

**„Untersuchungen zur Rolle des hippocampalen  
Estrogen Rezeptors  $\alpha$   
bei räumlichen Lernvorgängen und Gedächtnisbildung  
in männlichen Wistar Ratten“**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom Biologin Katrin Meyer

geb. am 16.02.1984 in Magdeburg

Gutachter: PD. Dr. Volker Korz

Prof. Dr. Volker Stefanski

eingereicht am: 26.08.2013

verteidigt am: 13.12.2013

## Erklärung zur Dissertation

Katrin Meyer  
Wostokstraße 12  
39118 Magdeburg

**Ehrenwörtliche Erklärung zu meiner Dissertation mit dem Titel:**  
**„Untersuchungen zur Rolle des hippocampalen Estrogen Rezeptors  $\alpha$**   
**bei räumlichen Lernvorgängen und Gedächtnisbildung**  
**in männlichen Wistar Ratten“**

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Magdeburg, 26.08.2013

Ort, Datum

\_\_\_\_\_

Unterschrift

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	5
<b>Einleitung</b> .....	7
<b>Material und Methoden</b> .....	24
Versuchstiere .....	24
Implantation der i.c.v. Kanüle .....	25
Pharmakologie .....	26
Verhaltensversuche .....	28
Holeboard.....	28
Holeboard – räumliches Lernen .....	28
Holeboard – Versuchsverlauf.....	30
Open-Field-Test.....	31
Open-Field-Test – Quantifizierung des Erkundungsverhaltens .....	31
Open-Field-Test – Versuchsverlauf .....	33
Plus-Maze-Test.....	34
Plus-Maze-Test – Quantifizierung des Angstverhaltens .....	34
Plus-Maze-Test – Versuchsablauf .....	35
Gewebeentnahme und Hormonkonzentrationsbestimmung .....	35
Bestimmung der relativen Genexpression.....	36
Bestimmung der cytosolischen und membrangebundenen Proteinkonzentrationen .....	37
Statistische Auswertung.....	40
<b>Ergebnisse</b> .....	42
Einfluss des räumlichen Lernens auf die Expression verschiedener Gene und Steroidhormonkonzentrationen in männlichen Wistar Ratten verschiedener Entwicklungsstufen .....	42
Verhalten.....	42
Hormone .....	45
Genexpression.....	48
Korrelation: Verhaltensparameter – Genexpression und Hormonkonzentration.....	50
Gewichte .....	52

Unterschiede in der Genexpression in Abhängigkeit vom Lernverhalten .....	53
Verhalten.....	54
Genexpression.....	56
Gewichte .....	57
Einfluss des ER $\alpha$ -Antagonisten MPP auf das räumliche Lernen, die Expression verschiedener Gene und Steroidhormonkonzentrationen in 8 Wochen alten, männlichen Wistar Ratten .....	58
Verhalten.....	58
Hormone .....	61
Genexpression.....	63
Gewichte .....	65
Einfluss des ER $\alpha$ -Antagonisten MPP auf die lokomotorische Aktivität, sowie das Explorations- und Angstverhalten in 8 Wochen alten, männlichen Wistar Ratten .....	66
Rezeptorkomplexe .....	67
Verhalten.....	68
Gewichte .....	70
Western Blot Analysen.....	71
<b>Diskussion</b> .....	75
<b>Zusammenfassung</b> .....	97
<b>Summary</b> .....	100
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	102
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	123
<b>Danksagung</b> .....	126
<b>Curriculum vitae</b> .....	127

## Abkürzungsverzeichnis

5-HT	Serotonin
ACTH	adrenokortikotropes Hormon
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizitsyndrom
AGF	Arbeitsgedächtnisfehler
AMPA	Aminomethylphosphonsäure
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
AR	Androgenrezeptor
ARE	Androgen-Bindemotiv
BDNF	neurotropher Wachstumsfaktor (brain-derived neurotrophic factor)
CA1	Cornus Ammonis 1
CA2	Cornus Ammonis 2
CA3	Cornus Ammonis 3
CREB	CRE-Bindeprotein (cAMP-responsives Element)
CRH	Corticotropin-releasing Hormon
Cyp19	Genname des Aromataseproteins (cytochromes P450, Family 19)
DA	Dopamin
DG	Gyrus dentatus
DHT	Dihydrotestosteron
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERE	Östrogen-Bindemotiv
ER $\alpha$	Östrogenrezeptor alpha
ER $\beta$	Östrogenrezeptor beta
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure

GLM	allgemeines (generalised) lineares Modell
GR	Glukokortikoidrezeptor
HC	Hippokampus
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HPG-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse
i.c.v.	intracerebroventrikulär
kDa	kiloDalton
KZG	Kurzzeitgedächtnis
LH	luteinisierendes Hormon
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
LZG	Langzeitgedächtnis
MAP-Kinase	mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MPP	Methyl-piperidino-pyrazole-hydrate
MR	Mineralokortikoidrezeptor
mRNA	Boten-RNA / messenger RNA
NA	Noradrenalin
NFκB	spezifischer Transkriptionsfaktor (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PFC	Präfrontaler Cortex
RGF	Referenzgedächtnisfehler
Sp1	spezifischer Transkriptionsfaktor (specificity protein 1)
TPBM	Theophylline 8-[(benzylthio)methyl]
TrkA	BDNF-Rezeptor (receptor tyrosine kinase typ A)
TrkB	BDNF-Rezeptor (receptor tyrosine kinase typ B)
UpM	Umdrehungen pro Minute
VTA	ventrale tegmentale Region

## Einleitung

Der ontogenetische Reifeprozess in Säugetieren wird durch immense Veränderungen im endokrinen System begleitet. Er umfasst nicht nur die Geschlechtsreifung im eigentlichen Sinne, auch zahllose hormonelle und neuronale Veränderungen im Gehirn gehen mit ihm einher. Einen einheitlich definierten Zeitraum, bzw. eine klare Abgrenzung der einzelnen Entwicklungsstufen, gibt es jedoch bisher nicht. Die Mehrheit der Studien, welche sich mit den Veränderungen während der Pubertät beschäftigen (Sisk and Zehr, 2005), definiert den Abschluss der Adoleszenz als Zeitpunkt, an dem die sexuelle Reifung abgeschlossen ist. So variieren die Angaben über den Beginn des Erwachsenenalters für Ratten zwischen rund 60 bis 80 Tagen nach Geburt (Choi et al., 1992; Andersen et al., 2003; Jankord et al., 2011). Es ist hingegen weniger umstritten, dass die Phase der Adoleszenz mit einem verminderten Risikobewusstsein, einer erhöhten Empfänglichkeit für Drogenmissbrauch und einer generell gesteigerten Neugier einhergeht (Spear, 2000; Kelley et al., 2004). Diese Beobachtungen lassen sich mit der Periode des Verlassens der sozialen Einheit und des Lösens aus dem schützenden Familienbund gut in Einklang bringen und sind im Speziellen für die gängigen Tiermodelle, wie Ratte und Maus, für verschiedene Hirnregionen und Neurotransmitter-Systeme näher beleuchtet worden (Spears and Brake, 1983; Hefner und Holmes, 2007, Shen et al., 2010; McCallum et al., 2010). Dennoch sollte erwähnt werden, dass diese Phase des Umbruchs zwischen Kindheit und Erwachsensein ein eher gering erforschtes Feld umschließt. Die Rolle der Sexualhormone ist in diesem Zusammenhang ebenfalls oftmals Gegenstand der Forschung. So ist das Steroidhormon Östrogen und dessen Einfluss auf das Gedächtnis, das Lernen, sowie dessen Funktion als Sexualhormon bereits in vielen Studien untersucht worden. Da es sich hierbei um das wichtigste weibliche Sexualhormon handelt, wurde bisher das Hauptaugenmerk der Untersuchungen auf Frauen und weibliche Tiermodelle gelegt. Es ist dennoch mittlerweile bekannt, dass „geschlechtsspezifische“ Hormone auch im entgegengesetzten Geschlecht weitreichende Auswirkungen haben

(Gagnidze and Pfaff, 2009; Wu et al., 2009). So finden sich einige Studien, die sich mit den schnellen und nichtgenomischen Effekten in männlichen Tieren verschiedenster Spezies befassen (Hamster: Hayden-Hixon and Ferris, 1991; Ratte: Cross and Roselli, 1999; Maus: Trainor et al., 2007, 2008; Goldfisch: Lord et al. 2009). Die geringe Anzahl dieser Untersuchungen zu verschiedenen östrogenabhängigen Verhaltensänderungen in männlichen Tieren, sowie die teilweise unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich zu weiblichen Tieren, könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Östrogenspiegel in letzteren weit höher ist und außerdem hohen Schwankungen unterliegt (Cornil and Charlier, 2010). Daher scheint es auch nicht überraschend, dass Effekte zum Einfluss dieser Sexualhormone zum größten Teil in Tieren untersucht werden, denen die Keimdrüsen entfernt wurden. Dies wiederum hat den Nachteil, dass zwar durch das exogene Zuführen der Hormone direkte Effekte zu beobachten sind, diese aber jedoch mit hoher Sorgfalt interpretiert werden sollten. Es kann in diesem Falle davon ausgegangen werden, dass das gesamte Gleichgewicht vieler voneinander abhängiger Faktoren beeinflusst wurde (Anton-Tay et al., 1968; Renner et al., 1985). Östrogen ist zum Beispiel eng mit dem neurotrophen Wachstumsfaktor BDNF (brain-derived neurotrophic factor) verknüpft, beide sind bekannt für ihre Funktion zum Schutz und Erhalt, aber auch zur Regeneration nach einer Schädigung von neuronalen Zellen, sowie zur Regulation von Transmittersystemen (Arimatsu et al., 1986; Lindsay et al., 1988; Chowen et al., 1992; Singer et al., 1996). Die Colokalisation von Östrogenrezeptoren und BDNF-Rezeptoren (TrkA und TrkB) konnte erstmals in Neuronen des basalen Vorderhirn, dem Cerebral-Cortex und dem Hippokampus von Ratten und Mäusen beider Geschlechter nachgewiesen werden (Miranda et al., 1993), was zelluläre Interaktionen in Abhängigkeit von den Liganden zulässt. Hinweise auf Interaktionen auf der hormonellen Ebene, auch in anderen Hirngebieten, ergaben sich aus Studien in ovariectomierten Tieren nach exogener Gabe von Östradiol; diese zeigten eine erhöhte BDNF Expression im Hippokampus (Gibbs, 1999; Allen and McCaig, 2005; Zhou et al., 2005), im Cortex (Sohrabji et

al., 1995, Allen and McCarson, 2005) und in der Amygdala (Liu et al., 2001; Zhou et al., 2005).

Auch in die Regulation der Stressantwort (Abbildung 1) ist Östradiol involviert. Stört ein exogener Stressor, oder eine interne Veränderung, die Homöostase des Organismus, so wird im Hypothalamus das Corticotropin-releasing Hormon (CRH) vom paraventricularen Nukleus gebildet. Dieses wirkt auf die Hypophyse und veranlasst dort die Ausschüttung des adrenokortikotropen Hormons (ACTH), das wiederum auf die Nebennierenrinde wirkt und diese zur Freisetzung von Kortikosteron anregt. Das Stresshormon wirkt dabei auf den Energiehaushalt des Organismus, das Herz-Kreislauf-System, unterdrückt verschiedene Funktionen des Immunsystems und wirkt mittels Feedback-Reaktion hemmend auf die sekretorischen Zellen des Hypothalamus und der Hypophyse (Whitnall, 1993). Diese negative Rückkopplung auf die Aktivität der HPA-Achse ist ein wichtiger Kontrollmechanismus für die Regulation der Stressantwort (Keller-Wood and Dallmann, 1984). Ein Zusammenhang zwischen Sexualhormonen und der Regulation der Stressreaktion ist seit einiger Zeit ebenfalls ein Thema der Forschung. So haben bereits Lesniewska et al. 1990 eine erhöhte Reaktion der HPA-Achse in weiblichen Tieren im Vergleich zu männlichen Tieren gefunden; sowie einen stimulierenden Einfluss von Östrogenen, bzw. einen hemmenden Einfluss von Androgenen. Auch ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Konzentration von ACTH und Kortikosteron als Reaktion auf einen Stressor wurde nachgewiesen (Gaskin et al., 1970; Handa et al., 1994). Eine erhöhte Ausschüttung dieser beiden Hormone in weiblichen Tieren könnte sowohl an einer stärkeren Resonanz auf Stress, als auch auf eine geringere Rückkopplungsreaktion zurückzuführen sein (Burgess and Handa, 1992).

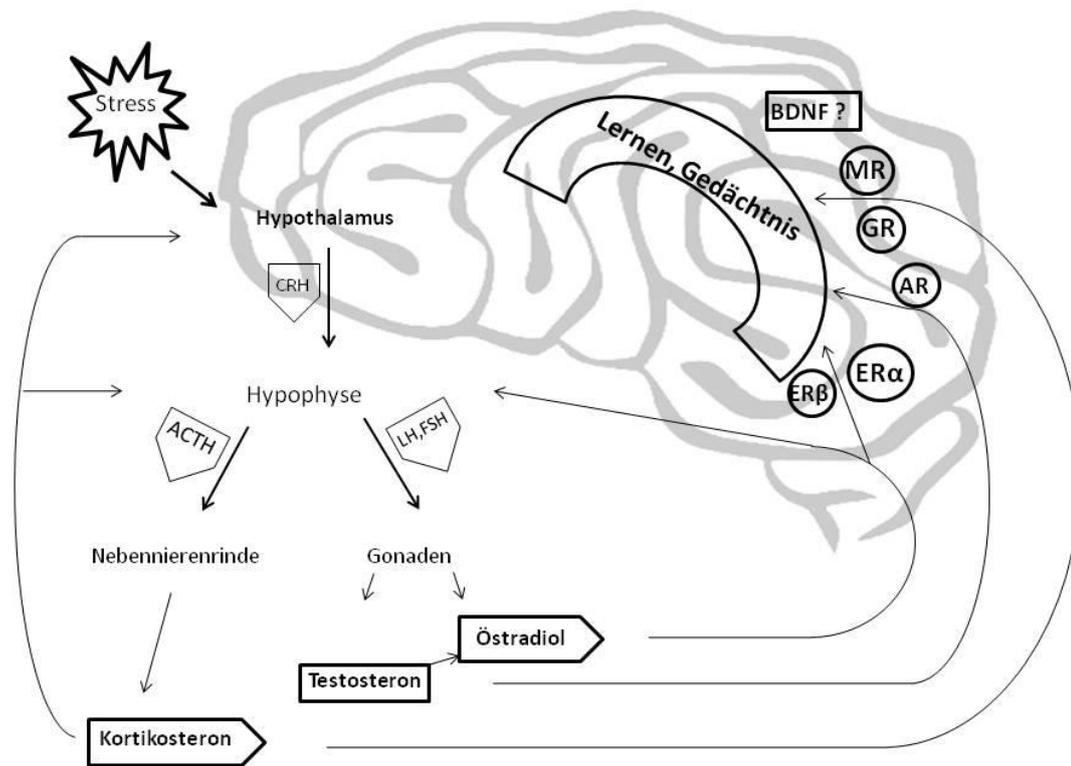


Abbildung 1 HPA-Achse (links): Wirkt ein Stressor auf den Organismus, führt dies zur Ausschüttung von CRH durch den Hypothalamus. CRH initiiert die Ausschüttung von ACTH in der Hypophyse, welches die Nebennierenrinde zur Freisetzung von Kortikosteron anregt. Kortikosteron reguliert über eine Feedback-Hemmung die weitere Sekretion von CRH im Hypothalamus, sowie ACTH in der Hypophyse und setzt die Stressantwort durch den Metabolismus in Gang.

HPG-Achse (mittig): CRH regt die Hypophyse ebenfalls zur Bildung von LH und FSH an, welches die Sekretion von Östradiol bzw. Testosteron durch die Gonaden anregt. Östradiol wiederum aktiviert über eine positive Feedback-Reaktion die CRH-Ausschüttung und reguliert ebenfalls sympatho-adrenale Signalwege der Hypophyse.

Einfluss auf kognitive Funktionen (rechts): Sowohl Kortikosteron, BDNF, als auch die gonadalen Steroide, wirken mittels spezifischer Rezeptoren auf die synaptische Plastizität und beeinflussen die kognitive Verarbeitung eingehender Informationen.

Zusammenfassend ist zu erwähnen, dass der Zusammenhang zwischen Stress und der Aktivierung der HPA-Achse derart klar und vorhersehbar ist, dass im Laufe der Zeit der Begriff „Stress“ und dessen Quantifizierung, mit der Erhöhung der ACTH- und Kortikosteron-Konzentrationen im Blutplasma (als messbarer Wert für den

Grad an Stress) gleichgesetzt wurde. Die Differenzierung zwischen förderlichem und schädigendem Stress blieb dabei meist unberücksichtigt (Whitnall, 1992). So ist der Begriff „Stress“ nicht immer gleichzusetzen mit einem negativen Einfluss auf den Organismus. Im Falle der Konfrontation eines Individuums mit einer herausfordernden Situation, von mäßiger Dauer, die durch das Individuum beherrschbar bleibt, konnten sowohl positive Effekte auf das Lernen, als auch der Gedächtnisleistung aufgezeigt werden. Da das Gehirn, neben peripheren Organen, die im Wesentlichen den Energiehaushalt regulieren, ein Zielgebiet darstellt in dem „Stress“ verarbeitet wird, bzw. in dem die Stresshormone wirken, ist es nicht überraschend, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Lernleistung und der stressrelevanten Verarbeitung von äußeren und inneren Einflüssen hergestellt werden kann. Die gehirnsystemischen und zellulären Mechanismen sind allerdings noch wenig verstanden. Die Rolle von Kortikosteron, besonders unter dem Aspekt kritischer Zeitfenster in denen eine Hemmung oder Förderung von Gedächtnis stattfindet, ist dabei noch am besten untersucht (Roozendaal, 1999; McGaugh and Roozendaal, 2002). Der präfrontale Cortex, die Amygdala, sowie der Hippokampus sind hier die wesentlichen involvierten Gehirnregionen (Jacobson and Sapolsky, 1991; McGaugh and Roozendaal, 2002). Kortikosteron kann von zwei verschiedenen Rezeptoren gebunden werden, zum Einen von dem Glukokortikoid-Rezeptor (GR), und zum Anderen vom Mineralokortikoid-Rezeptor (MR); beide Rezeptoren sind in allen Regionen des Hippokampus und des Gyrus dentatus in der Ratte nachzuweisen.

Die Verbindung des enthorinalen Cortex über den Tractus perforans mit dem Gyrus dentatus, stellt die Eingangsstruktur der trisynaptischen Schleife (Gyrus dentatus - CA3 - CA1), über die hauptsächlich sensorische Informationen eingehen, dar. Versuche zur synaptischen Plastizität (Alger and Teyler, 1976; Leutgeb et al., 2004) und räumlichem Lernen (Tsien et al., 1996; Leutgeb et al., 2005) legen es nahe, dass in diesen Teilregionen die Information unterschiedlich verarbeitet und dann von der CA1 zurück an den enthorinalen Cortex gesendet wird (Fyhn et al., 2004). Die Funktion des Hippokampus als Schaltzentrale für Gedächtnisbildung,

Transformation von Kurzzeit- in Langzeitgedächtnis, räumliches, episodisches und kontextabhängiges Lernen und andere Prozesse, beruht unter anderem auf der Fähigkeit synaptische Verbindungen neu zu bilden, zu festigen, oder auch aufzulösen. Diese synaptische Plastizität umfasst die Veränderung der Anzahl und Form der Synapsen, aber auch ihre langfristige „Übertragungsfähigkeit“; die Langzeitpotenzierung (LTP) und die Langzeitdepression (LTD) (Bear and Malenka, 1994; Bear und Abraham, 1996). Beide Mechanismen, die langfristig erhöhte (LTP) als auch die langfristig erniedrigte (LTD) Transmission, spielen bei der hippokampusabhängigen Speicherung von Informationen in das Langzeitgedächtnis eine Rolle (Kandel, 2001; Malleret et al., 2001; Martin and Morris, 2002; Kemp and Managhan-Vaughan, 2004), wobei diese regionsspezifisch unterschiedlich ist. Es ist nicht auszuschließen, dass beide Formen der Plastizität an einer Synapse wirksam werden können, einerseits zur Speicherung unterschiedlicher Informationen und evtl. als Schutz gegen die gegenseitige Störung, bzw. Überlagerung von Gedächtnisspuren (Nicholls et al., 2008). Das dopaminerge System spielt bei der synaptischen Plastizität der CA1-Region des Hippokampus und beim Neuerwerb von Wissen eine wichtige Rolle. Das Zentrum Dopamin-produzierender Neurone liegt in der ventralen tegmentalen Region (VTA). Die VTA und der Hippokampus bilden zusammen eine sogenannte Funktionsschleife zur Erkennung neuer, relevanter Informationen und speichern diese dann ins Langzeitgedächtnis (Lisman and Grace, 2005). Innervationen vom Locus coeruleus, dem wichtigsten Zentrum noradrenerger Aktivität, zum Hippokampus und Gyrus dentatus werden, als in die Regulation von Aufmerksamkeitszuständen und deren Fokussierung involviert, angesehen (Friedman and Goldman-Rakic, 1988; Sara, 2009). Die Unterscheidung von Langzeit- (LZG) und Kurzzeitgedächtnis (KZG), oder auch Referenz- und Arbeitsgedächtnis, besteht nicht nur in der Dauer der Speicherung der Information, frühere Untersuchungen zeigten z.B. Unterschiede in den Kodierungssystemen der beiden Formen (KZG – akustische Kodierung, LZG – semantische Kodierung; Baddeley, 1966a, 1966b).

Da die Induktion einer LTP synaptischer Zellen weitgehend mit der Induktion einer Langzeitspeicherung neuer Informationen gleichgesetzt wird, ist dies eine experimentell gut entwickelte und vielfach angewandte Methode, um dieses Phänomen genauer zu beleuchten. So ist heute bekannt, dass sich die LTP in eine kurzfristige (weniger als 3 Stunden), Proteinsynthese-unabhängige, und eine langfristige (mehr als 8 Stunden), Proteinsynthese-abhängige Form unterteilen lässt (Krug et al., 1984; Bliss and Collingridge, 1993; Kandel, 2001; Malenka and Bear, 2004). Durch das Modell der späten assoziativen LTP konnte ebenfalls gezeigt werden, dass nicht nur ein starker, künstlicher Stimulus (starker Tetanus) in einem synaptischen Eingang die langfristige Erhöhung (> 6h) der synaptischen Potenzierung herbeiführen kann, auch die Verknüpfung zweier unabhängiger Eingänge, von denen einer mit einem starken und der andere mit einem schwachen, künstlichen Stimulus (schwacher Tetanus, der eine frühe LTP < 6h induziert) zu einer späten LTP in beiden Eingängen führt. Ein vergleichbarer Effekt tritt auf, wenn eine frühe LTP elektrisch induziert wird und das Tier mit einer kognitiven oder emotionalen Herausforderung (Korz et al., 2003) innerhalb eines engen Zeitrahmens, um den Zeitpunkt der Tetanisierung herum, konfrontiert wird und die Verhaltensstimulation spezifische Anforderungen erfüllt (Straube et al., 2003, Korz et al., 2004). So konnte z.B. für ein Paradigma zum räumlichen Lernen, das Holeboard, gezeigt werden, dass erst ab einer bestimmten Anzahl von Trainingsdurchgängen (etwa 8) diese Verstärkung der LTP hervorgerufen wird. Ein schwächeres wie auch ein Übertraining der Tiere führt dagegen zu keiner LTP-Verstärkung. Die o.g. Anzahl an Trainingsdurchgängen ist ebenfalls nötig, um das räumliche Referenzgedächtnis (entspricht dem LZG) initial, also noch hippokampusabhängig, auszuprägen (Korz et al., 2005). Außerdem konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass diese Verstärkung nur in Verbindung mit einer Neubildung des Referenzgedächtnisses induziert werden kann, nicht aber in Tieren, die bereits trainiert sind und somit ein Referenzgedächtnis für die entsprechende Aufgabe aufweisen; und die Information bereits wesentlich im Cortex abgelegt ist. Da, sowohl die Ausbildung des Referenzgedächtnisses, als auch die Verstärkung der

LTP, von der Synthese neuer Proteine abhängig sind, lässt sich schlussfolgern, dass es sich hierbei möglicherweise um die selben Proteine handelt, oder zumindest ein Proteinpool vorliegt, aus denen die Synapsen ihre spezifisch benötigten Proteine beziehen (Korz et al., 2005). Allerdings konnten weder der Mechanismus der synaptischen Zielfindung noch die Plastizitäts-relevanten Proteine bisher genauer bestimmt werden. Die früheren Untersuchungen legen jedenfalls nahe, dass Steroidrezeptoren direkt und/oder durch die Regulation der Transkription ihrer Zielgene in diese Prozesse involviert sind. Um nun einen genaueren Einblick in die hormonelle und genetische Alternation zu erlangen, die beim Hippokampus-abhängigen räumlichen Lernen stattfindet, wurde in den folgenden Studien das selbe Holeboard-Trainingsparadigma, wie in den früheren Studien, verwendet. Das Holeboardtraining geht auf Boissier und Simon (1962) zurück. Es besteht aus einer offenen Arena, in der sich in regelmäßigen Abständen Vertiefungen befinden, in denen Futter versteckt werden kann. Ein Vorteil dieser Lernaufgabe liegt darin, dass neben der allgemeinen, ursprünglichen Messung von explorativem Verhalten, eine parallele Auswertung des Arbeits- und Referenzgedächtnisses möglich ist. Das Arbeitsgedächtnis repräsentiert das Kurzzeitgedächtnis (KZG), während das Referenzgedächtnis das räumliche Langzeitgedächtnis (LZG) repräsentiert. Es handelt sich hierbei um eine Form des räumlichen Lernens durch Belohnung, in dem das Tier innerhalb des Lernversuches die Aufgabe hat, Futter zu finden. Das Tier erlernt über eine bestimmte Anzahl von Versuchsdurchgängen (im vorliegenden Versuch 10 Durchgänge verteilt über 3 Tage) ein festes Muster an beköderten Löchern. Dadurch ist es möglich, eine differenzierte Aussage über das KZG (Lernerfolg innerhalb eines Durchgangs) und das LZG (Lernerfolg über den gesamten Versuchsverlauf) zu treffen. Ein Lernerfolg wird in diesem Paradigma über die Verringerung der Anzahl der Fehler gemessen. Die Anzahl der Arbeitsgedächtnisfehler (AGF) lässt demnach Rückschlüsse auf das KZG zu, die Anzahl der Referenzgedächtnisfehler (RGF) dagegen auf das LZG. Neben diesen Vorzügen ist es notwendig, zur Steigerung der Motivation, sowie zur Lösung der Aufgabe, dem Tier vor Beginn der Lernaufgabe Futter zu entziehen. Dies kann

zusätzlichen Einfluss auf die Regulation verschiedenster Mechanismen haben. So ist bereits bekannt, dass die Futterdeprivation an sich, bereits einen Stressor darstellt und die HPA-Achse aktivieren und somit auch die erhöhte Ausschüttung von Kortikosteron und ACTH bedingen kann (Yoshihara et al., 1996; Heiderstadt et al., 2000; Faza'a et al., 2000; Chang et al., 2002). Genn et al. (2003) konnten jedoch widerlegen, dass der Entzug von Futter angststeigernd wirkt und weder Defizite im ‚elevated Plus-Maze‘, noch im ‚social interaction Test‘ nachweisen. Im Gegenteil, die männlichen Versuchstiere zeigten eine erhöhte lokomotorische Aktivität und ein gesteigertes Erkundungsverhalten für die unsichereren, offenen Arme des Mazes. Dies ließ sie zu der Schlussfolgerung kommen, dass die Motivation, nach Futter zu suchen, stärker ist, als der Angstreflex. Die weiblichen Versuchstiere hingegen zeigten eine weniger starke Reaktion, wobei wiederum die adoleszenten Weibchen zwar ein höheres Angstverhalten als die Männchen zeigten, dies in adulten Weibchen jedoch noch stärker ausgeprägt war. So nehmen Genn et al. (2003) an, dass auch in diesem Zusammenhang gonadale Hormone eine Rolle spielen, genauer, dass die weiblichen Sexualhormone die von männlichen Tieren gezeigten Verhaltensweisen unterdrücken. Die Funktion und Verteilung eben jener gonadalen Steroide im Gehirn scheint ubiquitär zu sein. So ist, neben direkten Effekten bei Weibchen, bereits auch bekannt, dass das männliche Sexualhormon Testosteron mittels des Enzyms Aromatase in Estradiol umgewandelt werden kann (Ryan et al., 1972; Roselli et al., 1985; Garcia-Segura, 2003, 2008). Diese Umsetzung scheint sowohl für die Regulation des Testosteron-, als auch Östradiolgehaltes im Gehirn, für die geschlechtsspezifische Differenzierung verschiedener Gehirnregionen und auch für das Sexualverhalten eine wesentliche Rolle zu spielen (MacLusky and Naftolin, 1981; Hutchison, 1991; Ball and Balthazart, 2004; Fusani and Gahr, 2006). Auch eine Beteiligung von Aromatase an kognitiven Prozessen konnte nachgewiesen werden. So fand man, dass der Beeinträchtigung räumlichen Lernens, hervorgerufen durch die Gabe von Testosteron, mittels Inhibierung der Aromatase-Aktivität entgegengewirkt werden kann (Moradpour et al., 2006). Eine generelle Verbesserung des Arbeitsgedächtnisses durch die systemische Verabreichung von

Aromatase-Inhibitoren konnte ebenfalls gezeigt werden (Alejandre-Gomez et al., 2007). So scheint, zumindest in männlichen Tieren, eine Vielzahl von Östrogen-vermittelten Mechanismen durch die Inhibierung der Aromatase beeinflusst zu werden (Kretz et al., 2004; Prange-Kiel and Rune, 2006; von Schassen, 2006), was darauf schließen lässt, dass hier das cerebrale Östrogen weitgehend aus der Aromatisierung von Testosteron hervorgeht. Garcia-Segura (2008) vermutet eine geschlechterspezifische Rolle der Aromatase für die synaptische Plastizität und ebenso einen spezifischen Bezug zu kognitiv relevanten Gehirnarealen. Die Aromataseexpression im Säugerhirn konnte bereits für Areale wie den cerebralen Cortex, die Amygdala, den Hippokampus, das Septum u.a. nachgewiesen werden (Foidart et al., 1995; Roselli and Resko 1997, 2001; Wagner et al., 1997). Für eine Verknüpfung zwischen Aromatasefunktion und der Modulation von Neuronen ist beschrieben, dass das Enzym in der Prä-Synapse vorliegt und dass das neu synthetisierte Östrogen entweder an postsynaptische Östrogen-Rezeptoren bindet (Towart et al., 2003; Milner et al., 2005), oder direkt in der Prä-Synapse durch die Bindung an Östrogen-Rezeptoren auf die Ausschüttung von Neurotransmittern wirkt (Hart et al., 2007; Woolley, 2007).

Doch all diese Steroidhormone (Kortikosteron, Estradiol, Testosteron; Abbildung 2) benötigen spezifische Rezeptoren, um ihre vielzähligen Funktionen auszuüben. Kortikosteron bindet, wie oben erwähnt, an zwei verschiedene Rezeptoren, den Glukokortikoid- und den Mineralokortikoid-Rezeptor (GR, MR). Estradiol stehen ebenfalls mindestens zwei verschiedene Rezeptoren zur Verfügung, die Östrogen-Rezeptoren Alpha und Beta ( $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ ). Das Steroidhormon Testosteron interagiert über den Androgen-Rezeptor (AR).

