S.R., & O'Neal, M.F. (1992). Those cheating rats: Male and female rats use odor trails in a water-escape 'working memory' task. *Behavioral and Neural Biology*, 58, 144-151.
- Meijer, O.C., Topic, B., Steenbergen, P.J., Jocham, G., Huston, J.P., & Oitzl, M.S. (2005). Correlations between hypothalamus-pituitary-adrenal axis parameters depend on age and learning capacity. *Endocrinology*, 146, 1372-1381.
- Miettinen, R., Sirviö, J., Riekkinen Sr., P., Laakso, M.P., Riekkinen, M., & Riekkinen Jr., P. (1993). Neocortical, hippocampal and septal parvalbumin- and somatostatin-containing neurons in young and aged rats: Correlation with passive avoidance and water maze performance. *Neuroscience*, 53, 367-378.
- Mitchell, J.J. & Anderson, K.J. (1998). Age-related changes in [³H]MK-801 binding in the Fischer 344 rat brain. *Neurobiology of Aging*, 19, 259-265.

- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11, 47-60.
- Morris, R.G.M., Garrud, P., Rawlins, J.N.P., & O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297, 681-683.
- Mumby, D.G., Gaskin, S., Glenn, M.J., Schramek, T.E., & Lehmann, H. (2002). Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: Memory for objects, places, and contexts. *Learning & Memory*, 9, 49-57.
- Murray, E.A. & Wise, S.P. (2004). What, if anything, is the medial temporal lobe, and how can the amygdala be part of it if there is no such thing? *Neurobiology of Learning and Memory*, 82, 178-198.
- Nagahara, A.H., Otto, T., & Gallagher, M. (1995). Entorhinal-perirhinal lesions impair performance of rats on two versions of place learning in the Morris water maze. *Behavioral Neuroscience*, 109, 3-9.
- Nicolle, M.M., Bizon, J.L., & Gallagher, M. (1996). *In vitro* autoradiography of ionotropic glutamate receptors in hippocampus and striatum of aged Long-Evans rats: Relationship to spatial learning. *Neuroscience*, 74, 741-756.
- Norris, C.M., Korol, D.L., & Foster, T.C. (1996). Increased susceptibility to induction of long-term depression and long-term potentiation reversal during aging. *Journal of Neuroscience*, 16, 5382-5392.
- Ogawa, N., Asanuma, M., Kondo, Y., Nishibayashi, S., & Mori, A. (1994). Reduced choline acetyltransferase activity and muscarinic M1 receptor levels in aged Fisher 344 rat brains did not parallel their respective mRNA levels. *Brain Research*, 658, 87-92.
- O'Keefe, J. & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, 34, 171-175.
- Olney, J.W. (1994). Excitatory transmitter neurotoxicity. *Neurobiology of Aging*, 15, 259-260.
- Olney, J.W., Wozniak, D.F., & Farber, N.B. (1997). Excitotoxic neurodegeneration in Alzheimer disease: New Hypothesis and new therapeutic strategies. *Archives of Neurology*, 54, 1234-1240.
- O'Steen, W.K. & Brodish, A. (1985). Neuronal damage in the rat retina after chronic stress. *Brain Research*, 344, 231-239.

- O'Steen, W.K., Sweatt, A.J., Eldridge, J.C., & Brodish, A. (1987). Gender and chronic stress effects on the neural retina of young and mid-aged Fischer-344 rats. *Neurobiology of Aging*, 8, 449-455.
- O'Steen, W.K., Spencer, R.L., Bare, D.J., & McEwen, B.S. (1995). Analysis of severe photoreceptor loss and Morris water-maze performance in aged rats. *Behavioural Brain Research*, 68, 151-158.
- Overmier, J.B. & Seligman, M.E.P. (1967). Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance learning. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, 63, 23-33.
- Packard, M.G. & Teather, L.A. (1997). Double dissociation of hippocampal and dorsal-striatal memory systems by posttraining intracerebral injections of 2-amino-5-phosphonopentanoic acid. *Behavioral Neuroscience*, 111, 543-551.
- Packard, M.G. & Teather, L.A. (1998). Amygdala modulation of multiple memory systems: hippocampus and caudate-putamen. *Neurobiology of Learning and Memory*, 69, 163-203.
- Panakhova, E., Buresova, O., & Bures, J. (1984). The effect of hypothermia on the rat's spatial memory in the water tank task. *Behavioral and Neural Biology*, 42, 191-196.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, CA: Academic Press.
- Perry, E., Walker, M., Grace, J., & Perry, R. (1999). Acetylcholine in mind: A neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends in Neurosciences*, 22, 273-280.
- Pfister, M., Boix, F., Huston, J.P., & Schwarting, R.K.W. (1994). Different effects of scopolamine on extracellular acetylcholine levels in neostriatum and nucleus accumbens measured in vivo: Possible interaction with aversive stimulation. *Journal of Neural Transmissions*, 97, 13-25.
- Popoli, P., Pezzola, A., Domenica, M.R., Sagratella, S., Diana, G., Caporali, M.G., Bronzetti, E., Vega, J., & Scotti de Carolis, A. (1994). Behavioral and electrophysiological correlates of the quinolinic acid rat model of Huntington's disease in rats. *Brain Research Bulletin*, 35, 329-335.
- Porsolt, R.D., LePichon, M., & Jalfre, M. (1977). Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266, 730-732.

- Porter, N.M. & Landfield, P.W. (1998). Stress hormones and brain aging: Adding injury to insult. *Nature Neuroscience*, 1, 3-4.
- Posner, M.I. & Petersen, S.E. (1990). The attention system of the human brain. *Annual Reviews in Neuroscience*, 13, 25-42.
- Potter, P.E., Meek, J.L., & Neff, N.H. (1983). Acetylcholine and choline in neuronal tissue measured by HPLC with electrochemical detection. *Journal of Neurochemistry*, 41, 188-194.
- Pouzet, B., Zhang, W.-N., Feldon, J., & Rawlins, J.N. (2002). Hippocampal lesioned rats are able to learn a spatial position using non-spatial strategies. *Behavioural Brain Research*, 133, 279-291.
- Rada, P., Pothos, E., Mark, G.P., & Hoebel, B.G. (1991). Microdialysis evidence that acetylcholine in the nucleus accumbens is involved in morphine withdrawal and its treatment with clonidine. *Brain Research*, 561, 354-356.
- Rapp, P.R. & Amaral, D.G. (1992). Individual differences in the cognitive and neurobiological consequences of normal aging. *Trends in Neurosciences*, 15, 340-345.
- Rapp, P.R., Rosenberg, R.A., & Gallagher, M. (1987). An evaluation of spatial information processing in aged rats. *Behavioral Neuroscience*, 101, 3-12.
- Rauch, T.M., Welch, D.I., & Gallego, L. (1989). Hypothermia impairs performance in the Morris water maze. *Physiology & Behavior*, 46, 315-320.
- Riekkinen Jr., P., Sirviö, J., & Riekkinen, P. (1990). Interaction between raphe dorsalis and nucleus basalis magnocellularis in spatial learning. *Brain Research*, 527, 342-345.
- Roos, M.R., Rice, C.L., & Vandervoort, A.A. (1997). Age-related changes in motor unit function. *Muscle & Nerve*, 20, 679-690.12
- Rossi, S., Miniussi, C., Pasqualetti, P., Babiloni, C., Rossini, P.M., & Cappa, S.F. (2004). Age-related functional changes of prefrontal cortex in long-term memory: A repetitive transcranial magnetic stimulation study. *Journal of Neuroscience*, 24, 7939-7944.
- Roux, S., Hubert, I., Lenegre, A., Milinkevitch, D., & Porsolt, R.D. (1994). Effects of piracetam on indices of cognitive function in a delayed alternation task in young and aged rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 49, 683-688.
- Rowe, W.B., Steverman, A., Walker, M., Sharma, S., Barden, N., Seckl, J.R., & Meaney, M.J. (1997). Antidepressants restore hypothalamic-pituitary-adrenal