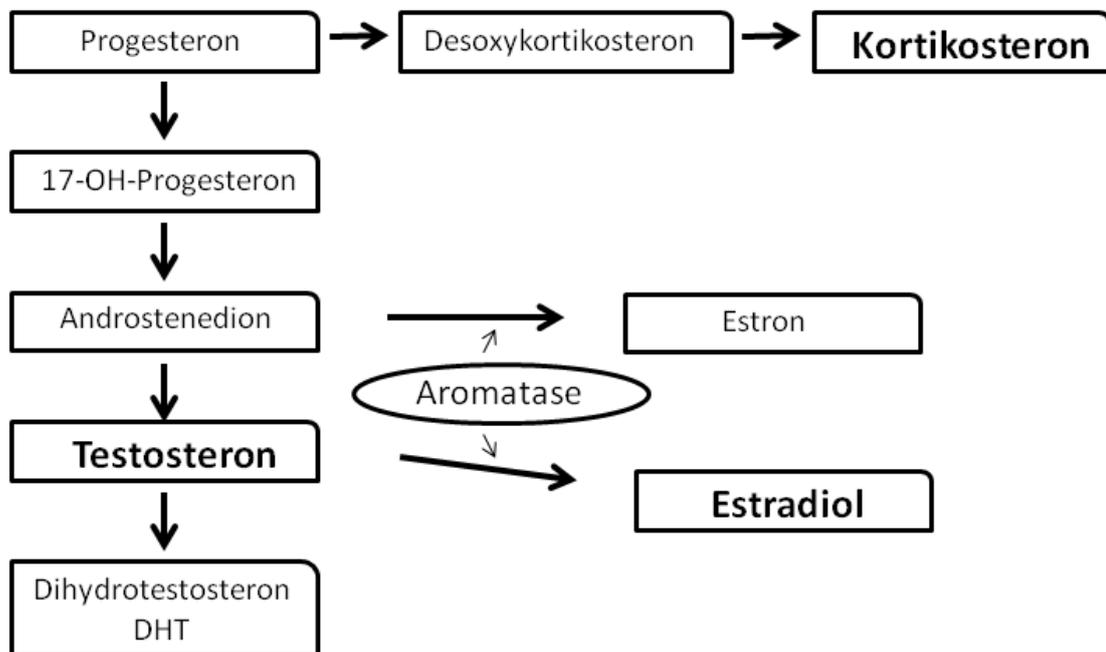


Abbildung 2 Ausschnitt aus der Biosynthese der Steroidhormone: Das Progesteron ist sowohl die Ausgangsverbindung für die Synthese von Kortikosteron, als auch für die Androgene; wie Androstenedion und dessen Derivat Testosteron. Aus Testosteron geht wiederum mittels Aromatase das Östrogen Estradiol hervor.

Allen Rezeptoren ist gemein, dass sie nach Bindung des Liganden entweder eine schnelle zelluläre Signalkaskade auslösen können, oder selbst, durch Bindung an entsprechende Promotoren, die Expression von Zielgenen induzieren, also als Transkriptionsfaktoren wirken (Evans, 1988; siehe Abbildung 3).

Die Kortikoid-Rezeptoren (Reul and DeKloet, 1985) gehören zu der, im Gehirn weitverbreiteten, Überfamilie der nukleären Rezeptoren, deren Funktion als Ligand-aktivierte Transkriptionsfaktoren bereits von Mangelsdorf et al. (1995) beschrieben wurde. Beide sind in hoher Dichte im Hippokampus colokalisiert (Van Ekelen und DeKloet, 1992; Han et al., 2005), sind aber auch in der Amygdala oder dem Präfrontalen Cortex nachweisbar (Oitzl et al., 2010). Sie liegen bei Abwesenheit ihres Liganden in großen Proteinheterokomplexen vor. Diese werden z.B. durch Chaperon-Proteine, wie Hsp90 oder p23, gebildet und stabilisieren den Komplex im Cytoplasma der Zellen. Wird ein Ligand gebunden, kommt es zu einer

Konformationsänderung des Komplexes und dieser wird, mit Hilfe der Mikrotubuli des Cytoskeletts, in den Zellkern transportiert. Hier bindet der Ligand-Rezeptor-Komplex an das Glukokortikoid-Bindemotiv (Glukokortikoid response element, GRE) des Promotors der entsprechenden Zielgene und induziert deren Transkription (Pratt et al., 2004; Nishi and Kawata, 2006). Es wird angenommen, dass die regionalen Unterschiede der Regulation auf unterschiedliche Transportmechanismen zurückzuführen sind; hippocampale Zellen weisen etwa ein eigenes Expressionsmuster für die Komponenten des Chaperon-Komplexes auf (Arnold and Trojanowski, 1996). Beide Rezeptoren bilden in ihrer Funktion als Transkriptionsfaktor Dimere (‘transactivation’), als Monomere können sie jedoch (vorzugsweise GR) andere Transkriptionsfaktoren in ihrer Funktion beeinflussen (‘transrepression’). Für die hippocampale Formation konnte in allen vier Unterbereichen (CA1, CA2, CA3, DG) sowohl eine hohe Dichte an MR, als auch (in den Unterbereichen CA1, CA2 und DG) an GR nachgewiesen werden, nur in der CA3-Region liegt GR in geringer Dichte vor (Sarabdjitsingh et al., 2009). MR hat im Vergleich zu GR eine zehnfach höhere Affinität zu Kortikosteron und ist meist auch unter homöostatischen Bedingungen abgesättigt (Reul and DeKloet, 1985). GR wird mit Anstieg der Kortikosteron-Konzentration rekrutiert, demnach während Stress, oder während der aktiven Phase der circadianen und ultradianen Rhythmik (Windle et al., 1998). So ist MR hauptsächlich an der Aufrechterhaltung der neuronalen Integrität und Stabilität im Allgemeinen, GR an der schnellen Pufferung der Stressantwort, der Regeneration und der Speicherung neuer Informationen, beteiligt (Nair et al., 2004; Roozendaal et al., 2009, Oitzl et al., 2010). Allerdings kann MR durch schnelle Hochregulation ebenfalls wichtige Aufgaben in der akuten Stressantwort vermitteln. Neben diesen Beobachtungen, welche sich auf die langsamere, nukleäre Funktion der Rezeptoren beziehen, können diese auch eine schnelle Reaktion mittels ihrer Rolle als Membran-Rezeptor vermitteln. Sie können zum Beispiel eine Kortikosteron-induzierte Glutamatausschüttung in der CA1 Region des Hippokampus bedingen und bieten den Zellen somit eine Möglichkeit, noch schneller auf einwirkende Stressoren zu reagieren (Karst et al., 2005) und, wenn

nötig, eine Änderung der Bewältigungsstrategie (coping strategy) einzuleiten (Schwabe et al., 2008, 2010). Diese zentrale Funktion in der Regulation der Stressantwort erfordert eine ausgewogene Balance zwischen den beiden Rezeptoren (DeKloet et al., 2005; Oitzl et al., 2010). Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass eine verhinderte Homodimerisierung der GR, eine selektive Schwächung des räumlichen Gedächtnisses im Morris-Water-Maze-Paradigma zur Folge hat. Das MR-gesteuerte Explorationsverhalten dagegen wurde nicht beeinflusst (Oitzl et al., 2001). Außerdem wurde der Einfluss der Aktivierung beider Rezeptoren auf die LTP vielfältig untersucht; wobei die Aktivierung von GR die hippocampale LTP inhibiert, die Aktivierung der MR diese hingegen verstärkt (Pavlidis et al., 1995; Pavlidis und McEwen, 1999; Smigra et al., 1998). So bewirkt Stress eine Erhöhung von sowohl MR (Gesing et al., 2001), als auch Kortikosteron, was zu einem Wechsel in der MR-GR-Balance führt und eine Verlängerung der LTP möglich macht (Korz et al., 2003; Wang et al., 2013).

Der Androgen-Rezeptor gehört ebenfalls zu den Ligand-aktivierten Transkriptionsfaktoren und bindet Testosteron und dessen Derivat Dihydrotestosteron (DHT). Auch der Androgen-Rezeptor bildet Dimere in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor und bindet an das Androgen-Bindemotiv (androgen-responsive element, ARE) des Promotors seiner Zielgene, rekrutiert dort Steroid-Rezeptor-Koaktivatoren, sowie CREB-Bindeproteine und induziert die Transkription der Gene (Aarnisalo et al., 1998). Neben dieser aktivierenden Funktion, über positiv wirkende Cis-Elemente, kann die Transkription mittels negativ wirkenden Cis-Elementen unterdrückt, oder auch mittels Protein-Protein-Interaktionen über Trans-Elemente beeinflusst werden (Truss and Beato, 1993; Beato et al., 1995; Lefstin and Yamamoto, 1998). Die Regulation der Expression ist ebenfalls divers, so gibt es in der hormonellen Regulation und auch innerhalb der verschiedenen Hirnareale Unterschiede. In kastrierten männlichen Ratten zum Beispiel, erhöht sich die mRNA-Konzentration des Rezeptors in der Hypophyse und des präoptischen Areals des Hypothalamus, jedoch nicht in der Amygdala (Handa et al., 1996). Auch im Hippokampus kann eine hohe Konzentration an AR-mRNA

nachgewiesen und in die Regulation hippokampaler Funktionen involviert werden (Beyenburg et al., 2000). So wurde gezeigt, dass Androgene das Lernen und das Gedächtnis beeinflussen. Die Gabe von Testosteron führte hierbei zu einer verbesserten Leistung in der Retentionsphase des aktiven Vermeidungslernens in männlichen Mäusen, diese Wirkung lässt jedoch mit steigendem Alter nach (Flood et al., 1992). Kumar und Thakur (2004) zeigten, dass AR in männlichen Tieren höher konzentriert ist, als in weiblichen Tieren und, dass die Gabe von Testosteron zu einer Minderung, die Gabe von Estradiol jedoch zu einer Erhöhung der AR mRNA-Konzentration führt. Beides war zurückzuführen auf eine Methylierung, bzw. Demethylierung der Promotorregion. Die Beeinflussung der Expression von AR durch Östrogen wird hierbei nicht direkt über Östrogen-Bindemotive in der AR-Promotorregion vermittelt, sondern könnte über Protein-Protein-Interaktionen zwischen Östrogen-Rezeptoren und Sp1 (specificity protein-1) - welches wiederum Bindemotive im AR-Promotor aufweist - induziert werden (Saville et al., 2000). Auch diese Entdeckung unterstreicht die Diversität und die vielfachen Wechselbeziehungen zwischen Steroidrezeptoren und modulierenden Proteinen.

Der Kernrezeptor für das Steroidhormon Estradiol liegt in zwei Subtypen vor: ER $\alpha$  und ER $\beta$ . Beide Rezeptortypen weisen eine hohe Affinität für Estradiol auf und binden an demselben DNA-Bindemotiv (Östrogen-responsive element, ERE). Die Verteilung beider Rezeptoren im Gehirn unterscheidet sich dagegen. Es gibt Hirnregionen, die ausschließlich ER $\alpha$  oder ER $\beta$ , aber auch eine Vielzahl an Hirnregionen, die beide Rezeptoren exprimieren, diese jedoch in recht unterschiedlichen Dichten. So weist der Hippokampus eine viel geringere Dichte an ER $\alpha$ , im Vergleich zu ER $\beta$ , auf (Shughrue et al., 1998). Wilson et al. (2002) wagen die Unterscheidung, dass ER $\alpha$  in Regionen exprimiert wird, die in die Reproduktion und das Verhalten, ER $\beta$  hingegen in Regionen exprimiert wird, die nicht in die Reproduktion, involviert sind. Die Untersuchungen zur Wechselwirkung beider Rezeptoren zeigten, dass ER $\beta$  die negative Feedback-Reaktion von Estradiol auf ER $\alpha$  verhindert, in dem es Estradiol als Ligand bindet. Ein weiterer Fokus wurde auf den Einfluss beider Rezeptoren auf das Lernen gelegt. Mit Hilfe von weiblichen Knock-

Out-Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass ein Mangel an ER $\beta$  zu einer Verschlechterung des räumlichen Lernens führt, bzw. ER $\beta$  aktiv an der Ausbildung des Referenzgedächtnisses beteiligt ist. Im Gegensatz dazu, kann durch den Knockout des Östrogen-Rezeptor  $\alpha$ , eine Verschlechterung des räumlichen Lernens durch zu hohe Estradiol-Konzentrationen verhindert werden. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass der negative Einfluss von Estradiol im Morris Watermaze durch ER $\alpha$  vermittelt wird und ER $\beta$  diesem entgegenwirken kann. Oder es ist denkbar, dass ER $\alpha$  für eine emotionale Amygdala-abhängige Form des Lernens benötigt wird und ER $\beta$  im Hippokampus-abhängigen räumlichen Lernen eine wichtigere Rolle spielt (Fugger et al., 1998; Rissmann et al., 2002).

Auch für die Östrogen-Rezeptoren liegen Membran-gebundene Rezeptortypen vor (mER), diese sind den nukleären Varianten in ihrer Struktur ähnlich und vermitteln eine sehr schnelle Zellantwort mittels Protein-Kinase-Kaskaden (Levin, 2009; Abbildung 3). Auch ihr wesentlicher Einfluss auf den Schutz neuronaler Zellen und die Verhinderung des apoptotischen Zelltod wurde untersucht. So ist heute bekannt, dass eine erhöhte Expression von Membran-gebundenem ER $\alpha$  eine schützende und die von ER $\beta$  eine schädigende Wirkung zeigt. Eine Störung des ER $\alpha$  : ER $\beta$ -Gleichgewichts führt wahrscheinlich zur Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase, welche wiederum die Phosphorylierung von p53 bedingt und, im Weiteren die Apoptose einleitet (Mendoza et al., 2011). Außerdem scheint, als weitere Schutzmaßnahme gegen eine weiträumige Apoptose, die Expression von mER $\alpha$  an der Zelloberfläche, ein wichtiges Signal für die Einleitung der Autophagozytose zu sein (Larsen and Sulzer, 2002).

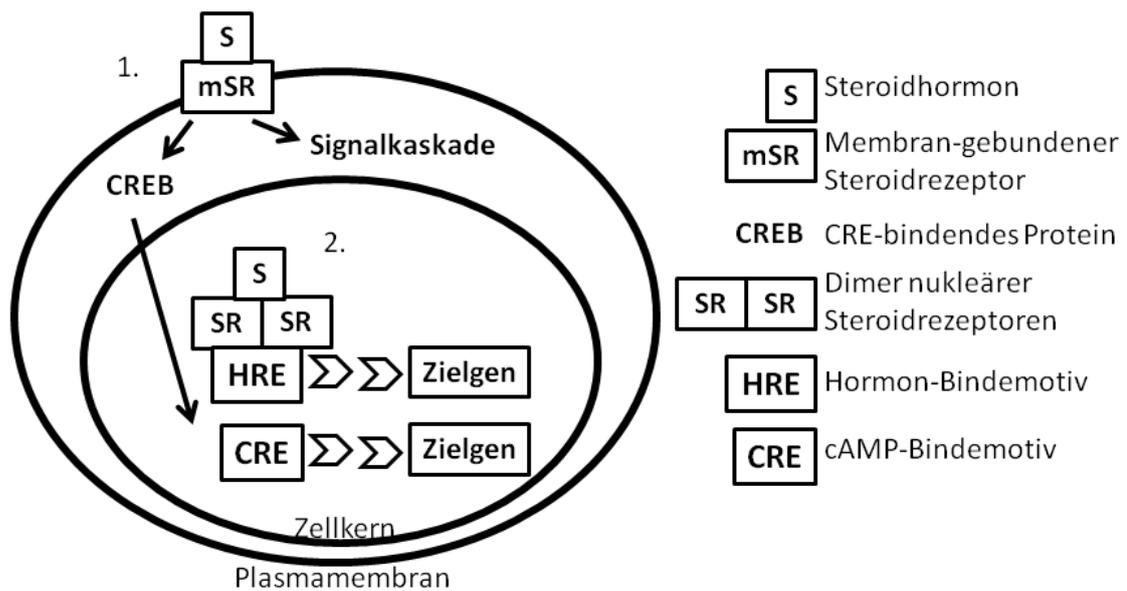


Abbildung 3 Funktionswege der Steroidhormonrezeptoren: 1. Das Steroidhormon bindet an seinen Membran-gebundenem Rezeptor und aktiviert entweder eine Proteinsynthese unabhängige Signalkaskade; oder vermittelt die Freisetzung von CREB. CREB bindet im Promotorbereich des Zielgens an das CRE-Motiv und veranlasst dessen Transkription. 2. Das Steroidhormon bindet im Zellkern an mögliche Dimere der Rezeptoren (Homo- und Heterodimere möglich). Der Hormon-Rezeptor-Komplex bindet an das entsprechende Bindemotiv im Promotor des Zielgens und bedingt dessen Transkription.

Ziel der vorliegenden Studie war die nähere Charakterisierung der hippokampalen Steroidrezeptorregulation unter dem Einfluss des räumlichen Lernens. Da in der vorliegenden Untersuchung signifikante Effekte in der Regulation, besonders des ER $\alpha$  gefunden werden konnten, lag es in unserem Interesse, diese Wirkung näher zu bestimmen. Da sich für Steroidhormon-Rezeptoren sowohl Membran-gebundene, als auch nukleäre Rezeptortypen nachweisen lassen, war es im Weiteren ein Ziel, die Bedeutung beider Formen zu differenzieren. In dieser Studie wurde daher zunächst ein spezifischer ER $\alpha$ -Inhibitor verwendet, das Methyl-piperidino-pyrazol (MPP). Er blockiert sowohl die transkriptionsaktivierende (genomische) Funktion, als auch die Membran-Rezeptor-vermittelten Effekte (über Signal-Kaskaden sowohl genomische, als auch nicht- genomische Effekte), mittels Bindung an die Ligand-Bindungstasche (Sun et al., 2002).

Da das Absolvieren des Lernparadigmas nicht nur vielfältige Veränderungen im Steroidhormonhaushalt und den spezifischen Rezeptoren induziert und ein Netzwerk verschiedenster regulatorischer Prozesse aktiviert, wurden neben der Quantifizierung der relativen Genexpression der hippokampalen Steroidrezeptoren, ebenfalls die Expression des Aromatase-Gens Cyp19 und des Wachstumsfaktor BDNF bestimmt. Auf hormoneller Ebene wurden zusätzlich die Konzentrationen von Kortikosteron, Testosteron und Estradiol detektiert. Um, neben den mRNA-Konzentrationen der Rezeptoren, ebenfalls Aussagen über die Konzentrationen der jeweiligen Proteinkomplexe treffen zu können, wurden diese mittels blue native Western-Blot analysiert. Hinsichtlich der Differenzierung der beiden Rezeptorformen wurden außerdem die cytosolische und die Membranfraktion des hippokampalen Gewebes gesondert analysiert.

## Material und Methoden

### Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden ausschließlich männliche Hannover Wistar-Ratten verwendet. Diese wurden im institutseigenen Tierhaus gezüchtet und ab einem Alter von 7, 11, bzw. 23 Wochen in die Studie übernommen. Die Tiere des ersten Versuchsteils umfassten die drei verschiedenen Altersgruppen; 8 Wochen, 12 Wochen und 24 Wochen (Zeitpunkt des Verhaltensversuchs). Diese Tiere gelten als geschlechtsreif, befinden sich jedoch in unterschiedlichen Stadien der sozialen Entwicklung. Im Gegensatz zu den 8 Wochen alten Tieren, die sich im Endstadium der Pubertät befinden (Quinn, 2005; Sengupta, 2012), können 12 Wochen alte Tiere als junge Erwachsene definiert werden, die zu diesem Zeitpunkt noch keine Dominanz ausgeprägt haben und spielerisch ihre Rolle in der Gruppe erproben (Adams and Boice, 1989). Tiere im Alter von 24 Wochen zeigen dieses spielerische Verhalten nicht mehr, sie sind sozial vollständig entwickelt und zeigen Dominanzverhalten (Adams and Boice, 1989). Im zweiten Versuchsteil wurden ausschließlich 8 Wochen alte Tiere für das Holeboard-Training verwendet. 21 Tage nach ihrer Geburt wurden die Tiere von der Mutter getrennt und je fünf männliche Tiere bis zum Beginn des Experimentes (Zeitpunkt der Implantation der i.c.v Kanülen) in Käfigen mit den Maßen 59×38×25cm zusammen gehalten. Nach der Implantation der intracerebroventrikularen Kanüle, wurden die Tiere in Einzelkäfigen mit den Maßen 40×25×18cm gehalten. Die Tiere hatten bis zu diesem Zeitpunkt Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum* und wurden in einem 12h:12h Lichtregime (Licht angeschaltet ab 6:00Uhr) gehalten. Alle Experimente wurden nach den Richtlinien der Europäischen Gemeinschaft vom 24. November 1986 (86/609/EEC) durchgeführt und von der zuständigen Ethikkommission genehmigt (Az: 203h-42502-2-952-OvGU).

## Implantation der i.c.v. Kanüle

Jedem Versuchstier wurde eine intracerebroventrikuläre Kanüle in den lateralen Ventrikel der rechten Hemisphäre implantiert. Zuvor wurden die Tiere gewogen und, mittels intraperitonealer Injektion des Narkosemittels Nembutal (40mg/kg), anästhesiert. Anschließend wurde den Tieren, in einer stereotaktischen Operation (Abbildung 4), die Kanüle mit den Koordinaten AP – 0.8; L - 1.5 von Bregma eingesetzt. Die Kanüle wurde an diesem Punkt auf eine Länge von 4mm abgesenkt und, zusammen mit einer Halteschraube, mit einem Kunststoff-Kaltpolymerisat (Paladur®, Heraeus, Hanau, Deutschland) fixiert. Die Genesungszeit bis zum Beginn des Verhaltensversuches betrug stets mindestens 5 Tage.

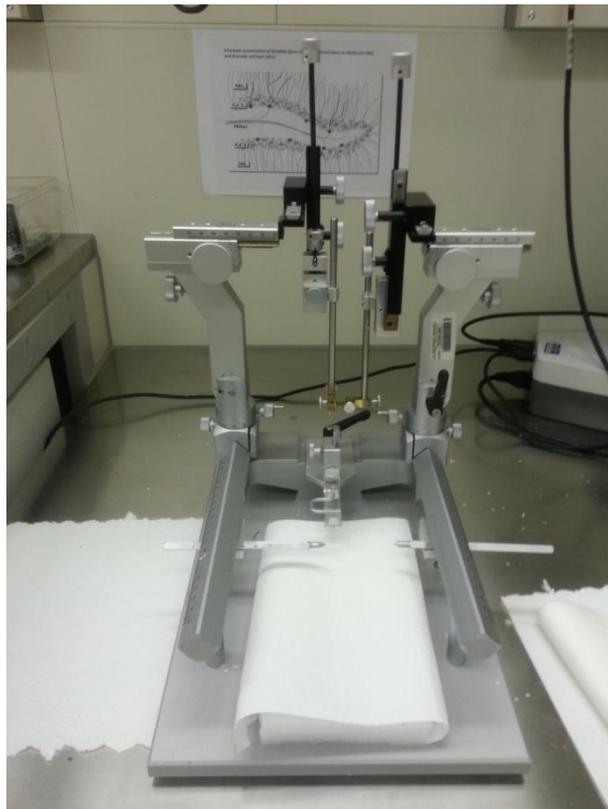


Abbildung 4 Stereotaktisches Instrument zur Implantation der i.c.v. Kanüle

## Pharmakologie

Vorhergehende Versuche zeigten nach der einmaligen Injektion von  $1\mu\text{g}$  Testosteron (gelöst in  $5\mu\text{l}$  Kochsalzlösung mit 40% Propandiol), 30 Minuten vor dem RetentionsTrial, also 24 Stunden nach Induktion der LTP, einen Effekt auf die späte Phase der hippocampalen Langzeitpotentierung (LTP). Jedoch konnte kein Unterschied im Verhalten nachgewiesen werden (Schulz und Korz, 2010). Da ein möglicher Effekt auf das räumliche Lernen auf der zellulären Ebene stattfinden könnte, der wiederum einen längeren Wirkungszeitraum erfordert, wurde die Injektion von Testosteron der gleichen Konzentration zu einem früheren Zeitpunkt (24 Stunden vor den RetenstionsTrial) getestet. Hierfür wurden Tiere drei verschiedener Entwicklungsstufen, also im Alter von ungefähr 8 Wochen, 12 Wochen und 24 Wochen, untersucht (Abbildung 5).

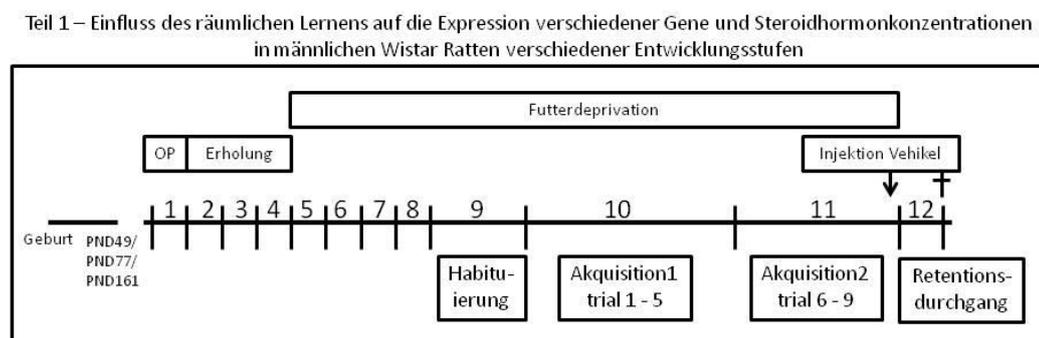


Abbildung 5 Übersicht des Versuchsablaufs der ersten Teilstudie; Tag 1: Implantation der i.c.v. Kanüle; Tag 5: Wiegen der Tiere und Beginn der Futterdeprivation; Tag 9: Habituation an den Experimentator und den Versuchsaufbau; Tag 10 – 12: Holeboard-Training; Tag 11: Injektion des Vehikels nach Abschluss des neunten Trials; Tag 12: Dekapitierung der Tiere 15 Minuten nach Abschluss des zehnten Trials.

Die parallel dazu trainierten Kontrollgruppen erhielten  $5\mu\text{l}$  des entsprechenden Vehikels, 40% Propandiol gelöst in isotoner Kochsalzlösung. Außerdem wurde je eine zweite, dem Alter entsprechende, Kontrollgruppe mitgeführt, die zwar eine synchrone pharmakologische Behandlung (Vehikel), jedoch kein Training, erhielt. Die einmalige Injektion von  $1\mu\text{g}$  Testosteron, 24 Stunden vor dem

Retentionsdurchgang, konnte jedoch ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in den Verhaltensparametern induzieren. Daher wird in dieser Arbeit nicht weiter auf die Versuche zum Einfluss von Testosteron auf das räumliche Lernen eingegangen. Die alters- und trainingsbedingten (Testosteron-unabhängigen) Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen bildeten jedoch die Grundlage für die anschließenden Untersuchungen und werden in dieser Arbeit ausführlich erläutert.

Desweiteren wurden jeweils 4 verschiedene Konzentrationen des Estrogen Rezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) – Antagonisten Methyl-piperidino-pyrazole (MPP) getestet. Die Konzentrationen betragen für den Antagonisten jeweils 1,5 $\mu$ mol; 3,7 $\mu$ mol; 7,4 $\mu$ mol und 12,6 $\mu$ mol, diese wurden ebenfalls in 5 $\mu$ l Vehikel gelöst; hierbei handelte es sich um Wasser. Demzufolge wurde für den Antagonisten sowohl eine trainierte, als auch eine nicht trainierte Kontrollgruppe parallel mitgeführt. Die Injektion des ER $\alpha$ -Antagonisten erfolgte subchronisch über 7 aufeinander folgende Tage (Abbildung 6). Injiziert wurde hierfür parallel zur Futterdeprivation, 5 Tage vor dem ersten Trainingstag und während der beiden Trainingstage, jeweils gegen 8:15Uhr.

Teil 2 – Einfluss des ER $\alpha$ -Antagonisten MPP auf das räumliche Lernen, die Expression verschiedener Gene und Steroidhormonkonzentrationen in 8 Wochen alten, männlichen Wistar Ratten

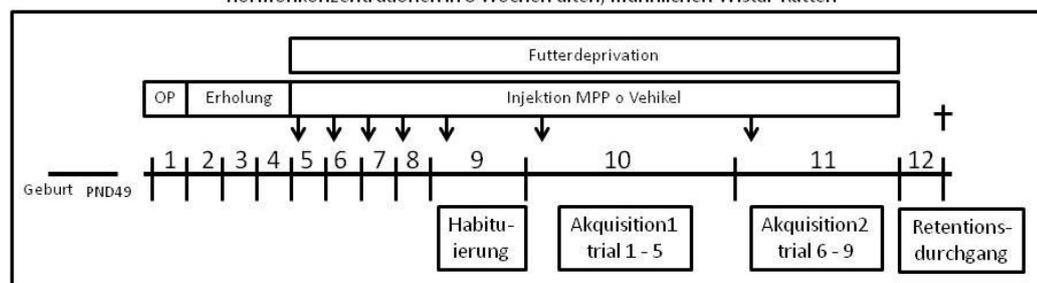


Abbildung 6 Übersicht des Versuchsablaufs der ersten Teilstudie; Tag 1: Implantation der i.c.v. Kanüle; Tag 5: Wiegen der Tiere und Beginn der Futterdeprivation; Tag 5 – 11: pharmakologische Behandlung der Tiere zwischen 8:00 und 8:30 (mindestens 30 Minuten vor Beginn des Trainings); Tag 9: Habituation an den Experimentator und den Versuchsaufbau; Tag 10 – 12: Holeboard-Training; Tag 12: Dekapitierung der Tiere 15 Minuten nach Abschluss des zehnten Trials.

Für diese Versuche wurden ausschließlich 8 Wochen alte Wistar Ratten getestet. Die Injektionen erfolgten mittels Hamilton-Spritzen, durch den Einsatz eines

flexiblen Schlauches konnten die Tiere sich während der Injektion frei bewegen (Abbildung 7). Die Volumina von 5 $\mu$ l wurden über einen Zeitraum von 5 Minuten injiziert (1 $\mu$ l/min) um eine gewebeschonende Diffusion ins Hirn zu ermöglichen. Der Injektor wurde nach Beendigung des Injektionsvorganges noch mindestens eine Minute in der Kanüle belassen um eine Substanzmitnahme durch das Herausziehen zu vermeiden.



Abbildung 7 Injektion mittels Hamilton-Spritze über einen flexiblen Schlauch zur Gewährleistung der freien Bewegungsfähigkeit der Versuchstiere

## Verhaltensversuche

### Holeboard

#### Holeboard – räumliches Lernen

Das Holeboard (Abbildung 8) wurde erstmals 1962 von Boissier und Simon beschrieben und besteht in unserem Versuch aus einer quadratischen Plattform (1x1m) mit 16 Löchern ( $\varnothing$  7,5cm; 7cm tief). Die Plexiglaswände (50cm hoch) sind mit weißem Papier verkleidet und mit unterschiedlichen schwarzen Zeichen (eines

pro Seite) als Orientierungshilfen versehen. Vier der 16 Löcher sind in einem festen Muster mit geruchlosen Futterpellets (dustless precision pellets, 45 mg, BioServ) beködert. Die Löcher sind auf halber Höhe mit Lichtschranken versehen, deren Durchbrechen durch die Biobserv Viewer Software angezeigt und im Folgenden als „Dip“ bezeichnet wird. Mittels dieser Software können zum Einen Verhaltensparameter, wie die Zeit zum Finden aller Pellets oder die Geschwindigkeit mit der sich das Tier bewegt, erfasst werden und zum Anderen Lernparameter, wie der Besuch unbeködeter Löcher, oder der wiederholte Besuch eines bereits besuchten Loches dokumentiert werden.