- feedback function in aged, cognitively-impaired rats. *Neurobiology of Aging*, 18, 527-533.
- Rowe, W.B., Spreekmeester, E., Meaney, M.J., Quirion, R., & Rochford, J. (1998). Reactivity to novelty in cognitively-impaired and cognitively-unimpaired aged rats and young rats. *Neuroscience*, 83, 669-680.
- Sagratella, S., Scotti de Carolis, A., Diana, G., Domenici, M.R., & Popoli, P. (1994). Selective reduction of hippocampal dentate frequency-potential in striatally lesioned rats with impaired place learning. *Brain Research*, 660, 66-72.
- Sakimura, K., Kutsuwada, T., Ito, I., Manabe, T., Takayama, C., Kushiya, E., Yagi, T., Aizawa, S., Inoue, Y., Sugiyama, H., & Mishina, M. (1995). Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor $\epsilon 1$ subunit. *Nature*, 373, 151-155.
- Sapolsky, R.M., Krey, L.C., & McEwen, B.S. (1985). Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. *Journal of Neuroscience*, 5, 1222-1227.
- Sarter, M. & Bruno, J.P. (1998). Age-related changes in rodent cortical acetylcholine and cognition: Main effects of age versus age as an intervening variable. *Brain Research Reviews*, 27, 143-156.
- Sarter, M. & Turchi, J. (2002). Age- and dementia-associated impairments in divided attention: Psychological constructs, animal models, and underlying neuronal mechanisms. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 13, 46-58.
- Saucier, D., Hargreaves, E.L., Boon, F., Vanderwolf, C.H., & Cain, D.P. (1996). Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under systemic NMDA or muscarinic antagonism: Nonspatial pretraining eliminates spatial learning deficits. *Behavioral Neuroscience*, 110, 103-116.
- Schmajuk, N.A. (1990). Role of the hippocampus in temporal and spatial navigation: An adaptive neural network. *Behavioral Brain Research*, 39, 205-229.
- Schmajuk, N.A. & DiCarlo, J.J. (1991). A neural network approach to hippocampal function in classical conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 105, 82-110.
- Schultz, W. (1998). Predictive reward signal of dopamine neurons. *Journal of Neurophysiology*, 80, 1-27.
- Schulz, D. & Huston, J.P. (2002). The sliding window correlation procedure for detecting hidden correlations: existence of behavioral subgroups illustrated with aged rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 121, 129-137.

- Schulz, D., Huston, J.P., Jezek, K., Haas, H.L., Roth-Härer, A., Selbach, O., & Luhmann, H.J. (2002). Water maze performance, exploratory activity, inhibitory avoidance and hippocampal plasticity in aged superior and inferior learners. *European Journal of Neuroscience*, *16*, 2175-2185.
- Schulz, D., Sergeeva, O.A., Ianovskii, E., Luhmann, H.J., Haas, H.L., & Huston, J.P. (2004). Behavioural parameters in aged rats are related to LTP and gene expression of ChAT and NMDA-NR2 subunits in the striatum. *European Journal of Neuroscience*, *19*, 1373-1383.
- Schulz, D., Topic, B., de Souza Silva, M.A., & Huston, J.P. (2004). Extinction-induced immobility in the water maze and its neurochemical concomitants in aged and adult rats: A possible model for depression? *Neurobiology of Learning and Memory*, *82*, 128-141.
- Schwartz, R.K. & Carey, R.J. (1988). Differential behavioural effects after subtotal depletions of dopamine or noradrenaline in the ventral striatum. *Functional Neurology*, *3*, 29-36.
- Sergeeva, O.A. & Haas, H.L. (2001). Expression and function of glycine receptors in striatal cholinergic interneurons from rat and mouse. *Neuroscience*, *104*, 1043-1055.
- Sethy, V.M. & Francis, J.W. (1988). Regulation of brain acetylcholine concentration by muscarinic receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*, *246*, 243-248.
- Shankar, S., Teyler, T.J., & Robbins, N. (1998). Aging differentially alters forms of long-term potentiation in rat hippocampal area CA1. *Journal of Neurophysiology*, *79*, 334-341.
- Shors, T.J. & Matzel, L.D. (1997). Long-term potentiation: What's learning got to do with it? *Behavioral Brain Sciences*, *20*, 597-655.
- Simpson, J.R. & Isacson, O. (1993). Mitochondrial impairment reduces the threshold for *in vivo* NMDA-mediated neuronal death in the striatum. *Experimental Neurology*, *121*, 57-64.
- Smith, T.D., Gallagher, M., & Leslie, F.M. (1995). Cholinergic binding sites in rat brain: Analysis by age and cognitive status. *Neurobiology of Aging*, *16*, 161-173.
- Smith, D.E., Rapp, P.R., McKay, H.M., Roberts, J.A., & Tuszynski, M.H. (2004). Memory impairment in aged primates is associated with focal death of cortical