In jedem Durchgang hat das Tier maximal 2 Minuten, bzw. 120 Sekunden, Zeit, um sich auf dem Holeboard frei zu bewegen und die vier Pellets zu finden. Ziel des Trainings ist es, das feste Muster der beköderten Löcher zu erlernen. Bewältigt das Tier die Aufgabe innerhalb der vorgegebenen Zeit (findet es alle 4 Pellets in weniger als 2 Minuten), wird der Durchgang umgehend beendet und das Tier wieder in den Käfig zurück gebracht. Parallel dazu wird die durchschnittliche Geschwindigkeit mit der sich das Tier bewegt in [cm/sec] gemessen und ist somit unabhängig von der Dauer des Durchgangs. Erlernt das Tier über die Zeit, bzw. die Anzahl der Durchgänge, die Positionen der beköderten Löcher, und macht weniger Fehler, nimmt die benötigte Zeit zum Finden aller Pellets also theoretisch ab. Als Fehler ist hierbei, sowohl der Besuch eines unbeköderten Loches, als auch der erneute Besuch eines beköderten Loches innerhalb eines Durchgangs, definiert. Ersterer steht in diesem Lernparadigma für einen Referenzgedächtnisfehler (RGF) – die Ratte sollte ebenfalls Lernen, welche die 12 unbeköderten Löchern sind (kein Köder = keine Belohnung = kein Besuch erforderlich). Der wiederholte Besuch eines beköderten Loches ist als Arbeitsgedächtnisfehler (AGF) definiert. Das Tier sollte sich innerhalb eines Durchganges merken, welches Loch es bereits besucht hat ( $\hat{=}$  Kurzzeitgedächtnis). Für den zweiten Teil der Studie wurde außerdem der Parameter „Dips pro Sekunde“ ausgewertet. Hierfür wurden alle Lochbesuche eines Durchgangs durch die Dauer dieses Durchgangs dividiert. Die Verknüpfung der Daten der Zeit zum Finden aller Pellets, (abnehmende Werte stehen für

zunehmenden Lernerfolg) mit der Anzahl aller Lochbesuche (4 Dips der 4 beköderten Löcher wären optimal), gibt uns die Möglichkeit, Aussagen über die Effektivität, bzw. Impulsivität, der einzelnen Versuchsgruppen zu treffen.

Um die Lernparameter statistisch auszuwerten, wurde ein Fehlerindex eingeführt. Der Index wird berechnet als:  $\text{gesamte Lochbesuche} / (\text{gesamte Lochbesuche} + \text{Fehler})$ . Somit ergibt sich für die Tiere, die alle 4 Pellets finden und dabei keinen Fehler machen ein Wert von 1; für die Tiere, die ausschließlich unbeköderte Löcher besuchten (Anzahl Fehler = Anzahl Lochbesuche) ein Wert von 0,5 und für die Tiere, die kein Loch besuchen (daher auch keine Fehler machen), der Wert 0 (im Fall  $0/(0+0)$  wurde das Ergebnis auf Null gesetzt).

Dadurch ist es uns möglich, die Tiere, die keine Fehler machen, weil sie sich nicht auf dem Holeboard bewegen, von denen, die einen fehlerfreien Durchgang absolviert haben, zu trennen.



Abbildung 8 Holeboard-Test: 4 von 16 Löchern sind in einem festen Muster mit Belohnungspellets beködert

© Center for Behavioral Brain Sciences, Foto: D. Mahler

### **Holeboard – Versuchsverlauf**

Mindestens 4 Tage vor Beginn des Trainings wurden alle Tiere futterdepriviert. Sie erhielten in diesem Zeitraum etwa 5g bis 6g Futter pro Tag, so dass zu Beginn der

Experimente ein Körpergewicht von etwa 80% des Ausgangsgewichtes erreicht wurde. Während des gesamten Versuchszeitraums wurden die Tiere in Einzelkäfigen (40×25×18cm) gehalten und verblieben im Versuchsraum. Für die jeweiligen Trainingsdurchgänge wurden die Tiere vom Käfig auf das Holeboard gebracht und anschließend wieder in ihren Käfig gesetzt.

Am Vorbereitungstag wurden die Tiere 4min. auf das Holeboard habituiert. Das Training begann jeweils am Folgetag um 9:00Uhr. Ein Durchgang (Trial) betrug maximal 2 Minuten, oder wurde nach dem Finden aller 4 Pellets gestoppt. Das InterTrial-Intervall betrug 15 Minuten (siehe Uzakov et al., 2005). Nach jedem Trial wurde das Holeboard mit 20%igem Ethanol gereinigt und neu beködert. Das gesamte Training erstreckte sich über drei aufeinander folgende Tage. Am ersten Trainingstag erfolgten 5 Trials, am zweiten Tag 4 Trials und am dritten Tag 1 Trial. Dieser Retentionsdurchgang wurde 24 Stunden nach dem neunten Trial (Tag 2), um 10:00 Uhr am dritten Tag durchgeführt. Die Tiere wurden 15 Minuten nach dem letzten Durchgang dekapitiert und Proben vom Präfrontalen Cortex, dem rechten Hippokampus und Blutproben genommen.

## **Open-Field-Test**

### **Open-Field-Test – Quantifizierung des Erkundungsverhaltens**

Der Open-Field-Test wird zur Bestimmung des Erkundungs- bzw. des Vermeidungsverhaltens verwendet. Hierbei wird das natürliche Bestreben der Tiere genutzt, sich in sicheren und größtmöglichen Schutz bietenden Arealen zu bewegen. Die Testarena besteht aus einer hellen Freifläche, welche von vier Wänden eingegrenzt wird, auf der sich das Tier frei bewegen kann. Die Unterschiede in den zu beobachtenden Verhaltensweisen, wie die vermehrte Bewegung an der Wand entlang, wird hierbei als Maß für Ängstlichkeit interpretiert, die vermehrte

Bewegung in der zentralen Zone zeigt dagegen eine erhöhte Risikobereitschaft, bzw. ein verstärktes Erkundungsverhalten des Tieres an.

Für den Open-Field-Test wurde die Holeboard-Apparatur modifiziert. Mittels einer schwarzen Plastikplatte wurden der Boden und die darin befindlichen Löcher abgedeckt und somit eine einheitliche Arena geschaffen (Abbildung 9). Das Erkundungs- und Vermeidungsverhalten der Tiere wurde über die Viewer-Software dokumentiert und ausgewertet. Die Bodenfläche wurde wie folgt eingeteilt:

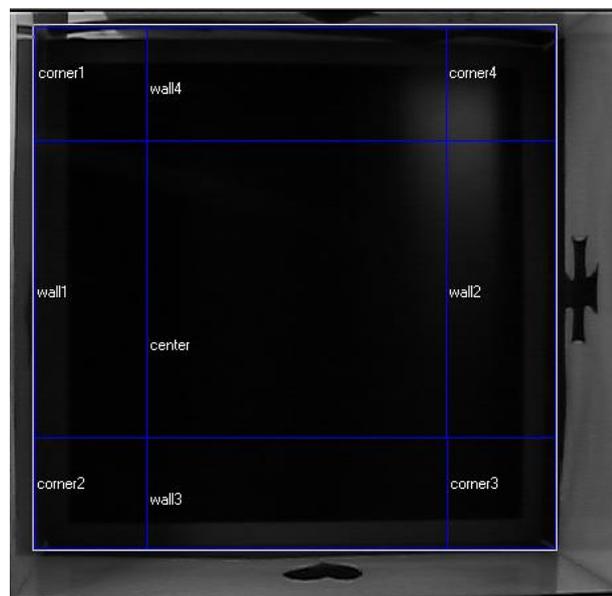


Abbildung 9 Open-Field-Test: Zonendefinition

Die Wandzonen wurden 25cm breit gewählt, die Schnittstellen wurden als Ecken definiert (25 cm x 25 cm), die zentrale Zone hat somit eine Abmessung von 50cm x 50cm.

Die Auswertung erfolgte für drei verschiedene Parameter: die Aufenthaltsdauer in den jeweiligen Zonen (Wand, Ecke, zentrale Zone), die Geschwindigkeit mit der sich die Tiere bewegten, sowie die Wegstrecke, die sie zurücklegten.

### Open-Field-Test – Versuchsverlauf

Getestet wurden in diesem Versuchsteil 8 Wochen alte Tiere, welche entweder mit 7,4 $\mu$ mol MPP, oder dem entsprechenden Vehikel (Wasser), behandelt wurden. Die Implantation der Kanüle, sowie die Dauer der Genesungszeit entsprechen den oben angegebenen Daten. Die Injektion begann jeweils 5 Tage vor dem ersten Versuch, so dass jedes Tier vor dem ersten Durchgang die sechste und vor dem zweiten Durchgang die siebente Injektion erhielt (Abbildung 10). Die Tiere wurden für diesen Versuch nicht futterdepriviert.

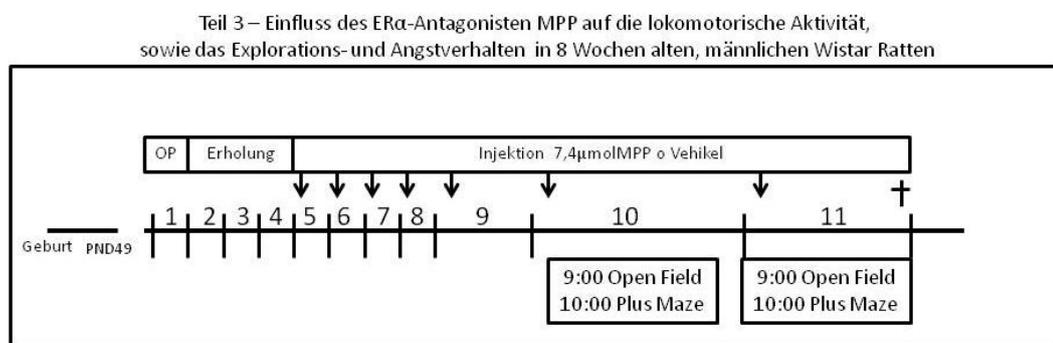


Abbildung 10 Übersicht des Versuchsablaufs der dritten Teilstudie; Tag 1: Implantation der i.c.v. Kanüle; Tag 5: Wiegen der Tiere, jedoch keine Futterdeprivation; Tag 5 – 11: pharmakologische Behandlung der Tiere zwischen 8:00 und 8:30 (mindestens 30 Minuten vor Beginn des Trainings); Tag 10 und 11: 9:00 Open-Field-Test, 10:00 Plus-Maze-Test; Tag 11: Dekapitierung der Tiere 30 Minuten nach Abschluss des Plus-Maze-Tests.

Jedes Tier wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils ab 9:00Uhr für 5 Minuten im Open-Field getestet. Hierfür wurden sie aus ihrem Einzelkäfig auf das Open-Field gebracht und anschließend umgehend in ihren Käfig zurückgesetzt. Die Versuchsdurchgänge begannen jeweils in der oberen linken Ecke (corner 1).

## Plus-Maze-Test

### Plus-Maze-Test – Quantifizierung des Angstverhaltens

Der elevated Plus Maze Test ist ein Standardtest zur Untersuchung des Angstverhaltens der Tiere. Hierbei ist die „Arena“ in vier Arme unterteilt, von denen 2 von Wänden eingerahmt sind, die anderen beiden dagegen frei in den Raum ragen (Abbildung 11). In diesem Versuchsaufbau wird das Betreten, bzw. das Verweilen, auf den offenen Armen mit einer hohen Risikobereitschaft und einer geringeren Ängstlichkeit korreliert. Der Aufenthalt in den geschlossenen Armen entspricht hingegen dem natürlichen Bedürfnis nach Sicherheit und Schutz. Beide Verhaltenstests haben den Vorteil, schnelle Aussagen über das Angstverhalten der Tiere zu treffen, ohne beeinflussende Belohnungs- oder Bestrafungsmaßnahmen.

Die Auswertung der drei Parameter (Verweildauer, Geschwindigkeit und Wegstrecke) wurde ebenfalls mit Hilfe der Viewer-Software durchgeführt. Die Abmessung der zentralen Zone betrug 10 cm x 10 cm; die einzelnen Arme waren jeweils 50 cm lang und die Wände der geschlossenen Arme haben eine Höhe von 30cm. Somit ergab sich jeweils eine Gesamtbreite von 1,10 m. Die gesamte Verhaltensapparatur ist auf einem Gestell, welches für die Tiere nicht sichtbar ist, auf einer Höhe von 80cm positioniert.

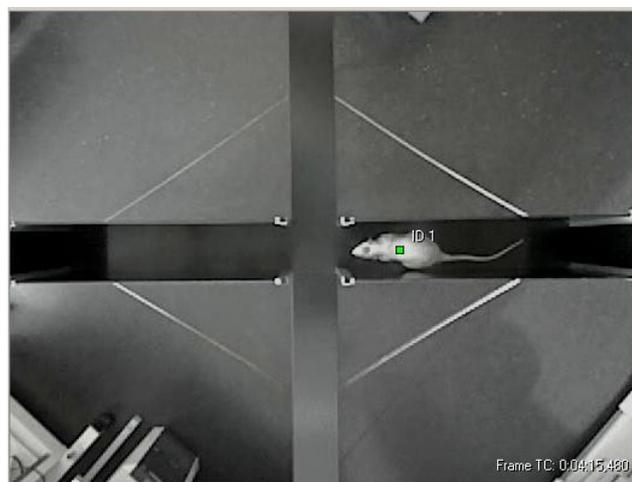


Abbildung 11 Plus-Maze-Test: geschlossene Arme horizontal, offene Arme vertikal

### **Plus-Maze-Test – Versuchsablauf**

Nach dem Durchlaufen des Open-Field-Tests und einem InterTrial-Intervall von einer Stunde wurde ab 10:00 Uhr mit dem Plus-Maze-Test begonnen. Die Tiere wurden hierfür aus dem Käfig genommen und auf die zentrale Zone der Versuchsanordnung gesetzt. Ein Versuchsdurchgang betrug 5 Minuten, in denen sich die Tiere frei auf dem Plus-Maze bewegen konnten. Anschließend wurden sie wieder in ihren Käfig zurückgesetzt. Die Probennahme erfolgte ab 10:30 Uhr, bzw. jeweils 30 Minuten nach dem letzten Durchgang.

### **Gewebeentnahme und Hormonkonzentrationsbestimmung**

Die Tiere der Holeboard-Versuche wurden 15 Minuten nach dem letzten Durchgang (Retentionsdurchgang) dekapitiert. Im Anschluss wurde das Blut der Aorta in einem entsprechenden Reaktionsgefäß mit Gerinnungs-Aktivator (REF 41.1500.005, Sarstedt) aufgefangen und zeitgleich der rechte Hippokampus, sowie der Präfrontale Cortex, sezziert. Die Gewebeproben wurden homogenisiert (Biovortexer Nr. 1083; BioSpec Produkte) und auf ein Endvolumen von 25µl/mg Gewebe verdünnt (Samplediluent, IBL Hamburg; REF KLZZ731). Anschließend wurden alle Proben zentrifugiert (10 Minuten, 10.000UpM), der Überstand aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für die Messung der Hormonkonzentrationen wurde das antikörperbasierte Nachweisverfahren ELISA (enzym-linked Immunosorbent Assay) verwendet. Hierfür wurden die Proben aufgetaut und verdünnt (Gewebeproben: 1:3, 1:2, 1:1 und Serumproben: 1:10, 1:2, 1:5, jeweils für das Testosteron-, 17β-Estradiol- und das Kortikosteron-Assay). Für alle Standards und Proben wurden Doppelproben auf die Platte aufgetragen. Die OD-Werte wurden, bei einer Wellenlänge von 450nm, mittels eines Mikrotiterplatten-Readers (Thermo Scientific Multi FC ELISA Reader) gemessen und mit Hilfe einer '4-Parameter logistische

Anpassungskurve' berechnet. Für die Testosteron-Messung (Testosterone Saliva ELISA, IBL Hamburg) lag die Nachweisgrenze (LOD) bei 2,0pg/ml und die Intra-Assay- bzw. Inter-Assay- Variationskoeffizienten betragen 8,2% und 5,5%. Für die Messung der Estradiolkonzentration wurde das 17 $\beta$ -Estradiol Saliva ELISA Kit von IBL (Hamburg) verwendet, dessen LOD 0,4pg/ml und Intra-Assay- bzw. Inter-Assay-Variationskoeffizienten 9,9% und 11,1% betragen. Für die Messung von Kortikosteron (Kortikosteron ELISA, IBL Hamburg) lag die Nachweisgrenze bei 1,631nmol/L und die Intra-Assay- bzw. Inter-Assay- Variationskoeffizienten betragen 2,77% und 6,14%. Um die Kortikosteron-Werte in [ng/ml] umzurechnen, wurden sie mit dem Faktor 34,646 multipliziert und durch 100 geteilt.

### **Bestimmung der relativen Genexpression**

Für die spätere Bestimmung der relativen Genexpression wurde das Gewebe des rechten Hippokampus mit einem mRNA-Stabilisierungsmittel (RNAlater, Qiagen) versetzt und bei -80°C gelagert. Für die Analyse wurden die Proben homogenisiert (Biovortexer Nr. 1083; BioSpec Produkte) und anschließend die RNA isoliert (RNeasy Plus MiniKit, Qiagen). Diese wurde mittels einer reversen Transkription (high capacity reverse transcription Kit, Applied Biosystems) in cDNA umgeschrieben. Die Genexpressionsanalyse wurde mit dem StepOnePlus<sup>TM</sup> Real-Time PCR System und den hierfür speziell aufeinander abgestimmten TaqMan<sup>®</sup>- Reagenzien von Applied Biosystems durchgeführt. Die verwendeten Assays trugen die Klassifikation "m", deren Primer sogenannte Exon-Junctions umspannen und somit ausschließlich genomische DNA erkennen. Außerdem wurde der TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix verwendet. Für alle Proben wurden dreifache Messungen durchgeführt. Als endogene Kontrolle wurde in jeder Probe, zusätzlich zum Ziel-Assay, die Konzentration von GAPDH (VIC<sup>®</sup>/MGB-Sonde) gemessen. Als nichtregulierte Kontroll-Gene wurden HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) und

PGK (Phosphoglycerat Kinase) gewählt. Untersucht wurden die Gene der Estrogen Rezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ), des Androgen Rezeptors (AR), des Mineralokortikoid Rezeptors (MR), des Glukokortikoid Rezeptors (GR), der Aromatase (Cyp19) und des Wachstumsfaktors BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*; BDNF). Die zu Grunde liegenden Genbank-Daten und Primer-Bezeichnungen von life Technologies (ehemals Applied Biosystems) sind in Abbildung 12 aufgeführt. Für die Auswertung wurde die „comparative cycle threshold“-Methode (Livak and Schmittgen, 2001) benutzt, bei der die Unterschiede in der relativen Genexpression mittels der C<sub>T</sub>-Werte berechnet werden.

Protein / Gen	Primer-Bezeichnung	Genbank-Bezeichnung
ER $\alpha$ / <i>ESR1</i>	Rn01430443_m1	NM_012689.1
ER $\beta$ / <i>ESR2</i>	Rn00562610_m1	NM_012754.1
AR / <i>AR</i>	Rn00560747_m1	NM_012502.1
GR / <i>NR3C1</i>	Rn01405584_m1	NM_012576.2
MR / <i>NR3C2</i>	Rn00565562_m1	NM_037263.1
BDNF / <i>BDNF</i>	Rn01484928_m1	BC087634.1
Aromatase / <i>Cyp 19</i>	Rn01422547_m1	NM_017085.2
PGK / <i>PGK1</i>	Rn00821429_g1	NM_053291.3
HPRT / <i>HPRT1</i>	Rn01527840_m1	NM_012583.2

Abbildung 12 Übersicht über die Primer-Auswahl und die entsprechenden NCBI Genbank-Bezeichnungen der untersuchten Gene

### Bestimmung der cytosolischen und membrangebundenen Proteinkonzentrationen

Um einen genaueren Einblick in die Verteilung einzelner Rezeptorkomplexe zu bekommen wurden hippokampale Gewebeproben, sowohl in eine cytosolische als auch eine Membran-Fraktion, aufgetrennt und mittels Immunoblot untersucht. Diese näher analysierten Rezeptoren waren der Androgen Rezeptor, der Estrogen

Rezeptor  $\alpha$ , der Estrogen Rezeptor  $\beta$ , der Mineralokortikoid- und der Glukokortikoid-Rezeptor.

Hierfür wurde Gewebematerial von jeweils 8 Hippocampi von Tieren, die die beiden Akquisitionsphasen (2 Tage Training; 9 Trials), als auch von Tieren, die das gesamte Holeboard-Training durchliefen (3 Tage; 10 Trials), verwendet. Außerdem wurden zeitlich abgestimmte untrainierte Tiere als Kontrollgruppen mitgeführt. Somit ergab sich eine Gesamtzahl von 32 Proben.

Das Gewebe wurde mittels eines Ultra Turrax (IKA, Staufen, Deutschland) homogenisiert und mit eisgekühltem Homogenisierungspuffer (10nM HEPES, pH=7,5, 300mM Saccharose, eine Proteasen inhibierende Tablette (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland) auf 50mL) versetzt. Die Proben wurden zentrifugiert (10 Minuten, 10.000UpM), der Überstand wiederum in einer Ultrazentrifuge (Beckham Coulter Optima L-90K) zentrifugiert (30 Minuten, 50.000xg). Anschließend wurde das Pellet in 5mL Waschpuffer (Homogenisierungspuffer ohne Saccharose) gelöst, 30 Minuten auf Eis gehalten und wiederum zentrifugiert (30 Minuten, 50.000xg).

Für die weitere Aufreinigung der Membranproteine des Plasmas wurde die (leicht abgeänderte) Zuckergradient-Zentrifugation verwendet (Kang et al., 2008; Heo und Lubec, 2010). 700 $\mu$ l der jeweiligen Zuckergradient-Lösungen (69, 54, 45, 41, und 37% (w/v)) wurden angefertigt und die, in 500 $\mu$ l Waschpuffer gelösten, Membran-Pellets wurden auf den Gradienten aufgebracht. Die Proben wurden anschließend wiederum ultrazentrifugiert (4°C, 3 Stunden, 70.000xg) und die 41%ige Fraktion aufgefangen. Diese wurde mit dem 10 fachen Volumen an Waschpuffer versetzt und erneut zentrifugiert (4°C, 30 Minuten, 50.000xg). Danach wurde der Überstand verworfen und das Membran-Pellet konnte bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C gelagert werden.

Die membrangebundenen Rezeptorproteine wurden wie folgt extrahiert: das Membran-Pellet der 41 prozentigen Fraktion aus der Zuckergradient-Zentrifugation wurde in Extraktionspuffer (1,5M 6-Aminocaprinsäure, 300mM Bis-Tris, pH= 7,0) und 10% DDM (in einem Mischungsverhältnis 1:9 um eine Endkonzentration von 1%

DDM zu erhalten) für eine Stunde solubilisiert; die Lösung wurde alle 10 Minuten mittels Vortex gemischt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (4°C, 60 Minuten, 20.000xg) und der Proteingehalt mit Hilfe des BCA protein assay Kits (Pierce, Rockford, IL, USA) bestimmt. Die extrahierten Membran-Rezeptor-Proteine wurden aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

Für die Blue native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) wurden jeweils 50µg der 32 Proben für die Bestimmung des Mineralokortikoid-Rezeptors, sowie des Estrogen Rezeptor  $\beta$ , verwendet. Für die Bestimmung des Estrogen Rezeptor  $\alpha$ , des Glukokortikoid-Rezeptors und des Androgen Rezeptors wurden jeweils 100µg auf das Gel aufgetragen. Die Proben wurden vor dem Laden des Gels mit 16µl BN PAGE Ladepuffer (5% (w/v) Coomassie G250 in 750mM 6-Aminocapronsäure) vermischt. Die Blue native PAGE wurde mit einem 4% Sammelgel und einem 5-18% Trenngel in einer PROTEAN II xi Elektrophoresekammer (BioRad, Germany) durchgeführt. Die Puffer waren folgendermaßen zusammengesetzt: Laufpuffer (500mM 6 Aminocapronsäure, 50mM Bis-Tris, pH= 7,0); Kathodenpuffer (50mM Tricin, 15mM Bis-Tris, 0,05% (w/v) Coomassie G250, pH= 7,0); Anodenpuffer (50mM Bis-Tris, pH= 7,0). Das Gel wurde mit einer Spannung von 50V für eine Stunde, 75V für 2 Stunden und 100V für 2 Stunden gefahren und dann kontinuierlich auf 200V erhöht bis die Lauffront den Boden des Gels erreichte (Kang et al., 2008). Die mitgeführten Marker (high molecular mass marker) wurden von Invitrogen bezogen (Carlsbad, CA, USA).

Western Blot - Die durch die Elektrophorese aufgetrennten Proben wurden anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membranen für den Nachweis der Androgen-, Estrogen  $\alpha$ -, Estrogen  $\beta$ - und den Glukokortikoid-Rezeptor wurden bei 21°C mit einer Lösung aus 5% Milchpulver in 0,1% TBST (100mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH= 7,5, 0,1% Tween 20) für eine Stunde geblockt. Für die Blockung (Blockierung freier Bindestellen) der Mineralokortikoid-Rezeptor-Membran wurde 1% Milchpulver in 0,05% TBST (wie oben, 0,05% Tween 20) gelöst. Anschließend wurden die Membranen bei 4°C über Nacht mit dem entsprechenden Blocking-Puffer inkubiert, dieser enthielt jeweils den spezifischen Antikörper in

folgender Konzentration: AR 1:500 (Santa-Cruz biology, sc-816), ER $\alpha$  1:500 (Santa-Cruz biology, sc-542), ER $\beta$  1:1000 (Thermoscientific, PA1-130B), GR 1:1000 (Santa-Cruz biology, sc-8992), MR 1:500 (Developmental Studies Hybridoma Bank, rMR1-18 1D5). Nach sechsmaligem Waschen, mit 0,1%TBST (AR, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , GR) bzw. 0,05%TBST (MR), wurden die Membranen mit dem zweiten Antikörper inkubiert und anschließend wieder sechsmal mit dem entsprechenden TBST-Puffer gewaschen. Sekundäre Antikörper: AR 1:1000; ER $\alpha$  1:2000; ER $\beta$  1:20000; GR 1:2000 mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem (polyklonalen) sekundären Antikörper aus Ziege gegen IgG Kaninchen (ab6722, Abcam, Cambridge, UK); MR 1:2000 Meerrettichperoxidase-konjugiertem (polyklonalem) sekundären Antikörper aus Ziege gegen IgG Maus (ab6789, Abcam, Cambridge, UK). Die Entwicklung erfolgte mittels ECL plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) und die Signalstärke der immunoreaktiven Banden wurde mit der Image J Software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) gemessen.

## **Statistische Auswertung**

Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe der SPSS-Software (Version 20) durchgeführt. Zuerst wurden alle Datensätze auf Normalverteilung(Shapiro-Wilk-Test) geprüft. Für die Auswertung der Verhaltensparameter der ersten Studie wurde das einfaktorielle allgemeine lineare Modell (GLM) für wiederholte Messungen verwendet, da das Verhalten eines jeden Tieres für jeden Trial nicht als unabhängig vom vorangegangenen Trial betrachtet werden kann. Als Faktor gelten im ersten Versuch die verschiedenen Altersstufen und im zweiten Versuch die pharmakologische Behandlung. Die Datensätze, sowohl der Verhaltensparameter als auch der Fehlerindizes, waren nicht normal verteilt (Shapiro-Wilk-Test). Diese Daten wurden daher mit einem nichtparametrischen Test für K-unabhängige Stichproben (Kruskal-Wallis-H-Test) ausgewertet. Im Falle eines signifikanten

Ergebnisses wurden nachfolgend mit dem Mann-Whitney-U-Test paarweise Vergleiche für unabhängige Stichproben durchgeführt.

Die Hormon- und Gendaten für den ersten Versuch wurden mit einer multivariaten ANOVA durchgeführt. Als Faktoren wurden zum Einen die verschiedenen Altersstufen und zum Anderen der Trainingszustand der Tiere definiert. Im zweiten Versuch wies die Gruppe der nicht trainierten Tiere, welche ausschließlich mit Vehikel behandelt wurden, im Verhältnis zu den restlichen pharmakologisch behandelten trainierten Tieren, nur eine geringe Stichprobengröße auf. Daher wurde - trainiert vs. nicht-trainiert - als zweiter Faktor nicht berücksichtigt und für die Analyse der Hormon- und Gendaten eine univariate ANOVA durchgeführt (Faktor: Behandlung). Für die Gruppenvergleiche der normal verteilten Gruppen wurde der Post-hoc-Test nach Tukey verwendet. Für nicht normal verteilte Werte wurde der nicht parametrische Mann-Whitney-U-Test für je zwei unabhängige Stichproben verwendet. Für die statistische Auswertung der Western Blot Daten wurde ebenfalls eine einfaktorielle ANOVA und für die Einzelgruppen-Vergleiche der Tukey Post-Hoc-Test verwendet. Alle Tests waren zweiseitig und der Grad der Signifikanz wurde auf  $p \leq 0,05$  festgelegt. Die Verhaltensparameter der ersten Studie wurden einer Hauptkomponentenanalyse mit Varimax-Rotation unterworfen und drei Hauptkomponenten extrahiert. Die Ladungsindizes dieser Analyse, sowie die relative Genexpression und die Hormonkonzentrationen der Individuen, gingen in eine anschließende multiple lineare Regression ein, um Korrelationen zwischen allgemeineren Verhaltenszuständen und physiologischen und molekularen Markern zu identifizieren.

## Ergebnisse

### **Einfluss des räumlichen Lernens auf die Expression verschiedener Gene und Steroidhormonkonzentrationen in männlichen Wistar Ratten verschiedener Entwicklungsstufen**

#### **Verhalten**

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde bei der statistischen Auswertung zwischen dem gesamten Training (Trial 1 - 10), den einzelnen Trainingstagen (Akquisition 1: Trial 1 – 5; Akquisition 2: Trial 6 - 9), sowie dem Retentionsdurchgang (Trial 10) unterschieden. Es konnte, für das gesamte Training, für alle fünf Verhaltensparameter (Abbildung 13) ein signifikanter Unterschied zwischen den Altersstufen nachgewiesen werden: Zeit, zum Finden aller Pellets ( $F_{2,50}= 29,098$ ,  $p<0,001$ ), Anzahl gefundener Pellets ( $F_{2,51}= 16,546$ ,  $p<0,001$ ), durchschnittliche Geschwindigkeit ( $F_{2,42}= 7,606$ ,  $p=0,002$ ), zurückgelegter Weg ( $F_{2,42}= 3,721$ ,  $p=0,033$ ) und Abstand zur Wand ( $F_{2,42}= 20,632$ ,  $p<0,001$ ). Diese Unterschiede waren auf die signifikant bessere Leistung der 8 Wochen alten Tiere, im Vergleich zu den 12 Wochen, als auch zu den 24 Wochen alten Tieren (Zeit: jeweils  $p<0,001$ ; gefundene Pellets: 8Wochen/12Wochen  $p<0,001$ , 8Wochen/24Wochen  $p=0,001$ ; Geschwindigkeit: 8Wochen/12Wochen  $p=0,002$ , 8Wochen/24Wochen  $p=0,011$ ; Wandabstand: 8Wochen/12Wochen  $p<0,001$ , 8Wochen/24Wochen  $p<0,001$ ) zurückzuführen, nur die Werte des zurückgelegten Weges verfehlten die Grenze der Signifikanz (8Wochen/12Wochen  $p=0,054$ , 8Wochen/24Wochen  $p=0,052$ ). Die 12 und 24 Wochen alten Tiere ( $p>0,1$ ) unterschieden sich in keinem Parameter voneinander. Die Ergebnisse der Akquisitionsphase 1 (Trial 1 – 5) wiesen ein ähnliches Muster auf. Alle Parameter unterschieden sich signifikant voneinander (Zeit, zum Finden aller Pellets ( $F_{2,51}= 30,754$ ,  $p<0,001$ ), Anzahl gefundener Pellets ( $F_{2,51}= 17,741$ ,  $p<0,001$ ), durchschnittliche Geschwindigkeit ( $F_{2,47}= 13,990$ ,  $p<0,001$ ),

zurückgelegter Weg ( $F_{2,47} = 9,547$ ,  $p < 0,001$ ) und Abstand zur Wand ( $F_{2,47} = 17,896$ ,  $p < 0,001$ ).

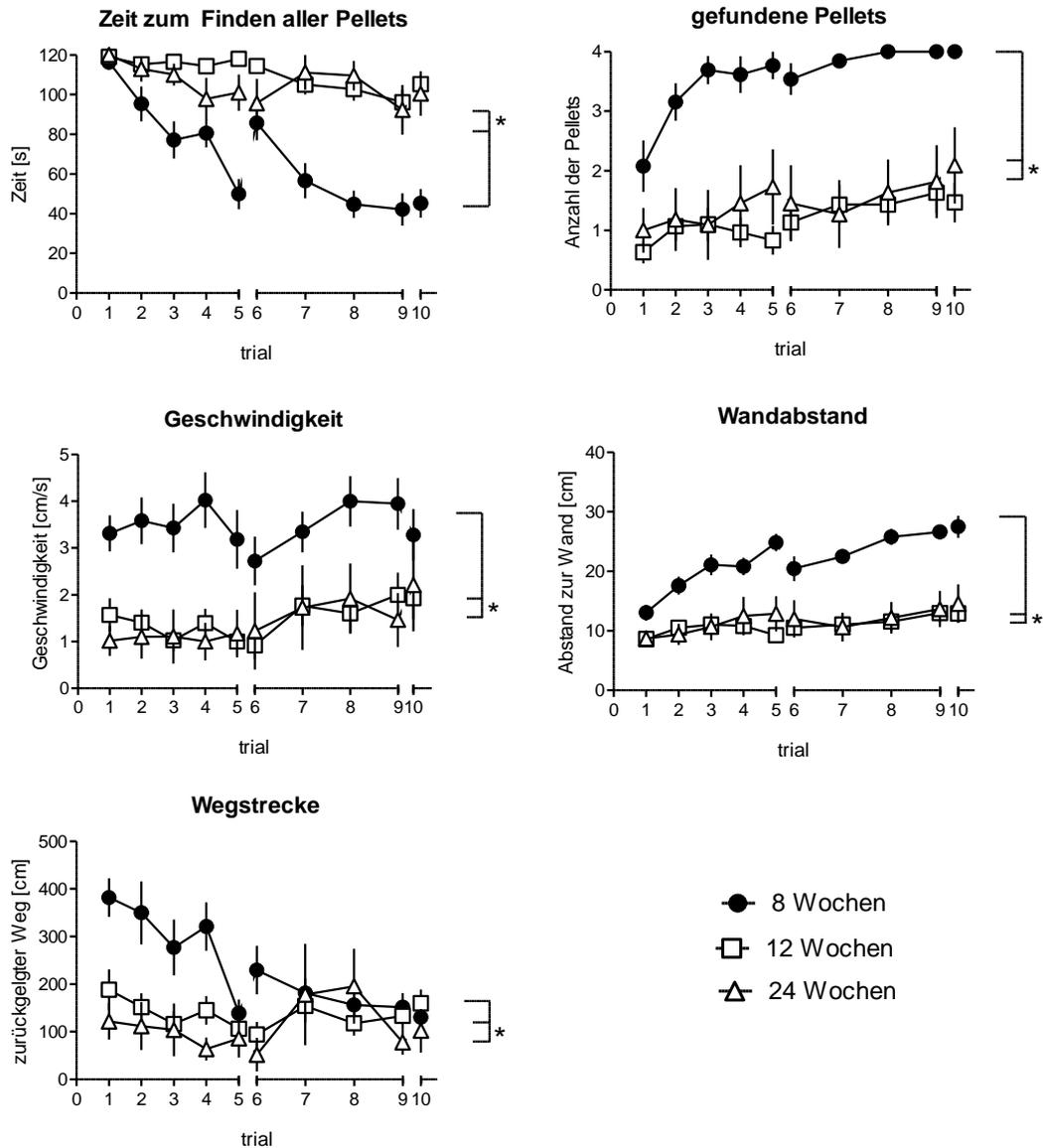


Abbildung 13 Verhaltensparameter der 8, 12 und 24 Wochen alten Tiere über die gesamte Trainingsdauer; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, \* $p < 0,05$ .

Acht Wochen alte Tiere benötigten weniger Zeit zum Finden aller Pellets (oben links), fanden bereits ab dem ersten Durchgang mehr Pellets (oben, rechts), bewegten sich mit einer höheren Geschwindigkeit (Mitte, links) und größerem Abstand zur Wand (Mitte, rechts). Außerdem legten sie über die Dauer des gesamten Trainings eine längere Wegstrecke zurück (unten, links)

Auch die Einzelgruppenvergleiche wiesen, ohne Ausnahme, signifikante Unterschiede zwischen den 8 Wochen alten Tieren im Vergleich zu den 12 und 24 Wochen alten Tieren auf (jeweils  $p \leq 0,001$ ), jedoch unterschieden sich die Gruppen der 12 Wochen und der 24 Wochen alten Tiere nicht.

In der Akquisitionsphase 2 (Trial 6 - 9) konnten nur für die Parameter Zeit zum Finden aller Pellets ( $F_{2,50} = 19,939$ ,  $p < 0,001$ ), Anzahl gefundener Pellets ( $F_{2,51} = 12,371$ ,  $p < 0,001$ ), durchschnittliche Geschwindigkeit ( $F_{2,46} = 5,734$ ,  $p = 0,006$ ) und Abstand zur Wand ( $F_{2,46} = 19,452$ ,  $p < 0,001$ ), nicht aber für den zurückgelegten Weg ( $F_{2,46} = 1,504$ ,  $p = 0,233$ ) signifikante Unterschiede nachgewiesen werden.

Die Einzelgruppenvergleiche zeigten auch hier, dass sich die 8 Wochen alten Tiere von den anderen Versuchsgruppen unterschieden (Zeit und Wandabstand: jeweils  $p < 0,001$ ; gefundene Pellets: jeweils  $p \leq 0,002$ ; Geschwindigkeit: 8Wochen/12Wochen  $p = 0,005$ , 8Wochen/24Wochen  $p = 0,044$ ). Diese Signifikanzen blieben für die Parameter Zeit zum Finden aller Pellets ( $F_{2,53} = 22,191$ ,  $p < 0,001$ ), Anzahl gefundener Pellets ( $F_{2,53} = 10,917$ ,  $p < 0,001$ ) und Abstand zur Wand ( $F_{2,50} = 13,628$ ,  $p < 0,001$ ) erhalten. Es konnten keine Unterschiede in der durchschnittlichen Geschwindigkeit ( $F_{2,50} = 1,295$ ,  $p = 0,283$ ) und dem zurückgelegten Weg ( $F_{2,46} = 1,504$ ,  $p = 0,233$ ) gefunden werden. Auch hier zeigten die Einzelgruppenvergleiche für die 8 Wochen alten Tiere jeweils Unterschiede zu den 12 und 24 Wochen alten Tieren (Zeit und Wandabstand: jeweils  $p < 0,001$ ; gefundene Pellets: 8Wochen/12Wochen  $p < 0,001$ , 8Wochen/24Wochen  $p = 0,017$ ).

Um die Unterschiede in den Lernparametern genauer zu bestimmen wurden außerdem die Fehler analysiert (Abbildung 14), die während des Retentionsdurchgangs (Trial 10) gemacht wurden. Der Besuch eines unbeköderten Loches steht in diesem Lernparadigma für einen Fehler des Referenzgedächtnisses, der wiederholte Besuch eines beköderten Loches innerhalb eines Durchgangs zeigt hingegen einen Fehler des Arbeitsgedächtnisses an. Da die Tiere der verschiedenen Altersstufen einen hohen Aktivitätsunterschied aufwiesen, wurde für die Kalkulation der Fehler ein Index eingeführt. Dieser Index erlaubte uns, die Tiere, die

aufgrund ihrer guten Leistung keine Fehler machten, von den fehlerfreien Tieren, die sich generell nicht bewegten, zu trennen.

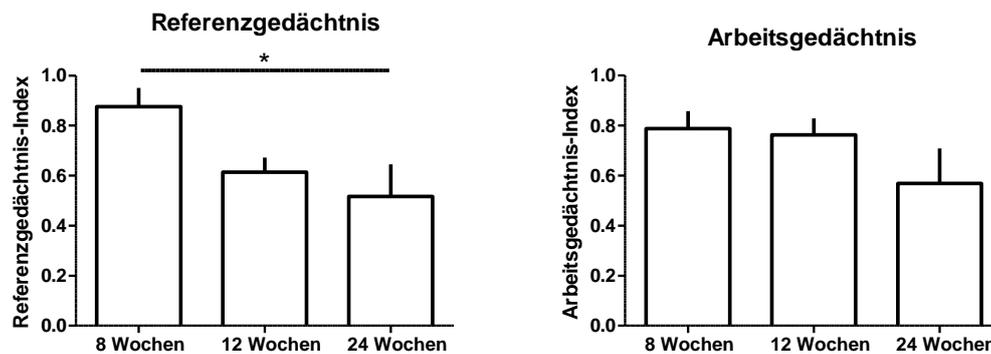


Abbildung 14 Referenz- und Arbeitsgedächtnis-Indizes der 8, 12 und 24 Wochen alten Tiere im Retentionsdurchgang (Trial 10, Tag 3); angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, \* $p < 0,05$ .

Im Retentionsdurchgang wiesen die 8 Wochen alten Tiere ein signifikant besseres Referenzgedächtnis, im Vergleich zu den 24 Wochen alten Tieren, auf. Die Indizes wurden als Quotient der gesamten Lochbesuche und Summe aus Lochbesuchen und entsprechender Fehler kalkuliert.

Auf diese Weise fanden wir einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen für das Referenzgedächtnis ( $F_{2,42}=4,41$ ,  $p=0,019$ ). Die Post-hoc-Tests zeigten, dass die 8 Wochen alten Tiere ein signifikant besseres Referenzgedächtnis aufwiesen, als 24 Wochen alte Tiere ( $p=0,021$ ).

## Hormone

Die Analyse der Estradiol-Konzentrationen (Abbildung 15, obere Reihe) zeigte keinen Trainingseffekt, jedoch einen signifikanten Unterschied der verschiedenen Altersstufen im Hippokampus ( $F_{2,38}=3,76$ ,  $p=0,032$ ) und im Blutserum ( $F_{2,38}=4,77$ ,  $p=0,014$ ), dagegen nicht im PFC ( $F_{2,38}=1,88$ ,  $p > 0,1$ ). Ein Alter x Trainings-Effekt konnte für keine der drei Regionen festgestellt werden. Die Post-hoc-Vergleiche der

einzelnen Altersgruppen zeigten für den Hippokampus, einen signifikant höheren Estradiol-Spiegel in 24 Wochen alten Tieren im Vergleich zu 8 Wochen alten Tieren ( $p=0,012$ ), aber nicht im Vergleich zu 12 Wochen alten Ratten ( $p>0,1$ ). Diese Tiere wiesen nur im PFC eine Tendenz erhöhter Estradiol-Werte im Vergleich zu 8 Wochen alten Tieren ( $p=0,068$ ) auf. Eine höhere Estradiol-Konzentration im Serum 24 Wochen alter Tiere konnte, sowohl im Vergleich zu 12 Wochen alten Tieren ( $p=0,029$ ), als auch zu 8 Wochen alten Tieren ( $p=0,008$ ) nachgewiesen werden. Eine Konzentrationsänderung innerhalb der Altersstufen, unter dem Einfluss des Trainings, konnte in keiner der drei Regionen gezeigt werden.

Die Untersuchung der Testosteron-Konzentrationen (Abbildung 15, mittlere Reihe), zeigte ebenfalls keinen Trainingseffekt, hingegen den Alterseffekt im Hippokampus ( $F_{2,36}=21,93$ ,  $p<0,001$ ) und im PFC ( $F_{2,36}=18,01$ ,  $p<0,001$ ), aber nicht im Serum ( $F_{2,36}=1,86$ ,  $p=0,170$ ). Überraschenderweise konnte außerdem ein Alter x Trainings-Effekt sowohl für den Hippokampus ( $F_{2,36}=5,49$ ,  $p=0,008$ ), als auch den PFC ( $F_{2,36}=6,23$ ,  $p=0,005$ ), aber auch hier nicht für das Serum ( $F_{2,36}=1,15$ ,  $p>0,1$ ), nachgewiesen werden. Mittels der Post-hoc-Vergleiche konnte herausgestellt werden, dass die 24 Wochen alten untrainierten Ratten sowohl im Hippokampus, als auch im Präfrontalen Cortex eine signifikant höhere Testosteron-Konzentration im Vergleich zu 8 Wochen alten untrainierten (jeweils  $p<0,001$ ), 12 Wochen alten untrainierten (jeweils  $p<0,001$ ), als auch 24 Wochen alten trainierten (HC:  $p=0,001$ ; PFC:  $p=0,003$ ) Tieren aufwiesen. Letztere wiederum zeigten außerdem einen signifikanten Unterschied zu ebenfalls trainierten 12 Wochen alten Tieren. Im Serum konnten weder zwischen, noch innerhalb der Altersgruppen Unterschiede dargelegt werden.

Die Änderungen in den Kortikosteron-Konzentrationen (Abbildung 15, untere Reihe) in allen Regionen waren ausschließlich auf die Alterseffekte zurückzuführen: Hippokampus ( $F_{2,32}=8,81$ ,  $p=0,001$ ), PFC ( $F_{2,32}=8,68$ ,  $p=0,001$ ), Serum ( $F_{2,32}=8,20$ ,  $p=0,001$ ). Jedoch zeigte sich im Serum ein tendenzieller Einfluss des Trainings ( $F_{1,32}=3,00$ ,  $p=0,093$ ) auf die Konzentration dieses Steroidhormones. Eine

Interaktion von Alter x Training scheint ebenfalls keinen Effekt zu haben. Die Einzelgruppen-Vergleiche zeigten für das hippokampale und präfrontale Kortikosteron signifikant höhere Werte in 8 Wochen alten untrainierten Tieren, im Vergleich zu 24 Wochen alten untrainierten Tieren (HC:  $p=0,013$ ; PFC:  $p=0,006$ ). Im Serum zeigte sich dagegen ein signifikanter Unterschied in trainierten Tieren. Die 12 Wochen alten Ratten wiesen hier einen höheren Kortikosteron-Spiegel als 24 Wochen alte Tiere ( $p=0,003$ ) auf.

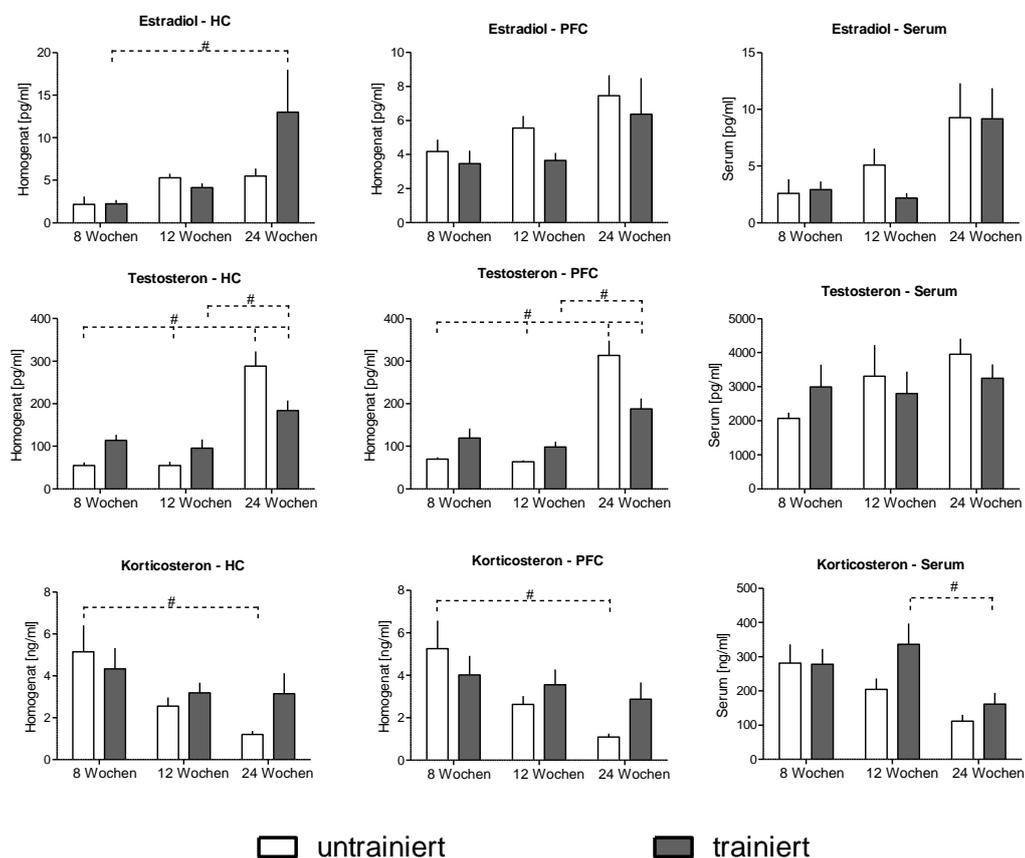


Abbildung 15 Hormonanalysen der 8, 12 und 24 Wochen alten Tiere; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, eingezeichnet sind Signifikanzen der Einzelgruppenvergleiche #  $p<0,05$ . Die Hormonkonzentrationen von Estradiol (obere Reihe), Testosteron (mittlere Reihe) und Kortikosteron (untere Reihe) wurden mittels ELISA bestimmt; PFC: präfrontaler Cortex, HC: Hippokampus

## Genexpression

Die statistische Analyse der relativen Genexpression (Abbildung 16: ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR, BDNF; Abbildung 17: MR, GR, Cyp19) zeigte einen Einfluss des Alters auf ER $\alpha$  ( $F_{2,54}=14,274$ ,  $p<0,001$ ), MR ( $F_{2,54}=3,827$ ,  $p=0,028$ ), Cyp19 ( $F_{2,54}=4,67$ ,  $p=0,013$ ) und BDNF ( $F_{2,54}=18,909$ ,  $p<0,001$ ). Außerdem wurde ein allgemeiner Trainingseffekt für ER $\alpha$  ( $F_{2,54}=6,206$ ,  $p=0,016$ ), AR ( $F_{1,54}=7,115$ ,  $p=0,010$ ), MR ( $F_{1,54}=6,017$ ,  $p=0,017$ ) und BDNF ( $F_{1,54}=16,421$ ,  $p<0,001$ ) errechnet. Auch die Untersuchung des Alter x Training-Effektes ergab signifikante Unterschiede für ER $\alpha$  ( $F_{2,54}=10,162$ ,  $p<0,001$ ), MR ( $F_{2,54}=5,316$ ,  $p=0,008$ ), GR ( $F_{2,54}=5,396$ ,  $p=0,007$ ) und BDNF ( $F_{2,54}=5,13$ ,  $p=0,009$ ).

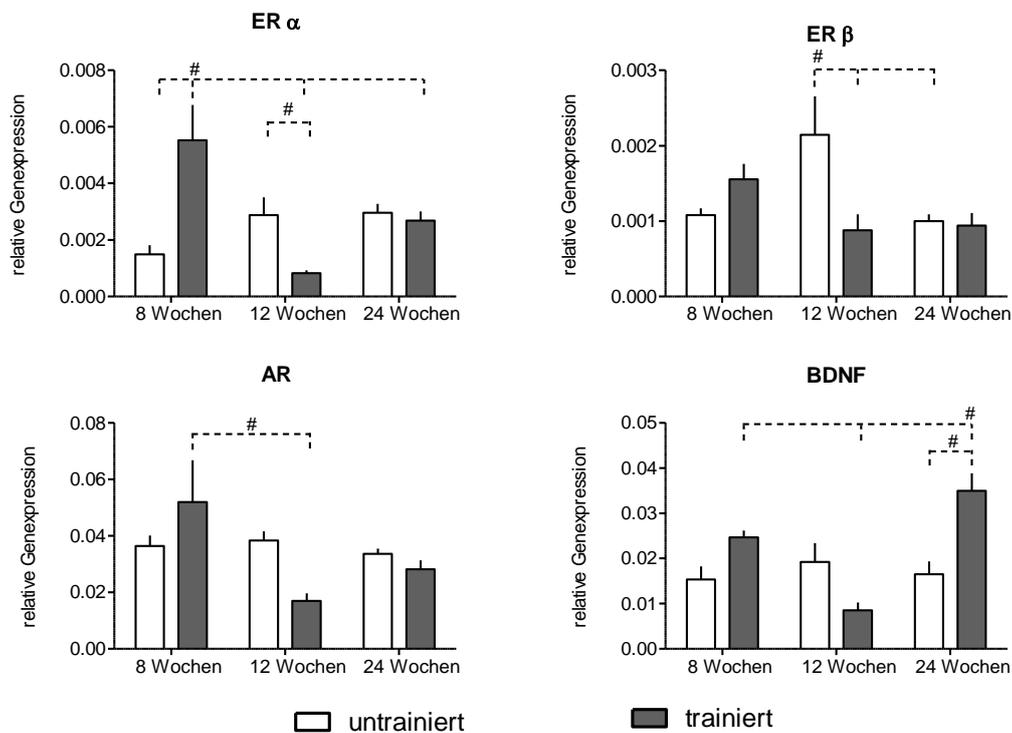


Abbildung 16 relative Genexpression von ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR und BDNF der 8, 12 und 24 Wochen alten Tiere; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, eingezeichnet sind Signifikanz der Einzelgruppenvergleiche # $p<0,05$ . Für die Bestimmung der relativen Genexpression wurde eine quantitative real-time PCR durchgeführt, die Berechnungen wurden mit der „comparative cycle threshold“-Methode der  $C_T$ -Werte durchgeführt.

Die Einzelvergleiche zwischen den Altersgruppen zeigten eine deutlich erhöhte ER $\alpha$ -Expression in den 12 Wochen alten Tieren im Vergleich zu 8 Wochen alten ( $p=0,001$ ) und 24 Wochen alten ( $p<0,001$ ) Ratten, jedoch keine Unterschiede zwischen den 8 Wochen und 24 Wochen alten Tieren. Die Expression von MR war in 8 Wochen alten Tieren signifikant höher, als in 12 Wochen ( $p=0,028$ ), jedoch nicht im Vergleich zu 24 Wochen alten Tieren. Für das Aromatase-Gen Cyp19, sowie das BDNF-Gen wurde eine höhere Expression in 24 Wochen alten Tieren, verglichen zu 12 Wochen (Cyp19: $p=0,016$ ; BDNF:  $p<0,001$ ) alten Tieren bewiesen. Im Vergleich von 24 zu 8 Wochen alten Ratten konnte nur für BDNF ( $p=0,001$ ) ein signifikanter Unterschied belegt werden.

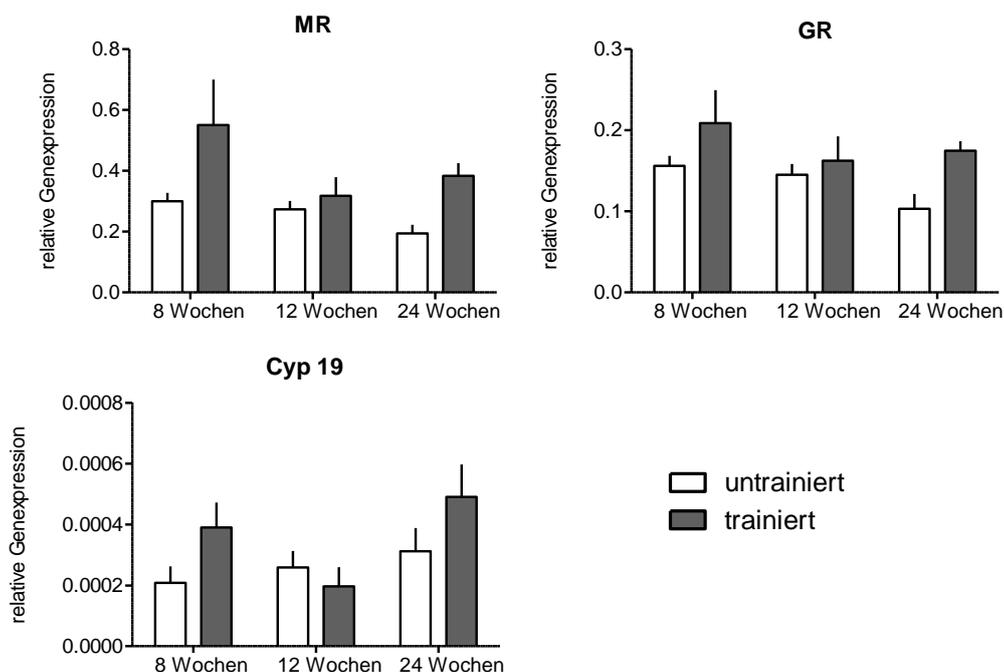


Abbildung 17 relative Genexpression von MR, GR und Cyp 19 der 8, 12 und 24 Wochen alten Tiere; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler. Für die Bestimmung der relative Genexpression wurde eine quantitative real-time PCR durchgeführt, die Berechnungen wurden mit der „comparative cycle threshold“-Methode der  $C_T$ -Werte durchgeführt.

GR, AR und ER $\beta$  zeigten keine altersbedingten Gruppenunterschiede. Ein besonderes Augenmerk sei auf die Expression des Estrogen Rezeptor  $\alpha$  gelegt. Ein

Einzelgruppenvergleich über alle Gruppen, zeigte nicht nur die signifikanten Unterschiede zwischen den trainierten Gruppen (8Wochen/ 12Wochen  $p < 0,001$ ; 8Wochen/24Wochen  $p = 0,007$ ), auch innerhalb der Altersgruppen zeigten sich trainingsbedingte Unterschiede: Sowohl 8, als auch 12 Wochen alte, trainierte Tiere wiesen einen höheren Expressionslevel auf, als ihre entsprechende untrainierte Kontrollgruppe (8Wochen:  $p < 0,001$ ; 12Wochen:  $p = 0,027$ ).

Außerdem konnten die Einzelgruppenvergleiche Unterschiede in der ER $\beta$ -Expression der 12 Wochen alten untrainierten Tiere im Vergleich zu den trainierten Tieren ( $p = 0,005$ ) und auch zu den 24 Wochen alten untrainierten Tieren ( $p = 0,040$ ) offenlegen. Für AR unterschieden sich die 8 Wochen alten Tiere von den 12 Wochen alten Tieren ( $p < 0,001$ ). Und für den Wachstumsfaktor BDNF konnte nachgewiesen werden, dass sich die Expression in den 12 Wochen alten trainierten Tieren von den 8 Wochen alten ( $p = 0,034$ ) und den 24 Wochen alten ( $p < 0,001$ ) Tieren unterscheidet. Sowie, dass sich die 24 Wochen alten Tiere von ihrer Kontrollgruppe signifikant unterscheiden ( $p = 0,001$ ).

### **Korrelation: Verhaltensparameter – Genexpression und Hormonkonzentration**

Für die Korrelation der Verhaltensparameter, mit den Gen- und Hormondaten, wurde zuerst eine Hauptkomponentenanalyse der Verhaltensparameter durchgeführt (Tabelle 1). Hierbei wurden die Zeit zum Finden aller Pellets, die gefundenen Pellets und der Abstand zur Wand einer gemeinsamen Komponente zugeteilt. Diese definierten wir als Motivations-Komponente. Die Parameter Geschwindigkeit und Wegstrecke wurden einer zweiten Komponente, im Weiteren als Emotions-Komponente bezeichnet, zugeteilt. Die beiden Gedächtnisindizes bilden die dritte Komponente, diese wird als kognitive Komponente bestimmt.

	3 Komponenten (89.1%)		
	1 (38.1%)	2 (26.6%)	3(24.4%)
Zeit zum Finden aller Pellets	<b>-0.85</b>	-0.27	-0.15
gefundene Pellets	<b>0.84</b>	0.35	0.19
Geschwindigkeit	0.47	<b>0.84</b>	0.15
Wegstrecke	0.10	<b>0.96</b>	0.13
Wandabstand	<b>0.88</b>	0.06	0.28
Referenzgedächtnisindex	0.48	0.16	<b>0.81</b>
Arbeitsgedächtnisindex	0.10	0.20	<b>0.94</b>

Tabelle 1 Hauptkomponentenanalyse der Verhaltensparameter; die Daten der Matrix wurden mittels Varimax Rotationsmethode analysiert; fehlende Werte wurden durch Mittelwerte ersetzt; angegeben ist die Verteilung der Parameter auf die Komponenten; Werte in Klammern geben die Prozente der Gesamtvarianz an.

In die anschließende multiple lineare Regression gingen die Ladungsindizes der Individuen mit der relativen Genexpression und den Hormonkonzentrationen ein (Tabelle 2). Es konnte sowohl ER $\alpha$  ( $p=0,001$ ), als auch AR ( $p=0,007$ ) mit der Motivations-Komponente korreliert werden. Die hippokampalen Konzentrationen von Testosteron und Estradiol verfehlten die Signifikanzgrenze des Goodness-of-fit-Tests, dennoch zeigen beide Steroidhormone eine Tendenz zur Korrelation mit der Emotions-Komponente.

Verhalten	Model Goodness-of-fit	Komponente 1 (Motivation)	Komponente 2 (Emotion)	Komponente 3 (Kognition)
ER $\alpha$ ( <i>Esr1</i> )	$F_{3,50} = 4.41,$ $p = 0.008$	$p = 0.001$ Beta = 0.453		
ER $\beta$ ( <i>Esr2</i> )				
AR ( <i>Ar</i> )	$F_{3,50} = 3.49,$ $p = 0.022$	$p = 0.007$ Beta = 0.365		
MR ( <i>Nr3c2</i> )				
GR ( <i>Nr3c1</i> )				
Aromatase ( <i>Cyp19</i> )				
BDNF ( <i>Bdnf</i> )				
Kortikosteron HC				
Kortikosteron PFC				
Kortikosteron Serum				
Testosteron HC	$F_{3,50} = 2.68,$ $p = 0.057$		$p = 0.050$ Beta = 0.264	$p = 0.058$ Beta = -0.255
Testosteron PFC				
Testosteron Serum				
Estradiol HC	$F_{3,50} = 2.54,$ $p = 0.067$		$p = 0.033$ Beta = 0.288	
Estradiol PFC				
Estradiol Serum				

Tabelle 2 Korrelation der Gen- und Hormondaten mit den zuvor definierten Komponenten; die Daten wurden mittels einer Multiplen linearen Regression (SPSS vers. 20) analysiert; fehlende Werte wurden durch Mittelwerte ersetzt; Komponenten wurden als unabhängige Variable geführt; Ergebnisse mit  $p > 0.05 < 0.1$  sind kursiv angegeben; PFC: präfrontaler Cortex, HC: Hippokampus

## Gewichte

Für diesen Teil der Studie ergab die statistische Auswertung über die Körpergewichte der Tiere (Abbildung 18) signifikante Unterschiede für einen Alterseffekt am Habituationstag ( $F_{2,82} = 5,176, p = 0,008$ ) und ersten Trainingstag ( $F_{2,87} = 4,515, p = 0,015$ ). Ein Post-Hoc-Test für das Alter, unabhängig vom Trainingszustand der Tiere, zeigte signifikante Unterschiede am Habituationstag (8Wochen/12Wochen:  $p = 0,001$ ; 12Wochen/24Wochen:  $p = 0,036$ ) und an Trainingstag 1 (8Wochen/12Wochen:  $p = 0,011$ ; 12Wochen/24Wochen:  $p = 0,021$ ). Der Einzelgruppenvergleich zeigte anschließend, dass die signifikanten Unterschiede am Habituationstag ( $F_{5,82} = 4,131, p = 0,002$ ) und am ersten Trainingstag ( $F_{5,87} =$

5,430,  $p < 0,001$ ) auf unterschiedliche Körpergewichte der 8 Wochen alten trainierten Tiere im Vergleich zu den 12 Wochen alten Tieren ( $p = 0,02$ ;  $p = 0,012$ ) zurückzuführen waren. Die Unterschiede am zweiten Trainingstag ( $F_{5,79} = 3,177$ ,  $p = 0,012$ ) beschränkten sich auf die untrainierten 12 Wochen alten Kontrolltiere, im Vergleich zur 24 Wochen alten, untrainierten Kontrollgruppe.