- neurons and atrophy of subcortical neurons. *Journal of Neuroscience*, 24, 4373-4381.
- Stamford, J.A., Muscat, R., O'Connor, J.J., Patel, J., Trout, S.J., Wiczorek, W.J., Kruk, Z.L., & Willner, P. (1991). Voltammetric evidence that subsensitivity to reward following chronic mild stress is associated with increased release of mesolimbic dopamine. *Psychopharmacology*, 105, 275-282.
- Stemmelin, J., Lazarus, C., Cassel, S., Kelche, C., & Cassel, J.-C. (2000). Immunohistochemical and neurochemical correlates of learning deficits in aged rats. *Neuroscience*, 96, 275-289.
- Stephens, D.N., Weidmann, R., Quartermain, D., & Sarter, M. (1985). Reversal learning in senescent rats. *Behavioral Brain Research*, 17, 193-202.
- Sutherland, R.J. & Linggard, R.C. (1982). Being there: A novel demonstration of latent spatial learning in the rat. *Behavioral and Neural Biology*, 36, 103-107.
- Sutherland, R.J. & Dyck, R.H. (1984). Place navigation by rats in a swimming pool. *Canadian Journal of Psychology*, 38, 322-347.
- Sykova, E., Mazel, T., Hasenöhrl, R.U., Harvey, A.R., Simonova, Z., Mulders, W.H.A.M., & Huston, J.P. (2002). Learning deficits in aged rats correlate with decrease in extracellular volume and loss of diffusion anisotropy in hippocampus. *Hippocampus*, 12, 269-279.
- Tang, Y.-P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G.A., Zhuo, M., Liu, G., & Tsien, J.Z. (1999). Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*, 401, 63-69.
- Thomas, P., Goudemand, M., & Rousseaux, M. (1998). Divided attention in major depression. *Psychiatry Research*, 81, 309-322.
- Thorndike, E.L. (1898). Animal intelligence. *Psychological Reviews Monographs Supplement*, 8.
- Tizabi, Y., Overstreet, D.H., Rezvani, A.H., Louis, V.A., Clark, E. Jr., Janowsky, D.S., & Kling, M.A. (1999). Antidepressant effects of nicotine in an animal model of depression. *Psychopharmacology*, 142, 193-199.
- Topic, B., Dere, E., Schulz, D., de Souza Silva, M.A., Jocham, G., Kart, E., & Huston, J.P. (2005). Aged and adult rats compared in acquisition and extinction of escape from the water maze: Focus on individual differences. *Behavioral Neuroscience*, 119, 127-144.