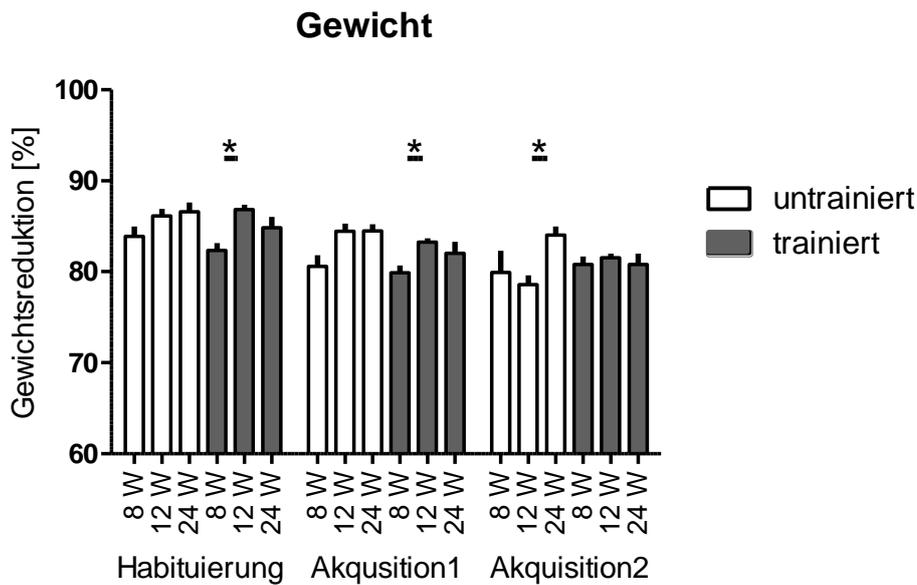


Abbildung 18 Angaben der Gewichtsreduktion in Prozent als Anteil des Ausgangsgewichtes; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler; eingezeichnet sind Signifikanzen der Einzelgruppenvergleiche  $*p < 0,05$ .

## Unterschiede in der Genexpression in Abhängigkeit vom Lernverhalten

Im Rahmen der einzelnen Versuche deuteten sich Unterschiede im Lernverhalten der Tiere an. So schienen sich die trainierten Kontrolltiere des ersten Versuchsteils, welche eine einmalige i.c.v. Injektion von 40% Propandiol erhielten, von einer weiteren Kontrollgruppe, welche keinerlei Behandlung erfuhr, zu unterscheiden. In vorangegangenen Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass die Injektion von

40% Propandiol keinen Einfluss auf das Verhalten, sowie die Genexpression, oder die hier relevanten Hormonkonzentrationen hat. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung werden im Folgenden gezeigt, wobei die Kontrollgruppe des ersten Versuchsteils als ‚gute Lerner‘, die Kontrolltiere des anderen Versuchs als ‚schlechte Lerner‘, berücksichtigt werden.

## Verhalten

Die Auswertung der Verhaltensparameter (Abbildung 19) zeigte für die Geschwindigkeit, mit der sich die Tiere auf dem Holeboard bewegten, keinen signifikanten Unterschied.

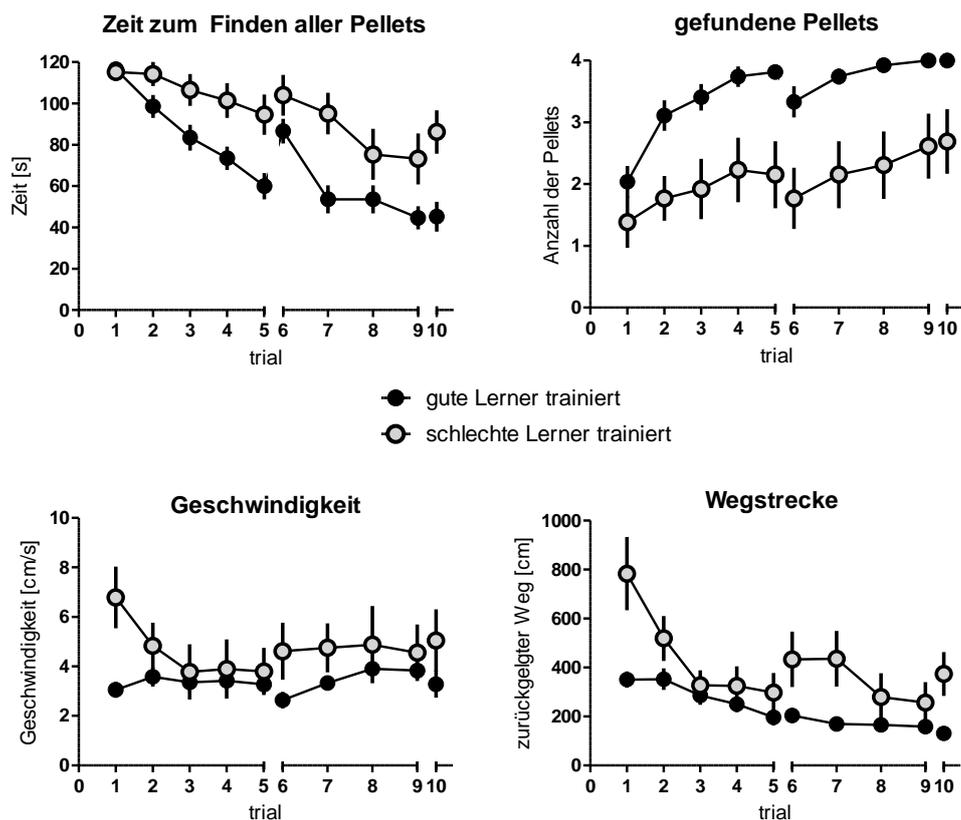


Abbildung 19 Verhaltensparameter der guten und schlechten Lerner über die gesamte Trainingsdauer; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler. Die guten Lerner benötigten weniger Zeit zum Finden aller Pellets (oben links), fanden durchschnittlich mehr Pellets (oben, rechts), bewegten sich nicht signifikant schneller (Mitte, links); legten aber über die Dauer des gesamten Trainings eine kürzere Wegstrecke zurück (unten, links)

Dies gilt sowohl für die durchschnittliche Geschwindigkeit über den gesamten Lernvorgang ( $F_{1,23}=1,747$ ,  $p=0,199$ ), als auch für die einzelnen Abschnitte (Akquisition 1:  $F_{1,24}=1,182$ ,  $p=0,288$ ; Akquisition 2:  $F_{1,24}=0,948$ ,  $p=0,340$ ; Retentionsdurchgang:  $F_{1,24}=1,564$ ,  $p=0,224$ ). Signifikante Unterschiede zeigten sich dagegen für die Zeit zum Finden aller Pellets (über alle 10 Trials:  $F_{1,24}=9,777$ ,  $p=0,005$ ; Akquisition 1:  $F_{1,24}=10,202$ ,  $p=0,004$ ; Akquisition 2:  $F_{1,24}=6,794$ ,  $p=0,015$ ; Retentionsdurchgang:  $F_{1,25}=10,292$ ,  $p=0,004$ ), die Anzahl der gefundenen Pellets (über alle 10 Trials:  $F_{1,24}=11,200$ ,  $p=0,003$ ; Akquisition 1:  $F_{1,24}=8,252$ ,  $p=0,008$ ; Akquisition 2:  $F_{1,24}=10,376$ ,  $p=0,004$ ; Retentionsdurchgang:  $F_{1,25}=6,237$ ,  $p=0,020$ ) und auch mit leichten Einschränkungen für die zurückgelegte Wegstrecke (über alle 10 Trials:  $F_{1,23}=6,818$ ,  $p=0,016$ ; Akquisition 1:  $F_{1,24}=4,533$ ,  $p=0,044$ ; Akquisition 2:  $F_{1,24}=3,014$ ,  $p=0,095$ ; Retentionsdurchgang:  $F_{1,24}=6,247$ ,  $p=0,020$ ).

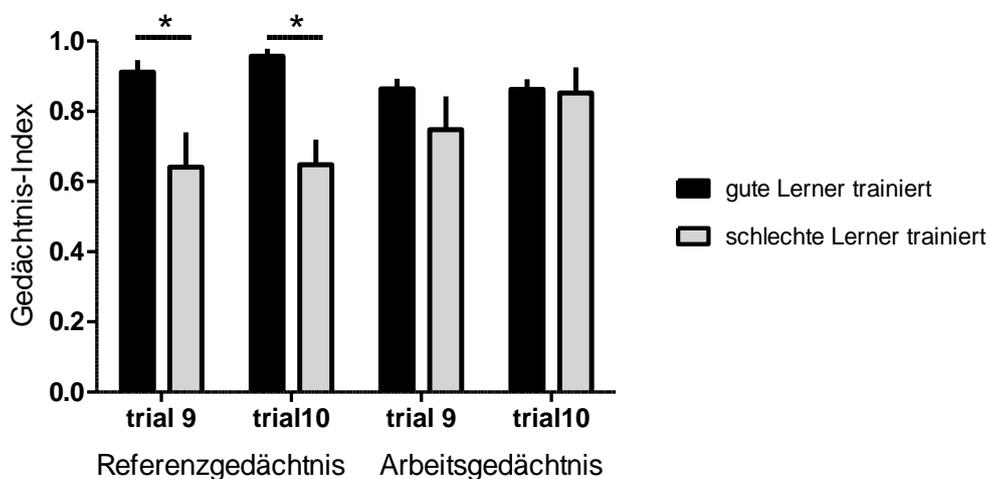


Abbildung 20 Referenz- und Arbeitsgedächtnis-Indizes der guten und schlechten Lerner für den letzten Teil der Akquisitionsphase 2 (Trial 9, Tag 2) und den Retentionsdurchgang (Trial 10, Tag 3); angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler,  $*p<0,05$ .

In beiden Trials wiesen die guten Lerner ein signifikant besseres Referenzgedächtnis, im Vergleich zu den schlechten Lernern, auf. Die Indizes wurden als Quotient der gesamten Lochbesuche durch die Summe der Lochbesuche und entsprechenden Fehler kalkuliert.

Desweiteren wurden die Lernparameter, Referenz- und Arbeitsgedächtnis (Abbildung 20), untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Tiere in beiden untersuchten Zeitpunkten, dem letzten Durchgang der Akquisition 2 (Trial 9), sowie dem Retentionsdurchgang (Trial 10), signifikant in ihrem Referenz-, also dem Langzeitgedächtnis, unterschieden (Trial 9:  $U=33$ ,  $p=0,022$ ; Trial 10:  $U=16$ ,  $p=0,001$ ). Für das Arbeitsgedächtnis konnten hingegen keine Unterschiede nachgewiesen werden (Trial 9:  $U=57$ ,  $p=0,393$ ; Trial 10:  $U=55$ ,  $p=0,361$ ).

### **Genexpression**

Die statistische Auswertung der relativen Genexpression umfasst die m-RNA-Level der Steroidrezeptoren  $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ , AR, GR und MR (Abbildung 21). Es konnte ein signifikanter Unterschied für den Estrogen Rezeptor  $\alpha$  ( $F_{3,45}=5,621$ ,  $p=0,002$ ), den Glukocortikoidrezeptor ( $F_{3,45}=3,830$ ,  $p=0,017$ ), sowie den Mineralokortikoidrezeptor ( $F_{3,45}=9,726$ ,  $p<0,001$ ) ermittelt werden. Der Einzelgruppenvergleich zeigte für alle drei Rezeptoren einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden trainierten Gruppen ( $ER\alpha$ :  $p=0,002$ ; GR:  $p=0,038$ ; MR:  $p<0,001$ ). Für  $ER\alpha$  konnte desweiteren ein signifikanter Unterschied zwischen den guten Lernen und deren Kontrollgruppe ( $p=0,012$ ) nachgewiesen werden. Die relative Genexpression des Mineralokortikoidrezeptors unterschied sich zudem in den untrainierten Kontrollgruppen ( $p=0,033$ ).

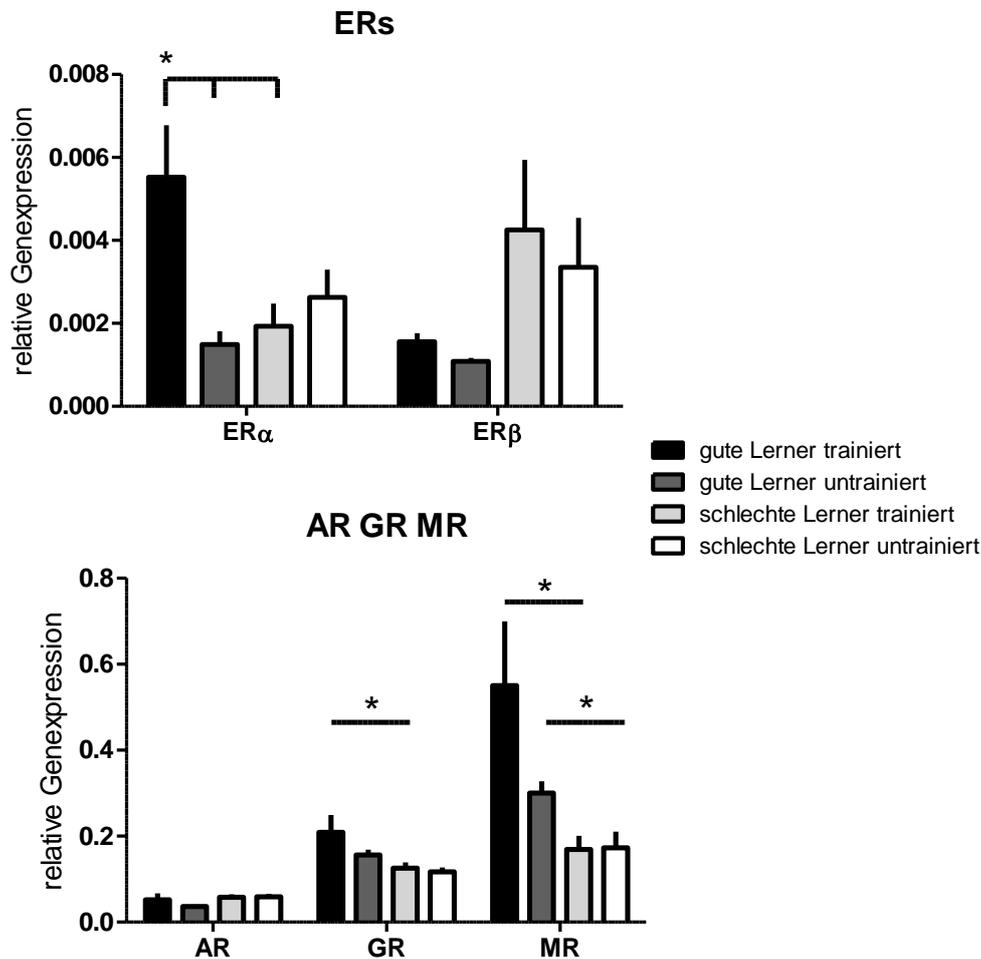


Abbildung 21 relative Genexpression von ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR, GR und MR der guten und schlechten Lerner, sowie ihrer untrainierten Kontrollgruppen; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, eingezeichnet sind Signifikanzen der Einzelgruppenvergleiche \* $p < 0,05$ .

Für die Bestimmung der relativen Genexpression wurde eine quantitative real-time PCR, die Berechnungen wurden mit der „comparative cycle threshold“-Methode der  $C_T$ -Werte durchgeführt.

## Gewichte

Um die Vergleichbarkeit der Daten abzusichern, wurde desweiteren die Gewichtsreduktion der einzelnen Versuchsgruppen statistisch untersucht (Abbildung 22). Hierbei ergab sich lediglich für die Habituation vor dem Training ein signifikanter Unterschied zwischen den untrainierten Kontrollgruppen (ANOVA:  $F_{3,48}=6,264$ ,  $p=0,001$ ; Tukey:  $p=0,003$ ).

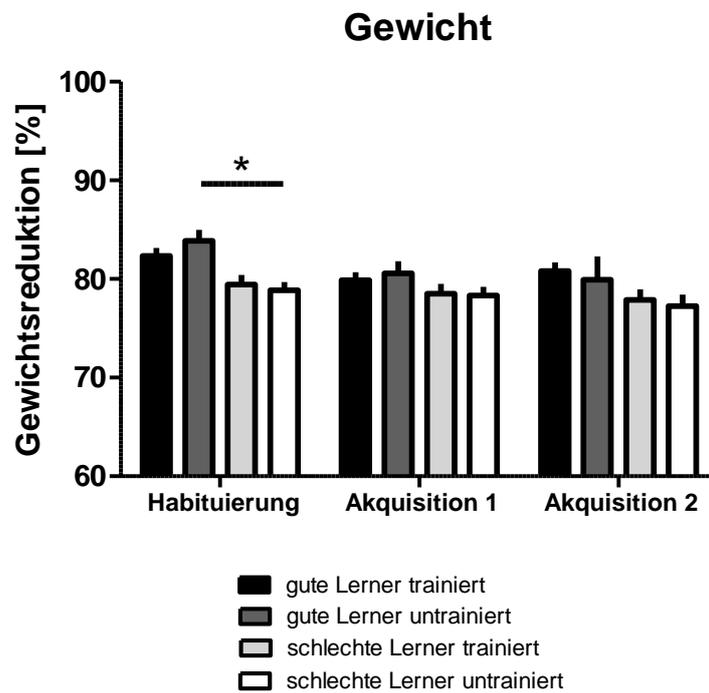


Abbildung 22 Angaben der Gewichtsreduktion in Prozent, als Anteil des Ausgangsgewichtes; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler; eingezeichnet sind Signifikanzen der Einzelgruppenvergleiche  $*p < 0,05$ .

### **Einfluss des ER $\alpha$ -Antagonisten MPP auf das räumliche Lernen, die Expression verschiedener Gene und Steroidhormonkonzentrationen in 8 Wochen alten, männlichen Wistar Ratten**

#### **Verhalten**

Wir analysierten für diesen Teil der Studie, zusätzlich zu den drei verschiedenen Verhaltensparametern (Zeit zum Finden aller Pellets, die mittlere Geschwindigkeit und die Anzahl der gefundenen Pellets), auch die durchschnittlichen Dips pro Sekunde (Abbildung 23). Dieser Parameter konnte uns einen tieferen Einblick in die verschiedenen Lernstrategien verschaffen. Die Berechnungen wurden für diesen

Teil der Studie einerseits über alle 10 Durchgänge durchgeführt und andererseits, um die verschiedenen Stufen des Lernprozesses (Akquisition 1; Akquisition 2; Retentionsdurchgang) genauer zu untersuchen, statistisch einzeln ausgewertet.

Für die MPP-behandelten Tiere fanden wir für alle vier Parameter signifikante Unterschiede (Zeit zum Finden aller Pellets:  $F_{4, 69} = 5,808$ ,  $p < 0,001$ ; durchschnittliche Geschwindigkeit:  $F_{4, 69} = 5,185$ ,  $p = 0,001$ ; gefundene Pellets:  $F_{4, 69} = 3,851$ ,  $p = 0,007$ ; Dips pro Sekunde:  $F_{4, 61} = 4,368$ ,  $p = 0,004$ ).

Ein ähnliches Ergebnis konnte für die erste Akquisitionsphase dokumentiert werden. Alle Parameter unterschieden sich für die MPP-behandelten Ratten (Zeit zum Finden aller Pellets:  $F_{4, 69} = 5,565$ ,  $p = 0,001$ ; durchschnittliche Geschwindigkeit:  $F_{4, 69} = 8,766$ ,  $p < 0,001$ ; gefundene Pellets:  $F_{4, 69} = 5,649$ ,  $p = 0,001$ ; Dips pro Sekunde:  $F_{4, 61} = 5,957$ ,  $p < 0,001$ ). Diese relativ offensichtlichen Unterschiede verminderten sich in der zweiten Akquisitionsphase am zweiten Tag. Hier konnte nur noch ein signifikanter Unterschied in der Zeit zum Finden aller Pellets ( $F_{4, 69} = 5,210$ ,  $p = 0,001$ ) und den Dips pro Sekunde ( $F_{4, 61} = 5,556$ ,  $p = 0,048$ ) nachgewiesen werden, die Anzahl der gefundenen Pellets erreichte nicht mehr die Signifikanz-Grenze ( $F_{4, 69} = 2,470$ ,  $p = 0,053$ ), und auch für die Geschwindigkeit konnte kein Unterschied mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten die MPP-behandelten Tiere im Retentionsdurchgang den signifikanten Unterschied in der Geschwindigkeit ( $F_{4, 69} = 2,957$ ,  $p = 0,026$ ) erneut und behielten die Unterschiede zwischen den Gruppen für die Zeit zum Finden aller Pellets ( $F_{4, 69} = 4,141$ ,  $p = 0,005$ ) und die Dips pro Sekunde ( $F_{4, 61} = 3,821$ ,  $p = 0,008$ ) bei.

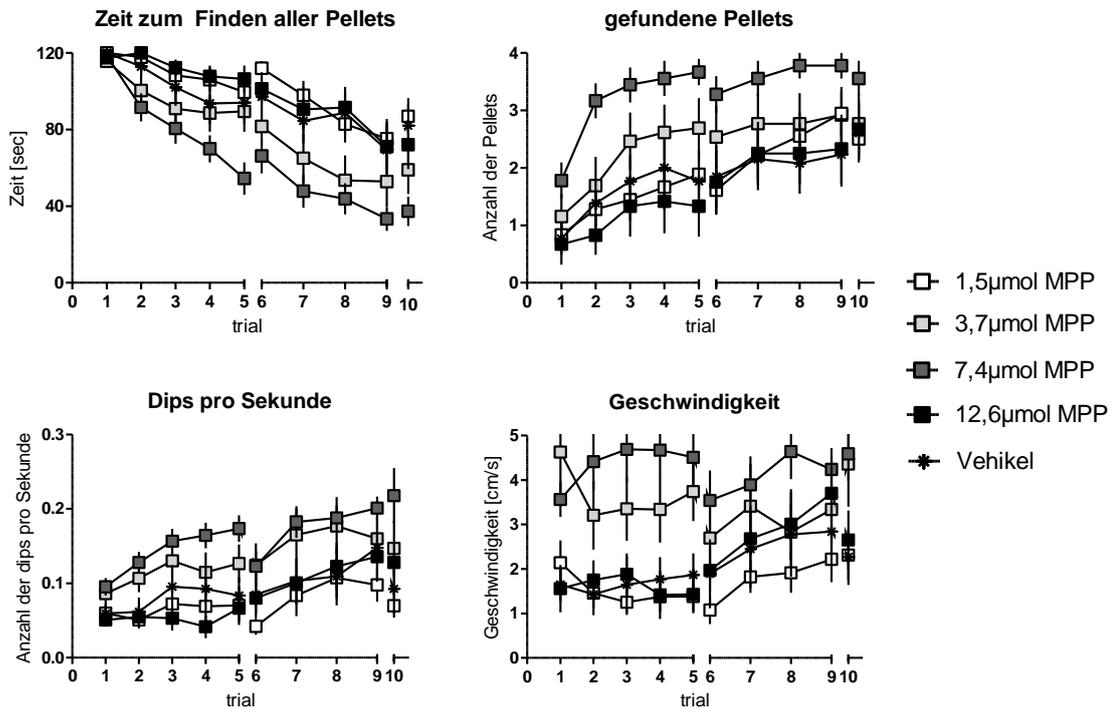


Abbildung 23 Verhaltensparameter der Tiere, die mit MPP behandelt wurden, über die gesamte Trainingsdauer; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler. Tiere, denen 7,4 µmol MPP injiziert wurde, benötigten weniger Zeit zum Finden aller Pellets (oben links), fanden mehr Pellets (oben, rechts), besuchten durchschnittlich mehr Löcher (unten, links) und bewegten sich mit einer höheren Geschwindigkeit (unten, rechts).

Der Post-hoc-Test zum Vergleich der einzelnen Gruppen, konnte die Tiere, die mit 7,4 µmol MPP behandelt worden, als die Tiere identifizieren, welche die kürzeste Latenz, die höchste Geschwindigkeit und die meisten gefundenen Pellets aufwiesen. Außerdem zeigten sie auch die höchste Anzahl von Dips in der Sekunde. Diese Tiere zeigten signifikante Unterschiede in allen Parametern, im Vergleich zu den Tieren, die mit 1,5 µmol MPP, 12,6 µmol MPP oder Vehikel (H<sub>2</sub>O, ausgenommen Dips pro Sekunde) behandelt worden waren.

Zusätzlich zu diesen Verhaltensparametern, wurden auch hier die Lernparameter, also die Fehler des Arbeits- und Referenzgedächtnisses der Tiere (Abbildung 24), für das Ende der Akquisitionsphase (Trial 9) und den Retentionsdurchgang untersucht.

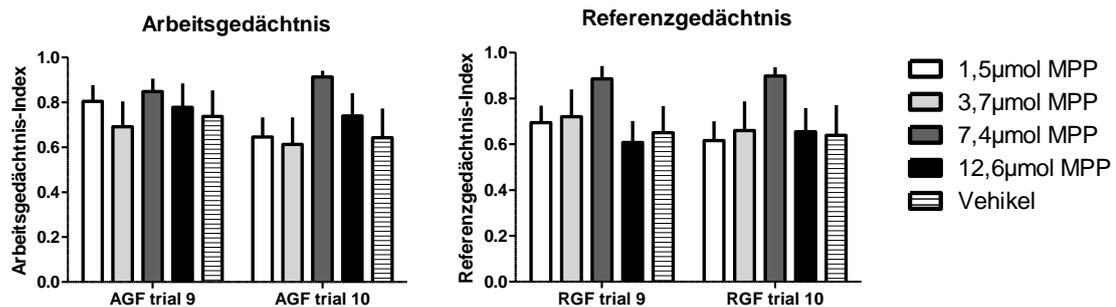


Abbildung 24 Referenz- und Arbeitsgedächtnis-Indizes der MPP behandelten Tiere im letzten Durchgang des zweiten Trainingstages (Trial 9) und des Retentionsdurchgangs (Trial 10, Tag 3); angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, \* $p < 0,05$ .

Die Indizes wurden als Quotient der gesamten Lochbesuche durch die Summe der Lochbesuche und entsprechenden Fehler kalkuliert.

Die subchronische Injektion von MPP führte zu einem signifikanten Unterschied im Referenzgedächtnis im neunten Durchgang ( $\chi^2 = 9,746$ ,  $p = 0,045$ ). Der Einzelgruppen- Vergleich zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zur entsprechenden Vehikel-Gruppe. Im Retentionsdurchgang (Trial 10) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen identifiziert werden.

## Hormone

Für die verschiedenen MPP-Gruppen konnten signifikante Unterschiede der Kortikosteron-Konzentrationen im Hippokampus ( $F_{5, 48} = 3,268$ ,  $p = 0,014$ ) und Präfrontalen Cortex ( $F_{5, 49} = 2,944$ ,  $p = 0,022$ ), aber nicht im Serum ( $F_{5, 43} = 1,125$ ,  $p =$



## Genexpression

Die statistische Auswertung der MPP behandelten Gruppen zeigte signifikante Unterschiede für alle Gene (ER $\alpha$ :  $F_{5, 54} = 6,509$ ,  $p < 0,001$ ; ER $\beta$ :  $F_{5, 54} = 2,852$ ,  $p = 0,024$ ; AR:  $F_{5, 54} = 7,567$ ,  $p < 0,001$ ; MR:  $F_{5, 54} = 28,802$ ,  $p < 0,001$ ; GR:  $F_{5, 54} = 11,714$ ,  $p < 0,001$ ; BDNF:  $F_{5, 54} = 11,805$ ,  $p < 0,001$ ), mit Ausnahme des Aromatase-Gens CYP19 ( $F_{5, 54} = 1,642$ ,  $p = 1,670$ )(Abbildung 26). Der Vergleich der einzelnen Gruppen zeigte, dass in der relativen Genexpression ebenfalls die Tiere, die mit 7,4 $\mu$ mol behandelt wurden, eine besondere Rolle spielen. Für ER $\alpha$  zeigten die 7,4 $\mu$ mol MPP-behandelten Tiere eine signifikant niedrigere relative Genexpression als die Tiere, die mit 1,5 $\mu$ mol MPP ( $p = 0,008$ ), 3,7 $\mu$ mol MPP ( $p = 0,017$ ) und Vehikel ( $p = 0,004$ ) behandelt wurden, sowie im Vergleich zu den untrainierten Vehikel-behandelten Kontrollratten ( $p = 0,002$ ). Weiterhin wiesen die Tiere, denen MPP mit einer Konzentration von 12,6 $\mu$ mol verabreicht wurde, ein signifikant niedrigeres ER $\alpha$  RNA-Niveau auf, als Vehikel behandelte trainierte ( $p = 0,036$ ) und untrainierte ( $p = 0,014$ ) Tiere.

Die relative Genexpression von ER $\beta$  unterscheidet sich deutlich in der 7,4 $\mu$ mol MPP-behandelten Gruppe im Vergleich zu den untrainierten Vehikel-behandelten Ratten ( $p = 0,043$ ). Das Expressionsmuster des Androgen-Rezeptors ist ähnlich dem von ER $\alpha$  (7,4 $\mu$ mol/1,5 $\mu$ mol:  $p = 0,011$ ; 7,4 $\mu$ mol/3,7 $\mu$ mol:  $p = 0,042$ ; 7,4 $\mu$ mol/Vehikel:  $p < 0,001$ ; 7,4 $\mu$ mol/untrainiert Vehikel:  $p = 0,013$ ; 12,6 $\mu$ mol/Vehikel:  $p = 0,001$ ; 12,6 $\mu$ mol/untrainiert Vehikel:  $p = 0,015$ ). Zusätzlich zeigte die 12,6 $\mu$ mol MPP Gruppe einen Unterschied in der AR Expression, im Vergleich zu den mit 1,5 $\mu$ mol MPP-behandelten Tieren ( $p = 0,017$ ).

Der Mineralokortikoid-Rezeptor zeigte die zahlreichsten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Die Tiere, die mit 7,4 $\mu$ mol MPP behandelt wurden, wiesen eine signifikant niedrigere MR Expression auf, als alle anderen Gruppen (7,4 $\mu$ mol/1,5 $\mu$ mol:  $p < 0,001$ ; 7,4 $\mu$ mol/3,7 $\mu$ mol:  $p < 0,001$ ; 7,4 $\mu$ mol/12,6 $\mu$ mol:  $p < 0,001$ ; 7,4 $\mu$ mol / Vehikel:  $p < 0,001$ ; 7,4 $\mu$ mol/untrainiert Vehikel:  $p < 0,001$ ). Darüber hinaus unterschied sich die 3,4 $\mu$ mol MPP-Gruppe deutlich von der 1,5 $\mu$ mol

MPP-Gruppe ( $p = 0,030$ ), sowie von der Vehikel-behandelten trainierten ( $p = 0,005$ ) und untrainierten ( $p = 0,028$ ) Kontrollgruppe. Für BDNF und den Glukokortikoid-Rezeptor konnte das gleiche Genexpressionsmuster festgestellt werden.

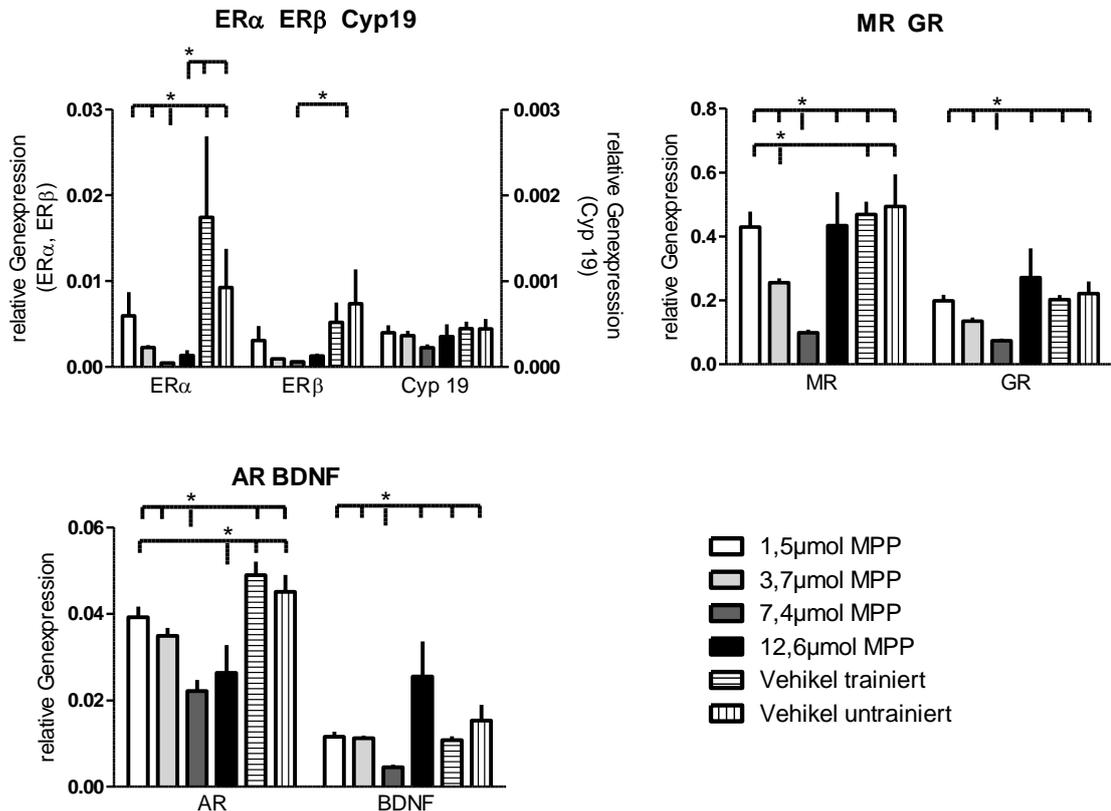


Abbildung 26 relative Genexpression der MPP behandelten Tiere; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler; eingezeichnet sind Signifikanzen der Einzelgruppenvergleiche  $*p < 0,05$ .

Für die Bestimmung der relative Genexpression wurde eine quantitative real-time PCR durchgeführt, die Berechnungen wurden mit der „comparative cycle threshold“-Methode der  $C_T$ -Werte durchgeführt.

In beiden Analysen wies die Gruppe, deren Tiere mit 7,4 $\mu$ mol MPP behandelt wurden, signifikant niedrigere RNA-Level auf, als die 1,5 $\mu$ mol MPP (jeweils:  $p < 0,001$ ); 3,7 $\mu$ mol MPP (BDNF:  $p < 0,001$ ; GR:  $p = 0,005$ ); 12,6 $\mu$ mol MPP (jeweils:  $p < 0,001$ ), sowie die Vehikel trainierte (jeweils:  $p < 0,001$ ) und Vehikel untrainierte

(jeweils:  $p < 0,001$ ) Gruppe. Wie oben erwähnt, zeigten die TPBM-behandelten Tiere keine Unterschiede in der relativen Genexpression aller Gene.

## Gewichte

Die Körpergewichte der MPP injizierten Tiere und deren Kontrollgruppen (Abbildung 27) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Habituation:  $F_{5;83} = 1,449$ ,  $p = 0,216$ ; Trainingstag 1:  $F_{5;83} = 1,053$ ,  $p = 0,393$ ; Trainingstag 2:  $F_{5;83} = 0,472$ ,  $p = 0,796$ ).

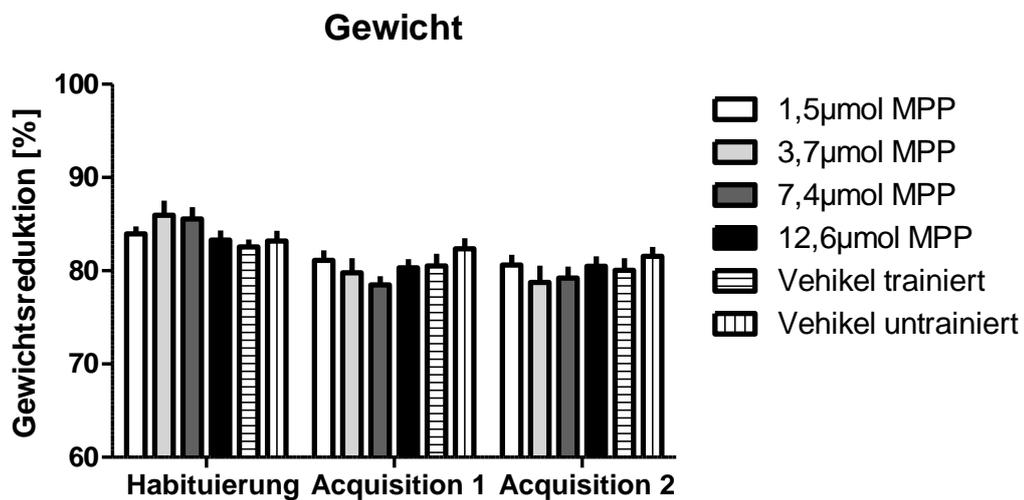


Abbildung 27 Angaben der Gewichtsreduktion der MPP behandelten Tiere in Prozent als Anteil des Ausgangsgewichtes; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler; keine signifikanten Unterschiede in den Einzelgruppenvergleichen  $*p < 0,05$ .

## **Einfluss des ER $\alpha$ -Antagonisten MPP auf die lokomotorische Aktivität, sowie das Explorations- und Angstverhalten in 8 Wochen alten, männlichen Wistar Ratten**

Im Versuchsteil 2 konnten signifikante Unterschiede in der Latenzzeit zum Finden aller Pellets zwischen den Vehikel-behandelten Kontrolltieren und den, mit einer MPP-Konzentration von 7,4 $\mu$ mol, behandelten Tieren nachgewiesen werden. Somit ergab sich die Frage, ob die MPP-behandelten Tiere schneller lernen, oder die Lernaufgabe aufgrund erhöhter Allgemeinaktivität schneller absolvieren? Hierfür wurden zwei verschiedene Verhaltensversuche durchgeführt. Zum Einen, der Open-Field-Test, in dem das Explorationsverhalten und Unterschiede in der lokomotorischen Aktivität der Tiere untersucht werden; und zum Anderen der Plus-Maze-Test, als Standardanalyse des Angstverhaltens von Versuchstieren.

In beiden Tests konnten keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen innerhalb der jeweiligen Trials nachgewiesen werden. Zwischen den beiden Versuchstagen ergaben sich dagegen verschiedene, signifikante Änderungen (Abbildung 28). Dies gilt (ausgenommen der Geschwindigkeit im Wandbereich;  $p=0,396$ ) für alle Parameter des Open-Field-Tests ( $p \leq 0,002$ ); sowie für die Aufenthaltsdauer und die Wegstrecke der einzelnen Kompartimente des elevated Plus-Maze ( $p \leq 0,042$ ). Für die durchschnittliche Geschwindigkeit, mit der sich die Tiere im Plus-Maze bewegten, konnte nur im offenen Arm eine signifikante Reduktion am zweiten Tag ( $p = 0,003$ ) nachgewiesen werden.

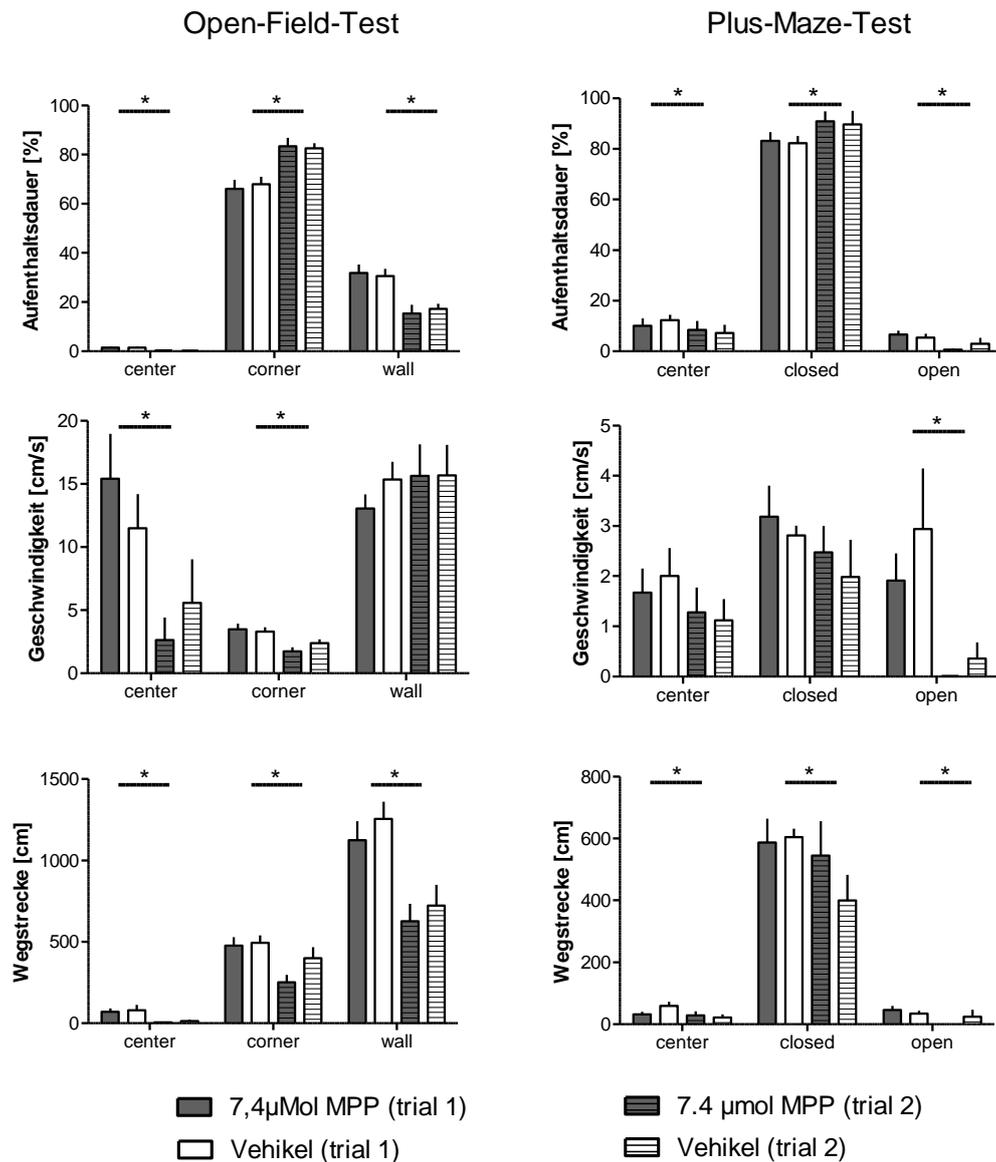


Abbildung 28 Aufenthaltsdauer, Geschwindigkeit und Wegstrecke der MPP-behandelten Tiere, sowie der Kontrollgruppe für den Open-Field-Test (links) und das elevated Plus-Maze (rechts)  
 center: zentrale Zone; corner: Eckzone; wall: Wandbereich  
 closed: geschlossene Arme; open: offene Arme  
 angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler; eingezeichnet sind Signifikanzen der GLM über die einzelnen Tage, \* $p < 0,05$ .

## Rezeptorkomplexe

Um weitere Erkenntnisse zu den Ergebnissen der ersten Teilstudie zu gewinnen, war ein nächster Schritt, die Untersuchung der Rezeptoren auf Protein-Ebene. Hierfür

wurden 8 Wochen alte Tiere ebenfalls auf dem Holeboard trainiert, erhielten dabei jedoch keine pharmakologische Behandlung. Die Tiere wurden hierfür in 4 Versuchsgruppen unterteilt. Zwei Gruppen durchliefen das Holeboard-Training, eine davon nur die beiden Akquisitionsphasen, die andere das gesamte Training (mit Retentionstrial). Zudem wurden zwei zeitgleiche, untrainierte Kontrollgruppen mitgeführt. Um zu verdeutlichen, dass die Erkenntnisse dieser Untersuchung vergleichbar mit den vorangegangenen Experimenten sind, wurden sowohl die Verhaltens- und Lernparameter, als auch die Körpergewichte statistisch ausgewertet. Hierfür wurden die 8 Wochen alten Kontrolltiere der ersten Teilstudie, in denen sich der deutliche Effekt in der Expression des ER $\alpha$ -Gens zeigte, mit den 8 Wochen alten Tieren, die ebenfalls das gesamte Training absolvierten, verglichen.

## Verhalten

Keiner der vier Verhaltensparameter (Abbildung 29) zeigte signifikante Unterschiede über die gesamte Trainingsdauer; es konnte ausschließlich ein signifikanter Unterschied in der ersten Akquisitionsphase im Parameter ‚Wegstrecke‘ nachgewiesen werden. (Zeit zum Finden aller Pellets: über alle 10 Trials:  $F_{1;19}=0,624$ ,  $p=0,439$ ; Akquisition 1:  $F_{1;19}=1,729$ ,  $p=0,204$ ; Akquisition 2:  $F_{1;19}=0,138$ ,  $p=0,715$ ; Retentionsdurchgang:  $F_{1;19}=0,079$ ,  $p=0,782$ ; die Anzahl der gefundenen Pellets: über alle 10 Trials:  $F_{1;19}=3,827$ ,  $p=0,065$ ; Akquisition 1:  $F_{1;19}=3,434$ ,  $p=0,079$ ; Akquisition 2:  $F_{1;19}=3,123$ ,  $p=0,093$ ; Retentionsdurchgang:  $F_{1;19}=3,817$ ,  $p=0,066$ ; Geschwindigkeit: über alle 10 Trials:  $F_{1;18}=0,470$ ,  $p=0,502$ ; Akquisition 1:  $F_{1;19}=4,012$ ,  $p=0,060$ ; Akquisition 2:  $F_{1;19}=0,017$ ,  $p=0,899$ ; Retentionsdurchgang:  $F_{1;19}=0,216$ ,  $p=0,648$ ; die zurückgelegte Wegstrecke: über alle 10 Trials:  $F_{1;18}=3,358$ ,  $p=0,083$ ; Akquisition 1:  $F_{1;19}=5,626$ ,  $p=0,028$ ; Akquisition 2:  $F_{1;19}=0,101$ ,  $p=0,754$ ; Retentionsdurchgang:  $F_{1;19}=0,446$ ,  $p=0,513$ ).

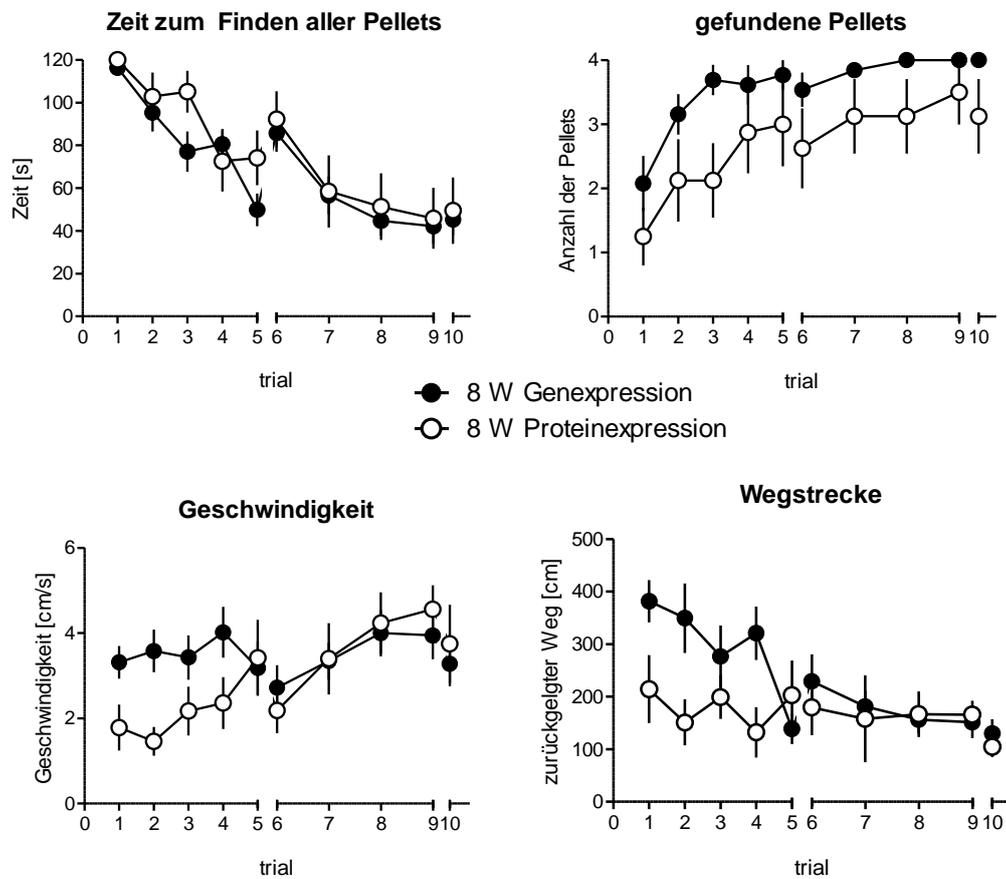


Abbildung 29 Verhaltensparameter der 8 Wochen alten Tiere des ersten Versuchsteil (8 W Genexpression) und der 8 Wochen alten Tiere, welche ebenfalls das vollständige Holeboard-Training absolvierten und zur Generierung der Daten der Proteinexpression genutzt wurden (8 W Proteinexpression); angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, \* $p < 0,05$ . Die Tiere unterschieden sich nicht in der Zeit zum Finden aller Pellets (oben links), der Anzahl der gefundenen Pellets (oben, rechts), der Geschwindigkeit (unten, links) und der zurückgelegten Wegstrecke (unten, rechts) über die Dauer des gesamten Trainings.

Auch für die Lernparameter; also das Referenzgedächtnis ( $F_{1;18}=3,159$ ,  $p=0,093$ ) und das Arbeitsgedächtnis ( $F_{1;20}=0,460$ ,  $p=0,506$ ); konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen detektiert werden (Abbildung 30).

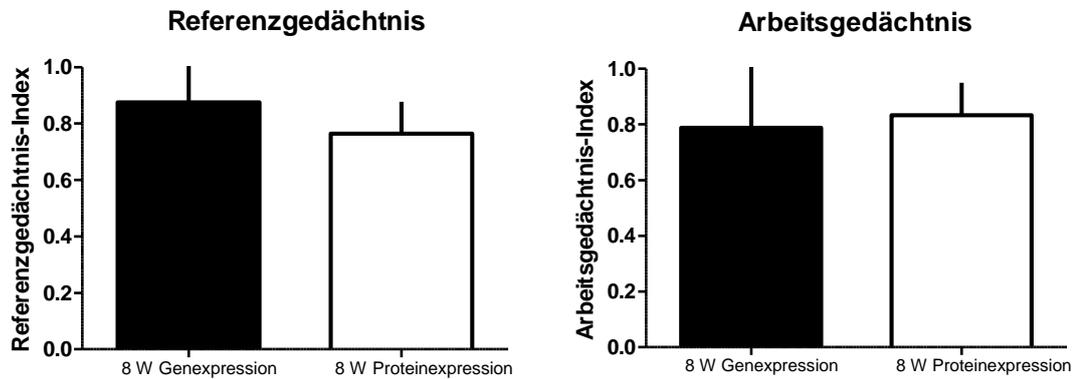


Abbildung 30 Referenz- und Arbeitsgedächtnis-Indizes der 8 Wochen alten Tiere im Retentionsdurchgang (Trial 10, Tag 3); angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler; \* $p < 0,05$ .

Im Retentionsdurchgang konnten keine signifikanten Unterschiede im Referenzgedächtnis oder Arbeitsgedächtnis nachgewiesen werden. Die Indizes wurden als Quotient der gesamten Lochbesuche durch die Summe der Lochbesuche und entsprechenden Fehler kalkuliert.

## Gewichte

Desweiteren wurden die Körpergewichte, bzw. die Gewichtsreduktion (Abbildung 31) der beiden Versuchsgruppen verglichen. Sowohl am Habituationstag ( $F_{1;20}=0,104$ ,  $p=0,751$ ), am ersten Trainingstag ( $F_{1;20}=0,811$ ,  $p=0,379$ ), sowie dem zweiten Trainingstag ( $F_{1;16}=0,024$ ,  $p=0,879$ ) unterschieden sich die Werte nicht signifikant voneinander.

Zusammengefasst, zeigen sich keinerlei Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, was einen direkten Vergleich ermöglicht und die Ergebnisse miteinander in Bezug bringen lässt.

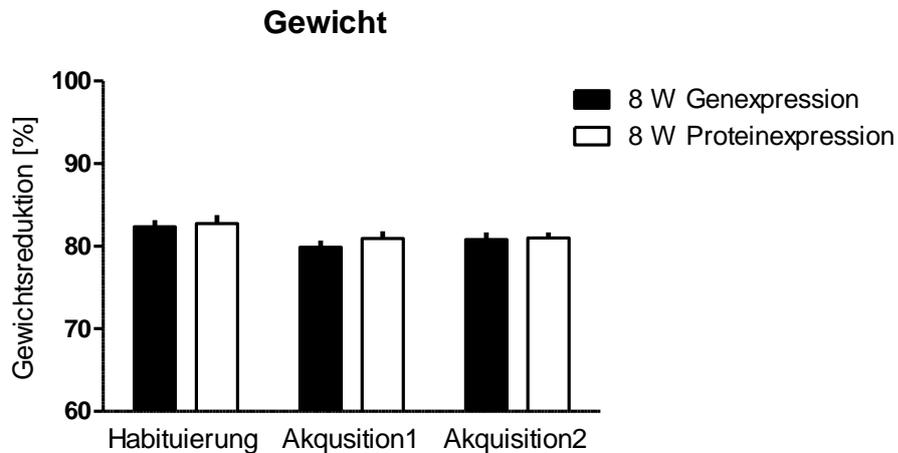


Abbildung 31 Angaben der Gewichtsreduktion der 8 Wochen alten Tiere des ersten Versuchsteil (8 W Genexpression) und der 8 Wochen alten Tiere, welche ebenfalls das vollständige Holeboard-Training absolvierten und zur Generierung der Daten der Proteinexpression genutzt wurden (8 W Proteinexpression) in Prozent, als Anteil des Ausgangsgewichtes; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler; es konnten keine signifikanten Unterschiede in den Einzelgruppenvergleichen ermittelt werden \* $p < 0,05$ .

## Western Blot Analysen

Die Western Blot Analysen der Membran-Fraktion (Abbildung 32) ergaben eine signifikante Änderung des Mineralokortikoidrezeptor ( $F_{3,31}=6,592$ ,  $p=0,002$ ) und der beiden Glukokortikoidrezeptor-Komplexe (480kDa:  $F_{3,31}=7,142$ ,  $p=0,001$ ; 520kDa:  $F_{3,31}=5,337$ ,  $p=0,005$ ). Die Post-hoc-Vergleiche zeigten anschließend, dass die Proteinkonzentration des Mineralokortikoidrezeptors in den trainierten Tieren signifikant höher war, als in der entsprechenden untrainierten Kontrollgruppe (9Trials:  $p=0,017$ ; 10Trials:  $p=0,022$ ). Für den membrangebundenen Glukokortikoidrezeptor konnten zwei verschiedene Komplexe detektiert werden. Der Rezeptorkomplex mit einer Proteinmasse von 480kDa wies eine signifikant höhere Konzentration in den Tieren, die das gesamte Holeboardtraining absolviert hatten, im Vergleich zu ihrer untrainierten Kontrollgruppe ( $p=0,003$ ) auf. Der

größere Rezeptorkomplex, mit einer Masse von 520kDa, hingegen, zeigte einen signifikanten Unterschied in den Tieren, die nur die beiden Akquisitionsphasen durchliefen, im Vergleich zu ihren untrainierten Kontrollgruppe ( $p=0,006$ ).

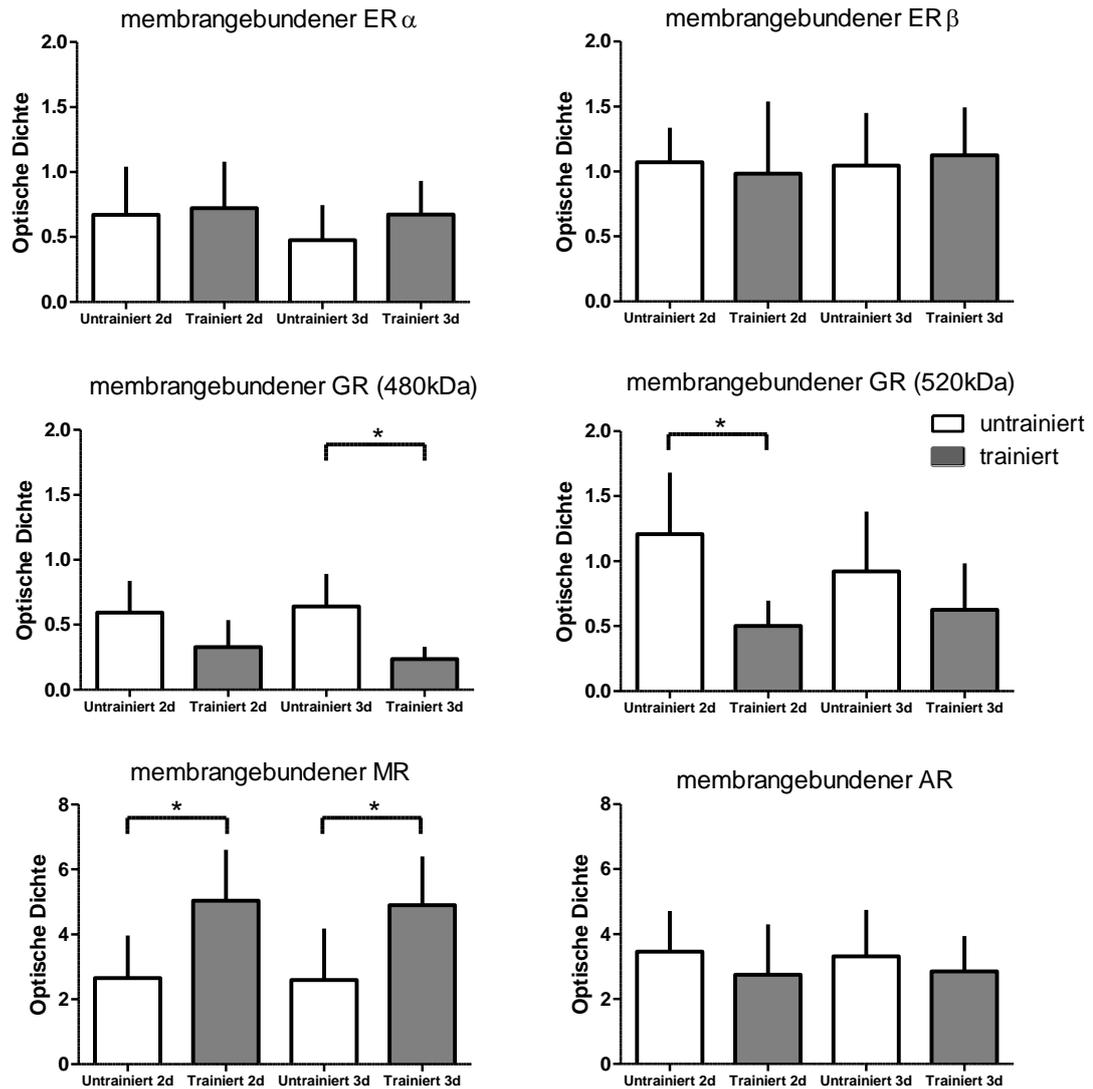


Abbildung 32 Auswertung der Western-Blot-Analysen der Steroidrezeptoren in der Membran-Fraktion; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, eingezeichnet sind Signifikanzen der Einzelgruppenvergleiche  $*p<0,05$ .

Die Auswertung der cytosolischen Fraktion (Abbildung 33) ergab ebenfalls einen signifikanten Unterschied, sowohl für den Glukokortikoidrezeptor ( $F_{3,31}=10,333$ ,  $p<0,001$ ), als auch für den Estrogen-Rezeptor  $\alpha$  ( $F_{3,31}=6,699$ ,  $p=0,002$ ). Mit Hilfe der Einzelgruppen-Vergleiche konnte gezeigt werden, dass für GR (im Cytosol nur durch einen Komplex vertreten, mit der Proteinmasse von 87kDa) der Proteingehalt in 2 Tage trainierten Tieren niedriger ist, verglichen mit ihrer Kontrollgruppe ( $p<0,001$ ).

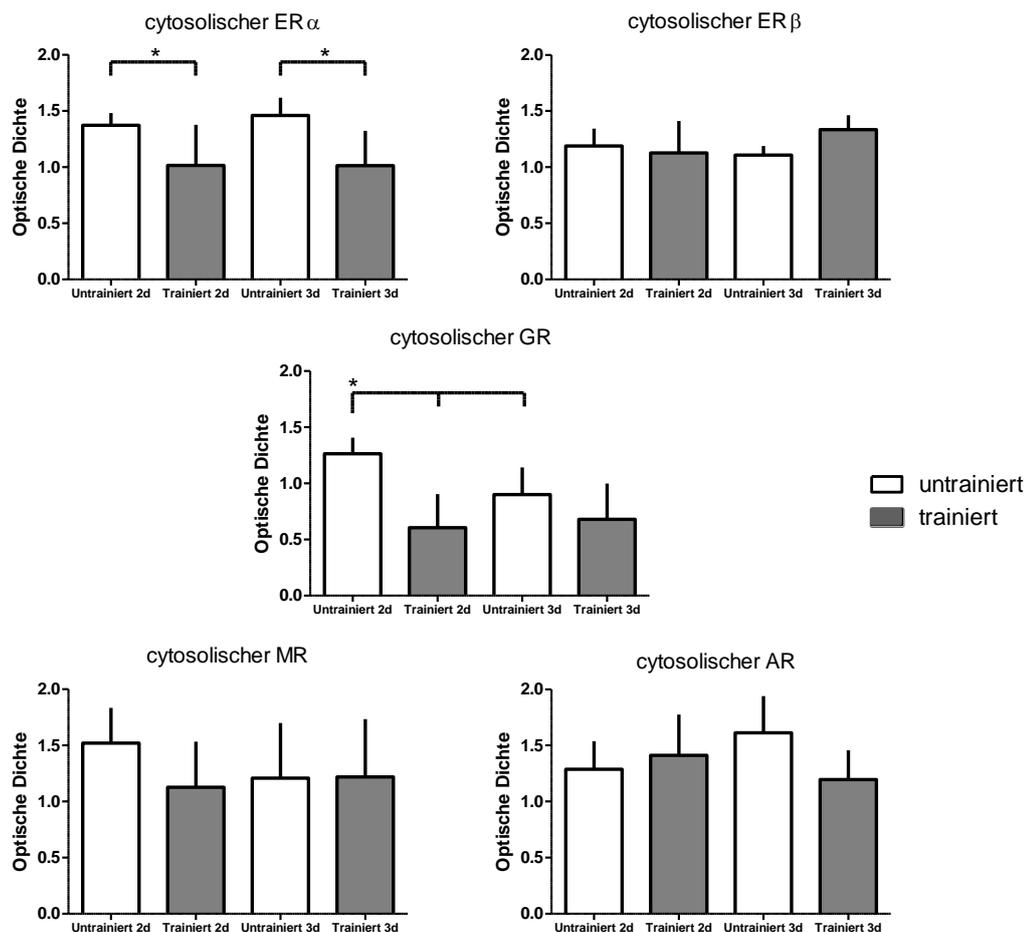


Abbildung 33 Auswertung der Western-Blot-Analysen der Steroidrezeptoren in der cytosolischen Fraktion; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, sind Signifikanzen der Einzelgruppenvergleiche  $*p<0,05$ .

Allerdings wurden hier auch Unterschiede zwischen den untrainierten Kontrollgruppen gefunden. Tiere, die parallel zu den Tieren, die alle 10 Trials durchliefen, mitgeführt wurden, wiesen einen geringeren Proteingehalt als 2 Tage untrainierte Tiere auf ( $p=0,042$ ). Auch die Konzentration des Estrogen-Rezeptor  $\alpha$

war signifikant geringer in trainierten Tieren unabhängig von der Trainingsdauer, im Vergleich zu den zeitlich abgestimmten, untrainierten Tieren (9Trials:  $p=0,045$ ; 10Trials:  $p=0,008$ ).

Die Western-Blot-Daten wurden aus der Signalstärke der einzelnen Banden mittels Image J Software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) generiert. Abbildung 34 zeigt die zugrunde liegenden Western-Blot-Banden der einzelnen Proben je Rezeptor, sowie die jeweiligen Ladekontrollen. Jedes Gel lief mit je 3 bis 4 Proben pro einzelner Versuchsgruppe. Die Konzentration (angegeben als optische Dichte) wurde nach der Messung der Signalstärke als Mittelwert aller Proben pro Gruppe angegeben.