- Torres, E.M., Perry, T.A., Blockland, A., Wilkinson, L.S., Wiley, R.G., Lappi, D.A., & Dunnett, S.B. (1994). Behavioural, histochemical and biochemical consequences of selective immunolesions in discrete regions of the basal forebrain cholinergic system. *Neuroscience*, 63, 95-122.
- Van der Staay, F.J. & De Jonge, M. (1993). Effects of age on water escape behavior and on repeated acquisition in rats. *Behavioral and Neural Biology*, Vol, 33-41.
- Van der Zee, E.A. & Luiten, P.G.M. (1999). Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: A review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Progress in Neurobiology*, 58, 409-471.
- Vasquez, B.J., Martinez, J.L., Jensen, R.A., Messing, R.B., Rigter, H., & McGaugh, J.L. (1983). Learning and memory in young and aged Fischer 344 rats. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 2, 279-291.
- Waelti, P., Dickinson, A., & Schultz, W. (2001). Dopamine responses comply with basic assumptions of formal learning theory. *Nature*, 412, 43-48.
- Wenk, G.L., Danysz, W., & Roice, D.D. (1996). The effects of mitochondrial failure upon cholinergic toxicity in the nucleus basalis. *NeuroReport*, 7, 1453-1456.
- Whishaw, I.Q., Mittleman, G., Bunch, S.T., & Dunnett, S.B. (1987). Impairments in the acquisition, retention and selection of spatial navigation strategies after medial caudate-putamen lesions in rats. *Behavioural Brain Research*, 24, 125-138.
- White, N.M. (1996). Addictive drugs as reinforcers: Multiple partial actions on memory systems. *Addiction*, 91, 921-949.
- Williams, S.B. (1938). Resistance to extinction as a function of the number of reinforcements. *Journal of Experimental Psychology*, 23, 506-522.
- Willig, F., Palacios, A., Monmaur, P., M'Harzi, M., Laurent, J., & Delacour, J. (1987). Short-term memory, exploration and locomotor activity in aged rats. *Neurobiology of Aging*, 8, 393-402.
- Willner, P. (1991). Animal models as simulations of depression. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12, 131-136.
- Willner, P., Muscat, R. & Papp, M. (1992). Chronic mild stress-induced anhedonia: A realistic animal model of depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 16, 525-534.

- Winer, J., Jung, C.K., Shackel, I., & Williams, P.M. (1999). Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Annals of Biochemistry*, 270, 41-49.
- Winocur, G. (1991). Conditional learning in aged rats: Evidence of hippocampal and prefrontal cortex impairment. *Neurobiology of Aging*, 13, 131-135.
- Winocur, G. (1992). A comparison of normal old rats and young adult rats with lesions to the hippocampus or prefrontal cortex on a test of matching-to-sample. *Neuropsychologia*, 30, 769-781.
- Winters, B.D., Forwood, S.E., Cowell, R.A., Saksida, L.M., & Bussey, T.J. (2004). Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: Heterogeneity of function within the temporal lobe. *Journal of Neuroscience*, 24, 5901-5908.
- Woodruff-Pak, D.S. & Trojanowski, J.Q. (1996). The older rabbit as an animal model: Implications for Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*, 17, 283-290.
- Yadid, G., Nakash, R., Deri, I., Tamar, G., Kinor, N., Gispan, I., & Zangen, A. (2000). Elucidation of the neurobiology of depression: insights from a novel genetic animal model. *Progress in Neurobiology*, 62, 353-378.
- Yau, J.L.W., Morris, R.G.M., & Seckl, J.R. (1994). Hippocampal corticosteroid receptor mRNA expression and spatial learning in the aged Wistar rat. *Brain Research*, 657, 59-64.
- Yau, J.L.W., Olsson, T., Morris, R.G.M., Meaney, M.J., & Seckl, J.R. (1995). Glucocorticoids, hippocampal corticosteroid receptor gene expression and antidepressant treatment: Relationship with spatial learning in adult and aged rats. *Neuroscience*, 66, 571-581.
- Zangen, A., Overstreet, D.H., & Yadid, G. (1999). Increased catecholamine levels in specific brain regions of a rat model of depression: normalization by chronic antidepressant treatment. *Brain Research*, 824, 243-250.
- Zangen, A. & Shalev, U. (2003). Nucleus accumbens β -endorphin levels are not elevated by brain stimulation reward but do increase with extinction. *European Journal of Neuroscience*, 17, 1067-1072.

Zhang, C., Steiner, J.P., Hamilton, G.S., Hicks, T.P., & Poulter, M.O. (2001). Regeneration of dopaminergic function in 6-hydroxydopamine-lesioned rats by neuroimmunophilin ligand treatment. *Journal of Neuroscience*, 21, RC156.