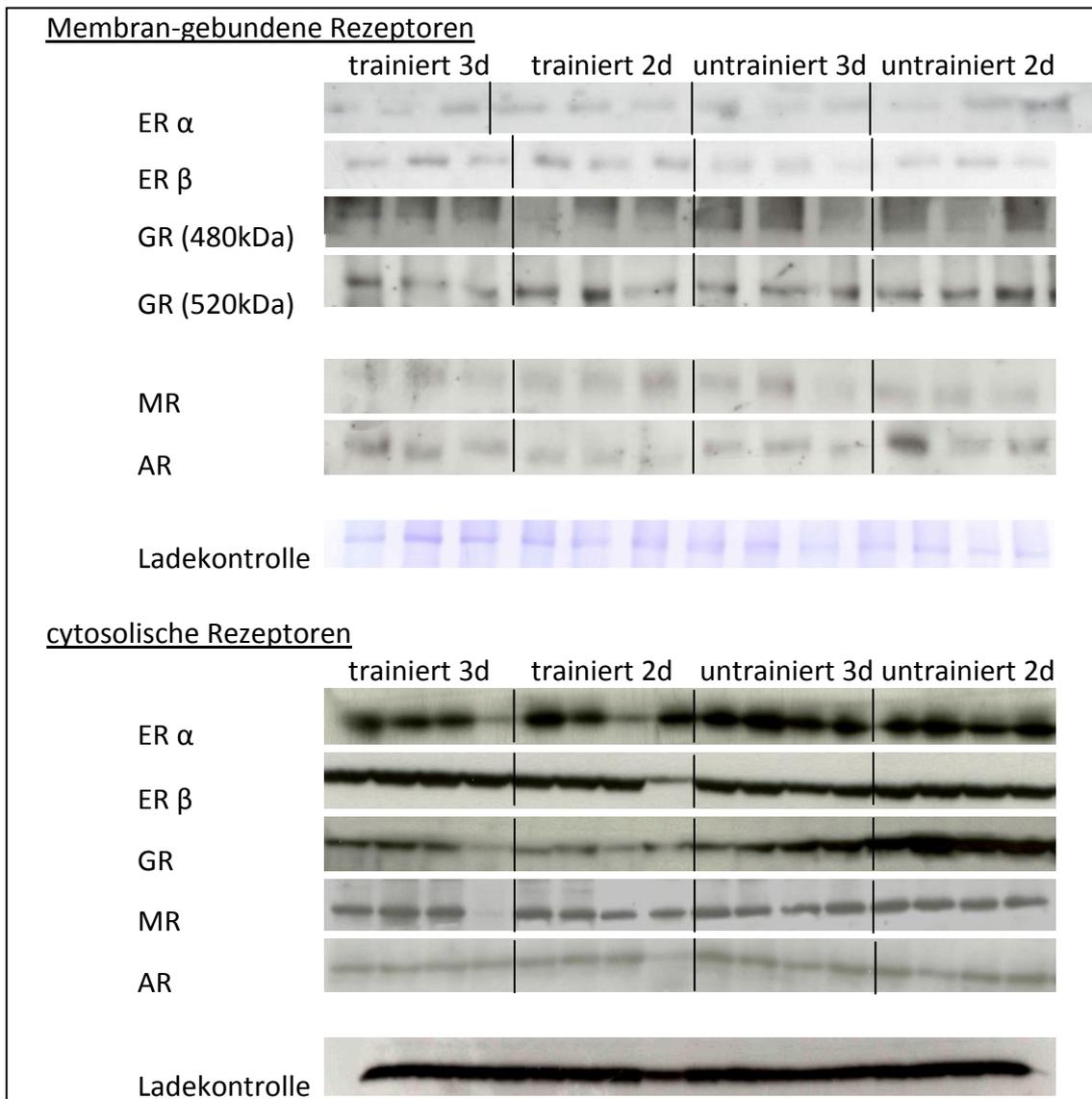


Abbildung 34 Western Blots der beiden Fraktionen und deren Ladekontrollen

## Diskussion

Die vorliegende Studie ist in drei Abschnitte untergliedert. Im ersten Teil wurde die Rolle hippokampaler Steroidrezeptoren und –hormone auf die Verhaltensregulation in einer räumlichen Lernaufgabe in männlichen Wistar Ratten untersucht. In Bezug auf vorangegangene Untersuchungen, beschränkt sich die Arbeit auf männliche Tiere, da hierfür ein breiteres Spektrum an relevanter Literatur verfügbar ist. Da das Hormonsystem sich mit dem Alter der Tiere ändert und möglicherweise auch Funktionsunterschiede aufweisen kann (Meaney et al., 1985; Sapolsky et al., 1985; Zhang et al., 2013), wurde der Einfluss des ontogenetischen Reifegrades auf diese Prozesse berücksichtigt. Grundlage vieler Untersuchungen, über die Regulationsmechanismen in heranwachsenden Tieren und der damit einhergehenden Veränderung des Hormonhaushaltes, waren bisher überwiegend Studien an gonado-ektomierten Tieren. Dies lässt zwar Aussagen über direkte Wirkungswege von exogen applizierten Steroidhormonen zu, führt aber parallel zur gesamten Veränderung des endokrinen Systems (Naninck et al., 2011; Schulz et al., 2009; Phoenix, 2009; Bakker and Baum, 2008). Um genauere Kenntnisse über die Regulation in intakten Tieren zu gewinnen und eine, der natürlichen Physiologie nahekommende, Situation zu analysieren, wurden in dieser Studie keine gonado- bzw. adrenal-ektomierten Tiere verwendet. Der dadurch geschaffene Vorteil des Erhalts des endokrinen Systems bedingt jedoch auch, dass die Komplexität dieses Netzwerkes nicht innerhalb einer Studie erfasst werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde daher das Hauptaugenmerk auf die Regulation ausgewählter Steroidhormonrezeptoren und deren Liganden im Hippokampus in Bezug auf die Absolvierung einer räumlichen Lernaufgabe gelegt.

Die Absolvierung dieser Lernaufgabe induzierte eine erhöhte Expression des Östrogen-Rezeptor  $\alpha$ -Gens in 8 Wochen alten Tieren. Infolgedessen wurde im zweiten Teil der Studie die Regulation dieses Rezeptors in der entsprechenden

Altersgruppe in den Fokus gerückt. Mit Hilfe eines ER $\alpha$ -Antagonisten sollte der Einfluss der Inhibierung desselbigen, mittels verschiedener Konzentrationen, näher charakterisiert werden. Hierbei konnte eine Konzentrations-abhängige Wirkung auf das Lernverhalten der Tiere, jedoch nicht auf die Effektivität des Lernvorgangs (Anzahl der Fehler) nachgewiesen werden. Um ausschließen zu können, dass diese nicht in unspezifischen Änderungen in der lokomotorischen Aktivität, oder dem Erkundungs-, sowie Angstverhalten der Tiere begründet ist, sondern aus einer motivationalen Veränderung hervorgeht, wurden, im dritten Teil der Studie, zwei Standardverhaltenstests durchgeführt. Diese konnten keine allgemeinen Unterschiede in den Verhaltensparametern Lokomotions-, Explorationsverhalten und „Ängstlichkeit“ aufzeigen. Um neben der Quantifizierung der Genexpression der Steroidrezeptoren zusätzliche Informationen über deren Proteinsynthese zu gewinnen, wurden Western-Blot-Analysen für die entsprechenden Rezeptoren durchgeführt. Die Western-Blot-Analysen wurden sowohl für die Membran- als auch für die cytosolische Fraktion durchgeführt. Dieses Vorgehen erlaubt erste Rückschlüsse auf die Beteiligung von schnellen Signaltransduktionswegen (Membran) oder langsameren genomischen Mechanismen (cytosolische Rezeptoren) an der Modulation des Verhaltens.

Der Hippokampus gilt als der Teil des limbischen Systems, der für die Informationsverarbeitung beim räumlichen Lernen verantwortlich ist und, im Zusammenspiel mit der Amygdala, als emotions-verarbeitende Hirnstruktur, sowie dem Präfrontalen Cortex, auch eine elementare Rolle für die Prozessierung und Speicherung neuer emotionaler Informationen (Nathan et al., 2004; Diamond et al., 2007; Ramos and Arnsten, 2007; Sandi et al., 2005, 2007) und deren kontextabhängigen Speicherung spielt. Die zellulären Grundlagen, für diese Fähigkeit zur Ausbildung des Gedächtnisses, liegen in der Fähigkeit zur neuronalen und synaptischen Plastizität begründet. Neuronale Plastizität ist die dynamische Modulation von Nervenzellen, zum einen in ihrer Erregbarkeit, bzw. Erregungsübertragung (synaptische Plastizität) und zum anderen in ihrer Morphologie und der Zusammensetzung des enzymatischen Repertoire (strukturelle

Plastizität). Zusätzlich zu diesen Modifikationen, ist der adulte Gyrus Dentatus der hippocampalen Formation zur Neubildung von Neuronen fähig. Es konnte gezeigt werden, dass durch Hippokampus-abhängiges, jedoch nicht durch Hippokampus-unabhängiges Lernen, die Neubildung von Neuronen induziert und deren Überleben und Funktionalität im Gyrus Dentatus erhöht wird (Gould et al., 1999). Klassische Arten Hippokampus-abhängigen Lernens beinhalten räumliches Lernen und Gedächtnis (Morris, 1981; 1982). Aber wie kann sich ein Tier im Raum orientieren? Sowohl Granularzellen des Gyrus dentatus als auch Pyramidenzellen der CA1-Region der hippocampalen Formation, können die Eigenschaft des ortsgebundenen Feuerns entwickeln. Diese Zellen zeigen häufiger oder ausschließlich Aktionspotentiale, wenn das Tier sich an einem bestimmten Ort in einer Testarena befindet. Diese Zellen werden als Place-Zellen (O'Keefe, 1979) bezeichnet und wurden hauptsächlich im Hippokampus (ca. 50% der Zellen) und im medialen entorhinalen Cortex (Grid-cells) nachgewiesen (Moser et al., 2008). Diese räumlichen Orientierungszellen feuern, ähnlich den im Schlaf detektierbaren Theta-Wellen rhythmisch, jedoch nur, wenn sich das Tier in dem, der Zelle entsprechenden, Place-Feld befindet. Diese Kombination von hippocampalen Place-Zellen und entorhinalen Grid-Zellen wirken zusammen und bilden eine „kognitive Landkarte“, also ein neuronales System, um sich im Raum zu orientieren. Das Netzwerk der verschiedenen Zellen dieser kognitiven Landkarte wird dabei vermutlich über die Verstärkung synaptischer Verbindungen, und somit der langfristigen Aufrechterhaltung der synaptischen Plastizität (wie etwa LTP) realisiert (Kentros et al., 1998). Diese wiederum, wird essentiell durch den Einfluss von Steroidhormonen moduliert. So konnte in diversen Studien gezeigt werden, dass die beiden Kortikosteron-bindenden Steroidhormone gegensätzliche Effekte auf die synaptische Plastizität, bzw. die Langzeitpotenzierung, im Gyrus Dentatus haben (Filipini et al., 1991; Dubrovsky et al., 1993; Pavlides et al, 1995); aber auch die gonadalen Steroidhormone in die Modulation involviert sind (Foy et al., 1999; Cordoba Montaya and Carrer, 1997; Murphy and Segal, 1996; Hebbard et al., 2003).

Andere Studien zu o.g. Place-Zellen zeigten, dass diese im Place-Feld unabhängig von Belohnung, Bestrafung oder zwanghafter Immobilität, (durch den Experimentator im Place-Feld gehalten) feuern (Olton et al., 1978; Hill, 1978; O'Keefe and Conway, 1978). Außerdem bilden Tiere, welche taub, blind, oder ohne Tasthaare sind, ebenfalls Place-Zellen aus. Diese Zellen verwenden die verschiedensten sensorischen Impulse und Stimuli und feuern zum Teil auch nach Weglassen eines der räumlichen Merkmale, sofern sich das Tier im Place-Feld befindet. Untersuchungen zeigten, dass in unterschiedlichen Versuchsanordnungen mit denselben räumlichen Merkmalen und der gleichen Orientierung im Raum, einzelne Place-Zellen überlappende Aktivitätsmuster zeigen, andere nicht. Es werden demnach I. keine synchronen kognitiven Landkarten verschiedener Situationen im gleichen Raum gebildet und II. die basalen neuronalen Grundlagen für räumliche Orientierung werden durch o.g. Einflüsse nicht geändert; es müssen demnach Verhaltenszustände eine Rolle spielen, die die Lernbereitschaft und –fähigkeit beeinflussen, wie etwa Motivation und Emotion. In der Regulation eben dieser Verhaltenszustände, spielt der Hippokampus ebenso eine zentrale Rolle. Das kontextuale Angstgedächtnis z.B., wurde bereits früh als Hippokampus-abhängig identifiziert. Die Schädigung des Hippokampus nach der Kontext-Ton-Schock-Verknüpfung des Angstkonditionierung-Tests führt zu dem Verlust der Kontext-Schock-Verknüpfung, jedoch nicht der Assoziation zwischen Ton und Schock (Maren et al., 1997; Phillips and LeDoux, 1992). Unter Anderem, aufgrund dieses Bezugs zwischen Hippokampus und Kontext, wurde dem Hippokampus eine Rolle in der räumlich kognitiven Informationsverarbeitung zugeschrieben und die emotionale/motivationale Komponente weniger berücksichtigt. Dass Emotionen als Hippokampus-unabhängig betrachtet werden können, konnte jedoch bereits durch Erkenntnisse wie die Involvierung des Hippokampus in den Papez-Kreislauf, oder die Stressantwort negiert werden. So ist bekannt, dass durch die Erhöhung der Stresshormone, die Funktion des Hippokampus gestört werden kann (McEwen and Magarinos, 1997; Herman et al., 2005), und vice versa, die Störung des Hippokampus zu einer Störung in der HPA-Achse führt (Dedovic et al., 2009;

Jacobson and Sapolsky, 1991). Auch räumliche Lernaufgaben wie das Morris Water Maze (Morris, 1981), oder das Holeboard (Boissier and Simon, 1962), sowie die kontextuale Angstkonditionierung, erfordern Motivationen wie Hunger, Belohnungserwartung, oder Angst. Eine Verknüpfung von Emotion, Motivation und Kognition ist daher unerlässlich. Dem Hippokampus wird jedoch eine räumliche „Funktionstrennung“ zugeschrieben. Der dorsale Hippokampus gilt als verantwortlich für das räumliche Lernen (hier befindet sich auch ein höherer Anteil an Place-Zellen; Kjelstrup et al., 2008), während der ventrale Teil im Wesentlichen als, in die Emotionsverarbeitung involviert, angesehen wird. Diese dichotome Einteilung wird zum Einen von der Tatsache gestützt, dass der dorsale und der ventrale Teil des Hippokampus verschiedene Afferenzen und Efferenzen aufweisen (Swanson and Corwan, 1977). Die Afferenzen umfassen primär den Tractus perforans, die eingehende Verbindung vom entorhinalen Cortex, aber ebenfalls diverse Inputs aus dem assoziativen Isocortex, dem Septum, der Amygdala, den limbischen Thalamuskernen, den Raphe-Kernen und dem Locus coeruleus. Die Signale werden vom Gyrus Dentatus über die Moosfasern zur CA3-Region, und anschließend über die Schaffer-Kollaterale zur CA1-Region des Hippokampus weitergeleitet. Die Efferenzen verlaufen über das Subiculum zurück zum entorhinalen Cortex; außerdem zu nahezu allen neocorticalen Gebieten, zurück zur Amygdala, dem Septum, dem Hypothalamus und zu den Mamillarkörpern (Klausberger and Somogyi, 2008; Coulter et al., 2011). Räumliches Lernen soll demnach im Wesentlichen vom dorsalen Teil des HC abhängig sein (Moser et al., 1995), während Verletzungen, bzw. Funktionseinschränkungen des ventralen Hippokampus, zu Einschränkungen in der Stressantwort oder dem emotionalen Verhalten führen (Henke, 1990). Zahlreiche weitere Studien mit verschiedenen Schwerpunkten, z.B. Angst-Konditionierung, Angstverhalten, oder räumlichem Lernen, unterstützen diese Annahme (contextual fear conditioning: Anagnostaras et al., 2001; conditioned place preference: Ferbinteanu and McDonald, 2001; elevated plus-maze: Kjelstrup et al., 2002; 8-arm radial maze: Pothuizen et al., 2004; auditory-cued fear learning: Hunsaker and Kesner, 2008). Andererseits kommt eine

Reihe von Untersuchungen zu gegensätzlichen Ergebnissen; Rudy and Matus-Amat (2005) zeigten, dass auch die Inaktivierung des ventralen Hippokampus zur Störung der Kontext-Schock-Verknüpfung führt. Ferbinteanu et al. (2003) und Moser et al. (1993) zeigten ebenfalls, dass sowohl die Manipulation des dorsalen, als auch die des ventralen (bei Moser et al. ab einer Lesionsgröße von 40%) Hippokampus, zu sehr ähnlichen Defiziten im räumlichen Lernen im Morris Water Maze führt.

Außerdem konnte, bei der näheren Untersuchung der einzelnen Transmittersysteme im Hippokampus, zwar eine stärkere Innervierung des ventralen Teils nachgewiesen werden; dies gilt für das cholinerge System (Cholin-Acetyltransferase, Acetylcholinesterase), die monoaminerge Innervierung (Noradrenalin, Dopamin, Serotonin) und in einer geringen, jedoch signifikanten Verteilung, für Glutamat. Neben dieser Heterogenität entlang der dorsal/ventral-Achse unterscheiden sich die Konzentrationen auch innerhalb der einzelnen Subregionen stark; zudem kann eine geringere Innervierung durchaus mit höheren Aktivitäten oder Ausschüttungen an Transmittern ausgeglichen werden (Hörtnagel et al., 1991). Da der rechte Hippokampus in der vorliegenden Studie, sowohl für die Hormonkonzentrationsbestimmung, als auch für die Quantifizierung der relativen Genexpression genutzt werden sollte, wurde der HC, halbiert und anschließend randomisiert, in den einzelnen Analyseverfahren genutzt. Hiermit sollte ausgeschlossen werden, dass eventuelle Unterschiede zwischen dem dorsalen und ventralen Hippokampus herausgefiltert werden, die in dieser Studie keine weitere Rolle spielen sollte. Zudem begründete sich die Fokussierung auf den rechten Hippokampus darin, dass die Studie vergleichbar bleibt, mit früheren und auch geplanten Untersuchungen zur hippokampalen Langzeitpotenzierung in unserem Verhaltensparadigma.

Die ontogenetische Entwicklung des neuronalen, hormonellen Netzwerkes ist ein weiteres Feld der Untersuchungen. In der periadoleszenten Phase der Entwicklung ist das dopaminerge System nahezu ausgereift (Pardo et al., 1977; Murrin and Zeng, 1986; Broaddus and Bennett, 1990; Rao et al., 1991), verändert sich jedoch

weiterhin bis zum Stadium des Erwachsenen-Alters (Lyss et al., 1999). Die neurale Verknüpfung durchläuft dagegen noch immense Veränderungen. Der vorliegende Überschuss an Synapsen und Rezeptoren wird mittels kompetitiver Selektion wieder ausgedünnt und vermindert (Use-it-or-lose-it-Prinzip). Im menschlichen Cortex z.B., vermindert sich die Dichte der Synapsen um 40% (Huttenlocher, 1979). Weiter ist bekannt, dass verschiedene Rezeptoren im prä-pubertären Hirn nachzuweisen sind, die dann post-pubertär nicht mehr detektiert werden können (Vizuete et al., 1997). In der prä-pubertären Phase (bei Ratten ca. 5 bis 14 Tage nach der Geburt), durchläuft der Organismus eine Stress-hypo-responsive-Phase, welche mit einer verminderten Aktivität der HPA-Achse, bzw. einer verminderten Stressantwort auf Stressoren einher geht (Sapolsky and Meaney, 1986). Ein, zu diesem Zeitpunkt einzigartiges, Konzentrationsmuster der Glukokortikoid-Rezeptoren, führt zu einer negativen Feedback-Reaktion und hält den Corticosteron-Level niedrig, bzw. stabil, um eine optimale Entwicklung des Glukokortikoid-sensitiven neuronalen Netzwerkes zu gewährleisten.

Die Entwicklung der Konzentrationen der gonadalen Hormone zeigt dagegen einen eher linearen Verlauf. Ab einem Alter von ca. 25 Tagen beginnen die Konzentrationen zu steigen und erreichen dann schnell ihr adultes Level. Eine Ratte gilt ab einem Alter von 6 Wochen als sexuell ausgereift, erreicht ihre soziale und volle körperliche Reife (z.B. Muskel-Skelett-System) jedoch erst in einem Alter von 5 bis 6 Monaten (Sengupta, 2012). Die Tiere in der vorliegenden Studie sind in einem Alter von 8, 12, oder 24 Wochen untersucht worden; sie sind demnach alle sexuell voll entwickelt, unterscheiden sich jedoch stark in ihrem sozialen Entwicklungsstatus. Die 8 Wochen alten Tiere befinden sich in der Phase der Suche ihrer sozialen Stellung und dem Verlassen des Nestes (Kelley et al., 2004); diese ist geprägt von einer erhöhten Risikobereitschaft und einer stärkeren Motivation zur Erkundung unbekannter Umwelten; bzw. durch einen gesteigerten Antrieb nach sozialen und anderen Stimulationen durch die Umwelt. Zudem lernen die ‚jungen Erwachsenen‘ in diesem Zeitraum auch Notwendigkeiten, wie Überlebensstrategien oder die Unabhängigkeit von den Eltern zum eigenen Überleben (Kelley et al.,

2004). In unseren Ergebnissen spiegeln sich diese Verhaltensmuster ebenfalls deutlich wider. So sind die 8 Wochen alten Tiere durch den Futterentzug stärker motiviert das Holeboard zu explorieren, bewegen sich mit einem größeren Wandabstand und einer höheren Geschwindigkeit und benötigen weniger Zeit zum Erlernen des Paradigmas, als ihre älteren Versuchsgruppen. Die älteren Tiere unterschieden sich dagegen nicht signifikant voneinander. Die statistische Auswertung der Abnahme der Körpergewichte ergab für die Habituation und die Akquisitionsphase 1 einen signifikanten Unterschied der 12 Wochen alten Tiere zu den postpubertären Tieren, die 24 Wochen alten Tiere unterschieden sich dagegen nicht von den 8 Wochen alten Tieren. Dieser Unterschied ergab sich unter anderem durch die breite Varianz der Ausgangsgewichte der 12 Wochen alten Tiere. Da jedoch beide älteren Gruppen ein ähnliches und von den 8 Wochen alten Tieren signifikant unterschiedliches Verhalten zeigen, ist stark anzunehmen, dass nicht der Unterschied der Gewichtsreduktion den Verhaltensunterschieden zugrunde liegt. In diesem Falle würde lediglich das Verhalten der mittleren Versuchsgruppe von den beiden anderen abweichen. Unterschiede in den kognitiven Lernparametern konnten zudem nur für das Referenzgedächtnis der 8 Wochen alten Tiere im Vergleich zu den 12 Wochen alten Tieren nachgewiesen werden, das Arbeitsgedächtnis unterscheidet sich zwischen keinen der drei Altersgruppen. Die sozial noch nicht voll entwickelten Tiere zeigten unter diesen Bedingungen demnach ein besseres Langzeitgedächtnis, als die vollentwickelten, adulten Tiere. Die oben beschriebenen Unterschiede in der Sozialontogenese, also die ontogenetisch programmierte erhöhte Explorationsbereitschaft junger Männchen zusammen mit der Notwendigkeit der langfristigen Speicherung neuer Umgebungen in kognitiven Karten, könnten diese Verhaltensunterschiede erklären. Die altersabhängig unterschiedlich programmierten Verhaltensstrategien beruhen sehr wahrscheinlich, auf neurochemischen und -molekularen Unterschieden in den relevanten Gehirnregionen, wie dem Hippokampus, sowie in regionsübergreifenden Netzwerken.

Der wesentliche exzitatorische Neurotransmitter des Hippokampus ist Glutamat; der wesentliche inhibitorische Neurotransmitter ist  $\gamma$ -Aminobutyrat (GABA). Neuro-modulatorische Funktionen werden im Wesentlichen über Monoamine, wie Noradrenalin (NA), Serotonin (5-HT), und zu einem geringeren Anteil auch Dopamin (DA) und Histamin an der Verarbeitung der eingehenden Signale im Hippokampus erfüllt, ebenso wie in der Amygdala und anderen Strukturen (Collingridge, 1985; Izquierdo et al., 1992). Die Aktivierung von glutamatergen NMDA-Rezeptoren, als Transmembran-Rezeptoren, führt direkt, nach Depolarisation des postsynaptischen Neurons und Entfernung des kanalblockierenden Magnesium-Ions, zu erhöhtem post-synaptischem Einstrom von Kalziumionen. Ionotrophe und metabotrophe AMPA-Rezeptoren, erstere als Ionenkanäle, letztere als G-Protein gekoppelte Rezeptoren, vermitteln die schnelle postsynaptische Antwort auf präsynaptische Glutamatausschüttung. Steroidhormonrezeptoren können einen wesentlichen Einfluss auf die präsynaptische Ausschüttung von Glutamat und die postsynaptische Mobilität der, o.g., Glutamatrezeptoren und deren Verfügbarkeit an postsynaptischen Membranen haben.

Neben den Glutamat- und Östrogenrezeptoren spielen auch Kortikosteron-bindende Rezeptoren, der Glukocortikoid-Rezeptor (GR), sowie der Mineralokortikoid-Rezeptor (MR), eine wichtige Rolle. Sie koordinieren die Funktionen des Stresshormons Kortikosteron, welches auch beim Lernen eine ausschlaggebende Bedeutung hat. So kann Kortikosteron kurzfristig neuroprotektiv wirken, chronische Stresszustände und langfristig erhöhte Kortikosteron-Spiegel führen dagegen eher zu einem Neuronen-Verlust im Hippokampus; sehr wahrscheinlich über die Aktivierung extrasynaptischer NMDA-Rezeptoren (Lupien and McEwen, 1997; Sandi, 2011). Dementsprechend kann kurzfristiger Stress auf der systemischen Ebene zu einer Verbesserung des Gedächtnis führen (Roozendaal et al., 2000), während langfristiger Stress und erhöhte Konzentrationen von Kortikosteron mit einer schlechteren Lernleistung (Joels et al., 2006), neuropathogenen Krankheiten wie der Depression u. Ä. (Tronche et al., 1999), sowie der Beeinträchtigung des Serotonin-Haushaltes (Karten et al., 1999),

korreliert werden kann. Eine Meta-Analyse über verschiedenen Studien am Menschen, zum Einfluss von akuter Cortisol-Gabe auf das Gedächtnis (Het et al., 2005), konnte auf Grund der großen Heterogenität der Daten zwischen den einzelnen Studien keine eindeutigen Ergebnisse aufzeigen.

In jedem Falle wird der Einfluss von Kortikosteron (in Nagern) auf das Gedächtnis durch o.g. Rezeptoren vermittelt. De Kloet et al. (1999) unterscheidet hierbei zwischen dem MR-responsiven Netzwerk, welches den Abruf bereits erlernten Wissens oder der Verhaltensreaktion auf Neuerungen der Umgebung vermittelt und dem GR-responsiven Netzwerk, welches mit steigendem Hormonlevel, als Reaktion von Neuerungen, die Konsolidierung neuer Informationen vermittelt. Das Zusammenspiel beider Rezeptoren regelt somit die Informationsverarbeitung zur Ausprägung eines optimal angepassten Verhaltens. Die nähere Untersuchung der Wirkungswege beider Rezeptoren zeigte, dass sie zu meist in Form von Dimeren agieren. Sie besitzen, wie die anderen Steroidhormon-Rezeptoren, ein stark konserviertes DNA-Bindemotiv, und können daher durchaus auch an ähnlichen oder gleichen responsiven Elementen der DNA binden. Nach Bindung zweier Rezeptoren erfolgt die Bildung der Homodimere über eine Kontaktstelle am zweiten Zinkfinger des Bindemotives (Luisi et al., 1991). Neben dieser Möglichkeit, Homodimere zu bilden, sind die Steroid-Rezeptoren ebenfalls in der Lage Heterodimere zu bilden, was ihre Funktionalität, bzw. die Möglichkeiten der Regulation von Zielgenen weiter erhöht. Der Glukokortikoid-Rezeptor kann, z.B. mit dem Mineralokortikoid-Rezeptor dimerisieren und reguliert als Heterodimer andere Zielgene, oder gleiche Gene auf anderem Wege, als die Monomere (Liu et al., 1995; Trapp et al., 1994). Diese Regulation erscheint zweckmäßig für die Erhaltung der Homöostase als auch für kurzfristige Anpassungen an lernrelevante Außenreize, auch bei großen Ligand-Konzentrationsschwankungen. De Kloet (1991) formulierte hierfür die Balance-Hypothese; welche besagt, dass MR für die Erregbarkeit der hippokampalen CA1 Neurone verantwortlich ist und GR zur Gegensteuerung benötigt wird. Bei Störung dieser Balance, kommt es zu Lernstörungen oder Einschränkung in der Stressresonanz (Montkowski, 1995; Bradbury et al., 1994). Untersuchungen zeigten,

dass die Dimer-Bildung notwendig für eine erfolgreiche Bindung an die DNA ist (Evans, 1988; Beato, 1989; Tsai and O'Malley, 1994); dabei konnten Trapp et al. (1994) zeigen, dass die MR-GR Heterodimere sogar bessere DNA-Bindeeigenschaften und auch eine bessere Binde-Kinetik aufweisen, als Monodimere. Zudem führt die Bindung von Heterodimeren zu einer veränderten Transkriptionsaktivität und könnte, aufgrund anderer Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren, weitere individuelle Regulationen im Vergleich zu den Monomeren beeinflussen (Trapp und Holzboer, 1996). Eine weitere Möglichkeit für zusätzliche Regulationsmechanismen ist die Konkurrenz. Eine Form der Repression von Genen könnte durch das Binden eines „falschen“ Dimers an die DNA sein, welche dann die Transkription des Zielgens unterdrücken könnte (Trapp et al., 1994; Trapp und Holzboer, 1996). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass GR in der Lage ist, mit dem Testosteron-bindenden Androgen-Rezeptor Heterodimere zu bilden (Chen et al., 1997). Es ist denkbar, dass diese Möglichkeit im Zusammenhang mit dem Einwirken von Stress und somit der Erhöhung des Kortikosteron-Levels steht, d.h., dass in diesem Falle die Dimer-Bildung zwischen GR und AR den Androgen-Rezeptor abfangen würde, um ihn für Energie-verbrauchende Prozesse nicht weiter verfügbar zu machen (Diamond et al., 1990; Kallio et al., 1995; Trapp and Holzboer, 1996). Solche Prozesse repräsentieren eine Möglichkeit der Verbindung des adrenalen und gonadalen Systems in der Verarbeitung von Umweltanforderungen, die auch im Zusammenhang mit Lernerfahrungen stehen. Während GR-GR Homodimere im Wesentlichen die Expression der, für die Stressantwort notwendigen, Zielgene induzieren (Chen et al., 1997), wären Heterodimere (mit veränderter Transkriptionsaktivität) eine Möglichkeit die Genexpression an komplexere Reizkombinationen anzupassen. Wie bereits angedeutet, wurde es in den letzten Jahren zunehmend deutlicher, dass Sexualhormone nicht nur in Entwicklungsprozessen eine Rolle spielen, sondern auch in kurzfristigen Regulationen von neuronaler Plastizität Lernen und Gedächtnis ermöglichen bzw. modulieren. Zudem wirken beide, „männliche“ und „weibliche“, Sexualhormone durchaus nicht unbedingt geschlechtsspezifisch als allgemeine

Neuromodulatoren, sondern üben ebenfalls spezifische situationsabhängige Funktionen aus (Schulz and Korz, 2010). So sind sie auch in körperliche Reaktionen involviert, die den klassischen Stressanpassungen zugerechnet werden. Sie wirken z.B., neben den bekannteren Kortikoiden, entzündungshemmend; dies wird über die Immunrepression der Stressantwort vermittelt. Bekannt ist etwa, dass die Östradiol-Rezeptoren an der Repression von NF- $\kappa$ B-regulierten Cytokin-Genen beteiligt sind, dies kann zum Einen durch die direkte Bindung am NF $\kappa$ B-Promotor erfolgen (Ray et al., 1997), aber auch auf einem komplexeren Weg, mittels Bindung von Co-Aktivatoren, welche die Repression bedingen (Cvoro et al., 2006). Desweiteren können die Rezeptoren auch notwendige Co-Aktivatoren abfangen, was in Folge, die Expression der Entzündungs-Gene verhindert (Nettles et al., 2008). Die Untersuchungen der Rezeptoren für Kortikosteron und Östradiol zeigten, dass beide sehr ähnliche Mechanismen nutzen. So führt die antagonistische Repression des Östrogen-Rezeptors, zu einer Unterdrückung der entzündungshemmenden Wirkung der Glukokortikoide, und demnach auch der Funktion von GR. Es ist zu vermuten, dass beide Rezeptoren neben spezifischen, auch gemeinsame Zielgene verwalten, der zugrunde liegende Mechanismus ist bisher jedoch unbekannt (Cvoro et al., 2011).

Auch in unserer Studie ist eine Verknüpfung der untersuchten Rezeptoren erkennbar. Durch den Einfluss des Trainings zeigten sich Unterschiede in der Regulation der Rezeptoren für den Androgen-Rezeptor und den Östrogen-Rezeptor  $\beta$ ; die interessanteste Regulation wies jedoch der Östrogen Rezeptor  $\alpha$  auf. Die mRNA-Konzentration dieses Rezeptors war in 8 Wochen alten Tieren, in Folge des Trainings hochreguliert, in 12 Wochen alten Tieren nicht reguliert und in adulten 24 Wochen alten Tieren herunter reguliert. Dass ER $\alpha$  eine essentielle Rolle im Vermeidungslernen spielt, jedoch nicht im Morris Water Maze Test (zumindest bei männlichen Ratten), zeigte Fugger et al. (1998, 2000). Auch Rissmann et al. (2002) und Liu et al. (2008) zeigten, dass der Einfluss von ER $\beta$  auf das räumliche Lernen in Knock-Out-Mäusen unter Östradiol-Zugabe bedeutend größer scheint, als der von ER $\alpha$ . Jedoch wurden diese Untersuchungen in nicht gonadal intakten Tieren und im

Zusammenhang mit der Gabe von exogenem Östradiol durchgeführt, demnach unter völlig anderen Bedingungen, als in der vorliegenden Studie, in der altersabhängige Effekte von ER $\alpha$  auf lernmodulierende Verhaltenszustände, wie die Motivation, in intakten Tieren gezeigt werden konnten. Die Regulation von kognitiven Prozessen geschieht allerdings eher im Zusammenspiel von Östradiol- und Kortikosteron-bindenden Rezeptoren, wie in den Unterschieden im Referenzgedächtnis und der Genexpression schlechter und guter Lerner deutlich wird. Diese Ergebnisse könnten in Folgestudien weitreichendere Bedeutung für das Verständnis motivationaler Prozesse in jungen männlichen Individuen gewinnen, wie auch in pathologischen Abweichungen wie Hyperaktivität und Aufmerksamkeitsdefiziten. Weiter sollten in diesem Zusammenhang auch BDNF-abhängige Prozesse untersucht werden. In der vorliegenden Untersuchung, zeigt die Regulation des BDNF-Gens ein ähnliches Expressionsmuster in älteren Tieren, wie das von ER $\alpha$  in jüngeren. Die „juvenile“ Rolle von ER $\alpha$  könnte demnach im Laufe der ontogenetischen Entwicklung von BDNF übernommen werden und neue Funktionen von ER $\alpha$  im Alter möglich machen. Dass BDNF einen Einfluss auf das räumliche Lernen hat, wurde bereits vielfach nachgewiesen (Radecki et al., 2005; Mu et al., 1999). Außerdem gibt es Hinweise auf eine simultane Regulation von BDNF und ER $\alpha$ , sowie die gegenseitige Beeinflussung während der hippocampalen Entwicklung (Solum and Handa, 2002; Aguirre and Baudry, 2009). Aguirre und Baudry (2009) konnten zeigen, dass die neuronale Schutzwirkung, welche durch Östradiol induziert wird, über den BDNF-Reaktionsweg vermittelt wird. Solum und Handa (2002) zeigten, dass die, durch die Gonadoektomie hervorgerufene Konzentrationsänderung in der BDNF mRNA und im BDNF Protein, durch die exogene Gabe von Östradiol, wieder normalisiert wird. Sie gehen ebenfalls von einer direkten Interaktion zwischen ER $\alpha$  und BDNF aus, zu Gunsten der hippocampalen Physiologie während deren Entwicklung.

Aufgrund der deutlichen, korrelativen Befunde dieser ersten Untersuchung, die eine wichtige Rolle besonders des *ESR1*-Transkriptes, im Zusammenhang mit einer besseren Performance im Holeboard nahelegen, konzentrierten sich die

anschließenden Arbeiten auf die kausale Identifizierung der Rolle dieses Rezeptors auf die räumliche Lernleistung. So wurde sich im weiteren Verlauf der Arbeit auf dessen Erhöhung konzentriert. Die Ausgangshypothese war, dass die Inhibierung dieses Rezeptors, mittels des spezifischen ER $\alpha$ -selektiven Antagonisten MPP (Sun et al., 2002; Harrington et al., 2003), eine Verschlechterung der Lernleistung bewirken würde. MPP blockiert die Ligand-Bindungstasche des Rezeptors und verhindert somit, sowohl die Funktion als nukleärer, als auch die als Membran-Rezeptor. Durch Gabe dieses Antagonisten werden also, sowohl die etwas langsameren genomischen, als auch die schnellen nicht-genomischen Effekte blockiert. Entgegen dieser Hypothese konnte jedoch eine Dosis-abhängige Verbesserung der Lernleistung festgestellt werden. Zudem ergab sich eine negativ korrelierte Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der Konzentration des Antagonisten und der Genexpression von ER $\alpha$ , als auch anderer Steroidhormonrezeptorgene, u.a. der Gene für MR und AR. Die Verhaltens- und Geneffekte bezogen sich dabei auf den Konzentrationsbereich von 3,7 $\mu$ Mol bis 7,4 $\mu$ Mol MPP, in dem die MPP behandelten Tiere signifikant weniger Zeit benötigen und mehr Pellets fanden als die Kontrolltiere, und die Expression der o.g. Gene signifikant unterdrückt wurde. Diese Effekte gleichen sich jedoch mit einer weiteren Erhöhung der Konzentration auf 12,6  $\mu$ Mol MPP wieder der Kontrollgruppe an. Neben den Unterschieden in den Verhaltensparametern, konnte jedoch kein Effekt in den Lernparametern (Referenz- und Arbeitsgedächtnis) nachgewiesen werden. Da die Auswertung der Anzahl der Lochbesuche pro Sekunde signifikant höhere Werte ergab, lässt sich vermuten, dass hier keine kognitive Leistungssteigerung im engeren Sinne vorliegt, sondern eine nichträumliche Lernstrategie angewendet wurde. Dementsprechend konnte keine Verbesserung des Kurz- und Langzeitgedächtnisses festgestellt werden, vielmehr scheint eine motivationsbedingte Änderung in den Lernleistungsparametern vorzuliegen. Andere, mehr unspezifische Effekte der Behandlung, die die beobachteten Unterschiede erklären könnten, wie etwa die Möglichkeit, dass durch die Manipulation des ER $\alpha$ -Gens auch die sensorische Wahrnehmung verändert

werden könnte, konnten Wersinger und Rissmann (2000) bereits ausschließen. Um darüber hinaus mögliche, unspezifische Änderungen der lokomotorischen Aktivität oder des Explorations- und Angstverhaltens der MPP-behandelten Tiere zu überprüfen, wurden der Open-Field-Test und der „elevated Plus-Maze“-Test durchgeführt. In beiden Standardtests, zum Evaluieren dieser Verhaltenszustände, konnte kein Unterschied zwischen den Tieren, welche mit der effektivsten Konzentration von MPP ( $7,4\mu\text{Mol}$ ) behandelt worden, und den Kontrolltieren nachgewiesen werden. Dies entspricht zum Teil auch den Ergebnissen von Imwalle et al. (2002), welche zu dem Schluss kamen, dass  $\text{ER}\alpha$ -Knock-Out Tiere ein normales lokomotorisches Verhalten zeigen, jedoch Test-abhängig, unterschiedliche emotionale Reaktionen ausprägen. Das Fehlen kognitiver Defizite in MPP behandelten Tieren wurde auch in Untersuchungen genetisch veränderter Mäuse bestätigt. In diesen Tieren wurden Defizite im räumlichen Gedächtnis bei  $\text{ER}\beta$ -Knock-Out Mäusen (Weibchen und Männchen: Day et al., 2005; Weibchen: Rissmann et al., 2002), jedoch nicht in  $\text{ER}\alpha$ -Knock-Out Mäusen (Weibchen und Männchen: Fugger et al., 1998) gefunden. Im Kontrast zu der vorliegenden Untersuchung wurde allerdings auch gezeigt, dass männliche  $\text{ER}\alpha$ -Knock-Out Mäuse, neben einem verringerten Interesse an Weibchen auch ein gesteigertes Angst-, sowie ein vermindertes Explorationsverhalten aufwiesen (Imwalle et al., 2002). Dieses Ergebnis könnte darauf hinweisen, dass im Zuge einer erhöhten Angstreaktion, die Lernleistung dieser Tiere gemindert wird. In der vorliegenden Studie konnte überdies eine positive Korrelation der hippokampalen mRNA Konzentrationen des Östrogen-Rezeptors  $\alpha$  und, schwach signifikant, des Androgenrezeptors, mit der zuvor definierten Verhaltenszustandskomponente ‚Motivation‘ (sie umfasst die Parameter: Zeit zum Finden der Pellets, Anzahl der gefundenen Pellets und den Wandabstand), festgestellt und in dem pharmakologischen Teil der Studie bestätigt werden. Eine mögliche funktionale Verknüpfung dieser beiden Rezeptoren kann über spezifische Liganden realisiert werden. So ist hinlänglich bekannt, dass Testosteron mittels Aromatase direkt in Östradiol aromatisiert werden kann (Garcia-Segura, 2008). Zudem bewirkt die

Metabolisierung von Testosteron, in  $3\alpha$ -Diol oder  $3\beta$ -Diol, die Bildung weiterer Liganden, die selektiv von ER $\beta$  gebunden werden können (Osborne et al., 2009) und somit zur Verschiebung der relativen Aktivierungen von ER $\alpha$  und ER $\beta$  führen kann. Die Untersuchungen zu Einflüssen von Testosteron, sowie dessen Rezeptor und dem räumlichen Lernen beschränken sich allerdings wieder, zumeist, auf kastrierte Versuchstiere (Kritzer et al., 2001; Gibbs, 2005; Sandstrom et al., 2006; Spritzer et al., 2008).

Wie oben bereits erwähnt, spiegelte die Analyse der relativen Genexpression in MPP behandelten Tieren die Dosis-Wirkungs-Beziehung ebenfalls wider. Die antagonistische Repression des ER $\alpha$ , führte nicht nur zu einer verminderten Expression des direkt betroffenen Rezeptors, auch die Kortikosteron-Rezeptoren (MR und GR), der Androgen Rezeptor und die Transkription des BDNF-Gens wurden in vergleichbaren Mustern beeinflusst. ER $\beta$  zeigte nur eine teilweise, die mRNA-Konzentration des Aromatase-Gen dagegen, keinerlei Regulation. Eine verknüpfte Regulation von ER $\alpha$ , AR, MR und GR unter Einfluss des räumlichen Lernens scheint demnach auch durch diese Teilstudie bestätigt. Aufgrund der Funktion der Rezeptoren als Transkriptionsfaktor, ist es durchaus möglich, dass die Rezeptoren Zielgene füreinander darstellen, die sich gegenseitig in ihrer Expression, sowohl direkt als auch indirekt, beeinflussen können. Auch die, oben beschriebene, Bildung von Dimeren macht eine gemeinsame Regulation sehr wahrscheinlich. In der Literatur ist in diesem Zusammenhang, also der Regulation anderer Steroidrezeptorgene durch ER $\alpha$ -Inhibierung, noch nahezu nichts beschrieben und erfordert demnach noch eine ausgeprägte Analyse dieser Thematik. Die Untersuchungen zu Hormonkonzentrationen, unter dem Einfluss der Manipulation des Östrogen-Rezeptor, sind ebenfalls rar. Es ist jedoch beschrieben, dass die Konzentration des männlichen Sexualhormons Testosteron in ER-Knock-Out Mäusen mehr als doppelt so hoch ist, wie in Wildtyp-Tieren (Eddy et al., 1996; Rissmann et al., 1997) und diese chronische Erhöhung zu verminderten Kortikosteron-Konzentrationen führen kann (Orr and Mann, 1992; Monder et al., 1994). In unseren Untersuchungen konnte diese Beobachtung bei kurzfristiger

Blockierung des ER $\alpha$  nicht bestätigt werden. Sowohl die 17- $\beta$ -Östradiol-, die Testosteron-, als auch die Serum-Kortikosteron-Konzentration zeigten keine Veränderung in Folge der MPP-Behandlung. Nur die Kortikosteron-Konzentration in den beiden untersuchten Hirnregionen zeigte eine signifikante Erhöhung in den mit 3,7 $\mu$ Mol behandelten Tieren. Es ist jedoch nicht auszuschließen, und aufgrund des höheren Standardfehlers sogar wahrscheinlich, dass diese Erhöhung von einigen wenigen Tieren, welche eventuell durch andere Stressoren beeinflusst wurden, hervorgerufen wurde.

Um zu überprüfen, ob die altersabhängigen Effekte der Regulation von ER $\alpha$  sich auch in den jungen 8 Wochen alten Tieren, in Abhängigkeit von der Lernleistung widerspiegeln, wurden in dieser Altersgruppe gute und schlechte Lerner verglichen. Angesichts eines weiteren Experimentes, zeigten die entsprechenden, 8 Wochen alten Kontrolltiere, ein signifikant schlechteres Lernverhalten, im Vergleich zu den 8 Wochen alten Kontrolltieren der ersten Teilstudie. Dies bevorteilte die Möglichkeit des direkten Vergleichs in Verhaltens- und Lernparametern, sowie der Genexpression der relevanten Rezeptoren. Die im Folgenden als gute Lerner bezeichnete Versuchsgruppe, unterschied sich von der Versuchsgruppe der schlechten Lerner lediglich durch die einmalige Injektion von 40% Probandiol, welches nachweislich keinen Einfluss auf die Regulation der hier untersuchten Hormone und Rezeptoren (Meyer and Korz, 2013), sowie die kurz- und langfristige synaptische Plastizität (Schulz and Korz, 2010) hat. Die schlechten Lerner zeigten eine signifikant schlechtere Leistung in den Verhaltensparametern: Zeit zum Finden aller Pellets, Anzahl gefundener Pellets und zurückgelegter Weg; unterschieden sich jedoch nicht in dem Parameter Geschwindigkeit, der sich zwischen den Altersgruppen noch unterschied. Dies spricht dafür, dass die schlechten Lerner nicht, aufgrund lokomotorischer Defizite langsamer lernten. Die guten Lerner zeichnen sich durch ein signifikant besseres Referenzgedächtnis im Vergleich zu den schlechten Lernern aus. Das Arbeits- bzw. Kurzzeitgedächtnis ist dagegen vergleichbar. Die Abhängigkeit der AR und ER $\alpha$ -Transkription von der Lernleistung des Tieres, konnte in diesem Experiment ebenfalls bestätigt werden. Auch der im

vorhergehenden Versuch zeigte Trend, dass MR durch das Training induziert wird, zeigt sich durch signifikante Unterschiede im Vergleich der guten und schlechten Lerner. Diese Ergebnisse deuten wiederum auf den Umstand einer konzertierten Expression und wahrscheinlichen Interaktion der Steroidhormonrezeptoren in der Ausbildung eines räumlichen Gedächtnisses, das heißt sowohl ER $\alpha$ , AR, als auch MR sind vermutlich gemeinschaftlich in der Realisierung des Lernvorganges, durch die Regulation motivationaler Prozesse und der Etablierung eines räumlichen Langzeitgedächtnisses, durch die Modulation kognitiver Vorgänge, involviert. Die bisherigen Studien beschränkten sich auf die Untersuchung einzelner Rezeptoren und deren kognitive Funktionen (MR: Yau et al., 1999; Korz and Frey, 2007; GR: Roozendaal et al., 2004; ER $\alpha$ : Rissmann et al., 1999; ER $\beta$ : Rissmann et al., 2002, Day et al., 2005; AR: Kerr et al., 1996; Janowsky et al., 1994) und lassen somit nur schwer, direkte Zusammenhänge zwischen den einzelnen Rezeptoren erkennen.

Die unerwartete Reaktion im Verhalten der Tiere, welche mit dem ER $\alpha$ -Antagonist MPP behandelt wurden, führte desweiteren zu der Frage, welche Funktion die Erhöhung des ER $\alpha$ -Levels durch das Training hat, wenn dessen Blockung, entgegen der aufgestellten Hypothese, wiederum keine Verschlechterung der Lernleistung bewirkte. Eine Möglichkeit der genaueren Untersuchung dieser Thematik, bietet die Differenzierung zwischen den schnellen nicht-genomischen und den etwas langsameren genomischen Effekten, mittels zweier verschiedener Antagonisten (beide Effekte blockiert durch MPP, selektiv nur genomische Effekte blockiert durch TPBM - Theophylline,8-[(benzylthio)methyl]). Diese Untersuchungen wurden bereits durchgeführt, leider konnten aufgrund von Lösungsmittelleffekten bisher noch keine aussagekräftigen Ergebnisse für den selektiven ER $\alpha$ -Antagonisten TBPM generiert werden. Es bleibt die Möglichkeit der näheren Untersuchung der Konzentrationsbestimmung der hier untersuchten Rezeptoren, mittels der Western-Blot-Analyse. Dieses Verfahren bietet die Möglichkeit, innerhalb des untersuchten Gewebes, zwischen der Membran-Fraktion und der cytosolischen Fraktion zu unterscheiden, und erlaubt somit, zwischen der im Cytosol vorliegenden nuklearen Rezeptor-Form (diese wird nach Bindung eines Liganden in den Kern transloziert)

und der Membran-ständigen Membran-Rezeptor-Form zu unterscheiden. Entgegen der erwarteten erhöhten ER $\alpha$ -Protein-Konzentration, infolge der herauf regulierten mRNA durch das räumlichen Lernen, konnte die Western-Blot-Analyse diese Ergebnisse nicht bestätigen. Im Gegenteil, die ER $\alpha$ -Konzentration in der cytosolischen Fraktion ist in trainierten Tieren sogar niedriger als in den untrainierten Kontrolltieren. Dies gilt ebenfalls für beide Formen des Glukokortikoid-Rezeptors, dessen mRNA-Level in der vorangegangenen Studie jedoch keine erhöhte Expression in Folge des Trainings zeigte. Lediglich die Membran-gebundene Form des Mineralokortikoid-Rezeptors wird durch die Darbietung der Lernaufgabe vermehrt translatiert, wobei die Induktion der Genexpression ebenfalls nur knapp unter der Signifikanz-Grenze lag. Diese Ergebnisse zeigen eine weitere Ebene der Regulation auf. So wird die Expression des ER $\alpha$ -Gens in acht Wochen alten männlichen Wistar-Ratten offensichtlich durch die Absolvierung der Lernaufgabe im Holeboard-Test induziert, jedoch im weiteren Verlauf nicht translatiert. Eine Erklärungsmöglichkeit für diese Diskrepanz besteht in der Fähigkeit der Zellen, einen sogenannten mRNA-Pool anzulegen, welcher dann im Falle der Notwendigkeit, innerhalb kürzester Zeit, mittels eines extrazellulären Signals, Transkripte für die Proteinsynthese zur Verfügung stellt (Richter and Lorenz, 2002). So scheint es im Weiteren möglich, dass dieses extrazelluläre Signal (Kortikosteron) durch membrangebundene Mineralokortikoid-Rezeptoren über Kinase-Kaskaden vermittelt wird und die lokale Translation der ER $\alpha$ -mRNA induziert. Dies wäre ein Mechanismus zur schnellen ER $\alpha$ -Reaktion auf geänderte Umweltreize. Dass der Mineralokortikoid-Rezeptor eine wichtige Rolle beim Holeboard-Training spielt (Korz et al., 2007) und ebenfalls sensibler auf akuten Stress reagiert (Ahmed et al., 2006), ist bereits bekannt. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass MR bei der Vermittlung von Lernstrategien eine zentrale Rolle spielt (ter Horst et al., 2012). So könnte der Membran-ständige MR die schnelle Schaltstelle sein, die verschiedene Lernstrategien vermittelt und mit Hilfe von ER $\alpha$  die Motivationsregulation steuert, indem überhöhte Motivation verhindert und eine angemessene Balance zwischen Motivation und Risikobereitschaft eingehalten

wird. Fehlt eben dieser „Puffer“, in der vorliegenden Studie aufgrund des ER $\alpha$ -Antagonisten MPP, so kann die Balance nicht weiter gehalten werden und das Ungleichgewicht verschiebt sich auf die Seite einer überhöhten und lebensgefährlichen Motivation (Abbildung 35). Dies würde ebenfalls die schnellere Absolvierung der Lernaufgabe der MPP-behandelten Tiere, ohne eine direkte Verbesserung der Gedächtnisleistung erklären können.

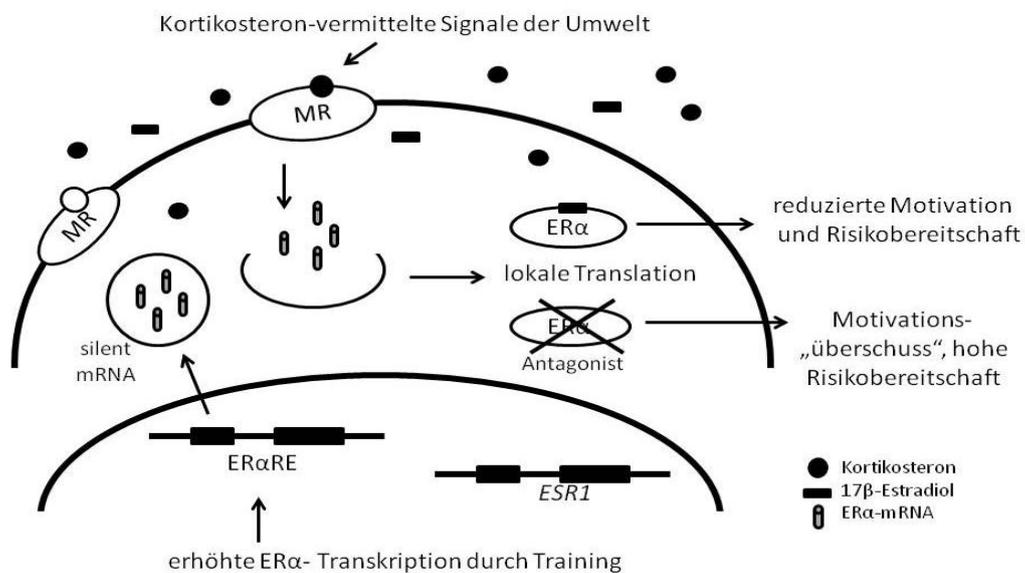


Abbildung 35 Schematische Darstellung der möglichen Kopplung zwischen ER $\alpha$  und MR zum Erhalt der Motivationsbalance; im Falle der Blockierung von ER $\alpha$  verschiebt sich die Balance zu Gunsten erhöhter Risikobereitschaft

Somit scheint ER $\alpha$  nicht direkt in die Verarbeitung und Speicherung kognitiver Vorgänge, wie das räumliche Lernen, involviert zu sein; beeinflusst diesen Prozess jedoch maßgeblich durch die Vermittlung von Motivationszuständen und bewahrt das Tier somit vor lebensgefährlichen, bzw. über-motivierten Handlungen. Eine weitere Bestätigung dieser Hypothese ist die zeitliche Begrenzung, in dem sich die Überexpression von ER $\alpha$  nachweisen ließ. So zeigten 12 Wochen alte Tiere bereits keine Induktion der Expression von ER $\alpha$  in Folge des Trainings und adulte, 24 Wochen alte Tiere sogar eine verminderte ER $\alpha$ -Expression. Nur im kritischen

Zeitfenster, entsprechend der Periode des Verlassens der sozialen Einheit und des Explorierens neuer Umwelten, scheint diese Regulation eine essentielle Rolle zu spielen.

Neben diesen Erkenntnissen bleibt die Frage nach der Dosis-Wirkungs-Beziehung der MPP-Behandlung in der höchsten Konzentration. Im Vergleich zu den beiden wirkungsvollsten Konzentrationen von 3,7 $\mu$ Mol und 7,4 $\mu$ Mol MPP verringerte sich sowohl der genetische Effekt des GR und MR, als auch die Änderung im Verhalten, der mit 12,6 $\mu$ Mol behandelten Tiere auf das Kontroll-Niveau. Außerdem zeigt die Genexpression von BDNF eine starke Hochregulation, zwar nicht signifikant, dennoch im Trend höher als in den Kontrollgruppen. Wie oben erwähnt, ist bereits bekannt, dass eine gemeinsame Regulation von ER $\alpha$ , bzw. Östradiol, und BDNF nachzuweisen ist. Sohrabji et al. (1995) konnten zeigen, dass der Promotor des BDNF-Gen über Östrogen-Bindemotive verfügt, welche über Östrogen-Ligand gebundene Rezeptoren, die Proteinsynthese dieses Neurotrophins regulieren kann. Es ist daher wahrscheinlich, dass statt der Regulation der Östradiol-induzierten Prozesse über den Östrogen-Rezeptor  $\alpha$ , alternative Wirkungswege über andere Östrogen-bindende Rezeptoren und BDNF vermittelt werden. Diese „Funktionsrettung“ könnte im Weiteren dann auch die Normalisierung der Expression der Kortikosteron-bindenden Rezeptoren bedingen; und somit ebenfalls das, den Kontrolltieren ähnliche, Verhalten nivellieren.

All diese neuen Erkenntnisse sind dennoch nur Bruchstücke des komplexen Lernvorgangs. Die Applikation des ER $\alpha$ -Antagonisten MPP über den rechten Ventrikel bedingt, neben den hippokampalen Effekten, selbstverständlich weitere Änderungen im gesamten System. So ist auch eine Veränderung der Steroidfunktionen, in den am Lernprozess möglicherweise beteiligten Hirnregionen, wie etwa Amygdala und Hypothalamus wahrscheinlich. Außerdem gibt es eine Vielzahl anderer Rezeptoren, die ebenfalls Teil dieses Systems sind, welche bisher noch keine intensive Beachtung gefunden haben, bzw. in dieser Studie nicht untersucht wurden. Leider ist es nicht möglich, im Rahmen einer einzelnen Studie,

diese diffizilen Vorgänge zu entschlüsseln. Im Weiteren könnten durch zusätzliche pharmakologische Behandlungen, z.B. mit dem ER $\alpha$ -Antagonisten TPBM, welcher mittels Bindung an das DNA-Bindemotiv ausschließlich die genomischen Effekte dieses Rezeptors blockt, oder anderen Rezeptor-Antagonisten, neue Erkenntnisse gewonnen werden. Auch die elegante Methode der In-Situ-Hybridisierung könnte durch die Visualisierung der Rezeptor-Verteilung in ausgewählten Hirnregionen, z.B. nach der Absolvierung unterschiedlicher Lernparadigmen, tiefere Einblicke in die Regulation bestimmter Verhaltensweisen und Lernvorgänge in jungen Ratten schaffen.

Die vorliegende Arbeit diene im Wesentlichen der Generierung einer Datengrundlage zu Steroidfunktionen in der Regulation von Verhalten, besonders von Östrogenfunktionen in männlichen Individuen, über die sehr wenig bekannt ist. Aufgrund der vorliegenden Arbeit können nun gezielt Hypothesen formuliert und in weiteren Untersuchungen beantwortet werden: wie, z.B. die Frage nach altersabhängigen Funktionsänderungen des ER $\alpha$  in der Verhaltensmodulation; dessen Verteilung und funktioneller Beitrag zur Verhaltenssteuerung in verschiedenen Hirngebieten, die Identifizierung der Mechanismen der Verknüpfung des „Steroidnetzwerkes“. Zusammenfassend ist zu sagen, dass der Motivation und dem Lernen in post-pubertären, sozial noch nicht voll entwickelten, männlichen Ratten eine andere Regulation zu Grunde zu liegen scheint, als in älteren Tieren. Zukünftige Studien über das Steroidnetzwerk, im Zusammenspiel mit kognitiven Vorgängen, sind daher nicht nur hoch interessant, sondern könnten ebenfalls unerlässliche Informationen für die Human-Forschung erbringen. So könnte beispielweise ein Zusammenhang der, aktuell diskutierten, Erhöhung des Östrogen-Spiegels in der Umwelt, mit dem zeitgleichen Anstieg an ADHS-Diagnosen bei männlichen Kindern, bestehen und näher beleuchtet werden.

## Zusammenfassung

Steroidhormone und –rezeptoren sind wichtige Modulatoren der synaptischen Plastizität und involviert in Lernprozesse und Gedächtnisformierung. Während die Rolle adrenaler Hormone und deren Rezeptoren in diesem Zusammenhang bereits gut untersucht sind, ist die der gonadalen Hormone noch wenig verstanden. Insbesondere die Modulationen und die Funktionen von Östradiol und Östrogenrezeptoren in männlichen Individuen sind wenig untersucht. Testosteron kann in männlichen Gehirnen durch das Enzym Aromatase in Östradiol überführt werden, dessen Rezeptoren ebenfalls in größerer Dichte im Hippokampus, Hypothalamus und anderen Gebieten des männlichen Gehirnes vorliegen. Ziel der vorliegenden Studie war die Erstellung einer Datenbasis zu der Regulation der Östrogenrezeptoren und Steroidhormone im Hippokampus männlicher Ratten während der Absolvierung einer räumlichen Lernaufgabe. Da diese Rezeptoren nicht unabhängig von anderen Steroidrezeptoren und Hormonen reguliert werden, wurden weitere „klassische“ Rezeptoren und Hormone in die Studie eingeschlossen. Der Fokus lag auf der Regulation der Steroidhormone 17- $\beta$ -Östradiol, Testosteron und Kortikosteron und der hippokampalen Genexpression ihrer spezifischen Rezeptoren (die Östradiolrezeptoren alpha und beta: ER $\alpha$  und ER $\beta$ ; der Androgenrezeptor: AR; sowie der Mineralokortikoidrezeptor und der Glukokortikoidrezeptor: MR und GR). Zudem wurde die Genexpression des neurotrophen Wachstumsfaktors (BDNF) und des Aromatase-Gens (Cyp19) analysiert. Im Gegensatz zu der beträchtlichen Literatur über die einzelnen Steroidhormone oder deren Rezeptoren, im Zusammenhang mit neuronaler oder synaptischer Plastizität, räumlichem Lernen oder der Angstkonditionierung in gonadal- oder adrenaletomierten Tieren, wurde in dieser Studie ein breiteres Spektrum an regulatorischen Faktoren in gonadal und adrenal intakten Tieren untersucht. Dies hat den Vorteil, Änderungen im Gen- und Hormonhaushalt unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Im ersten Teil der Studie wurde das räumliche Lernverhalten, sowie die Expression verschiedener Gene und Steroidhormonkonzentrationen in männlichen Wistar Ratten, in Abhängigkeit vom ontogenetischen Reifegrad untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass bereits auf der Verhaltensebene deutliche Unterschiede zwischen den sexuell reifen, jedoch sozial noch nicht voll entwickelten, 8 Wochen alten Tieren und den älteren 12 Wochen alten (sozial nahezu ausgeift) und 24 Wochen alten (sozial adult) Tieren nachzuweisen waren.

Desweiteren wiesen diese postpubertären Tiere ein besseres Referenz-, also Langzeitgedächtnis, auf, als die spät-adoleszente und die adulte Versuchsgruppe. Das räumliche Training induzierte eine erhöhte Transkription des ER $\alpha$  in 8 Wochen alten Tieren, in 12 Wochen alten Tieren zeigte es keinen Einfluss und in 24 Wochen alten Tieren hatte es die Herabregulation zur Folge.

Aufgrund dieser Ergebnisse, wurden im weiteren Verlauf die 8 Wochen alten Tiere detaillierter untersucht. Die Analyse der Proteinkonzentrationen der Steroidkomplexe zeigte, dass trotz der erhöhten ER $\alpha$ -mRNA-Konzentration, keine erhöhte Proteinsynthese des cytosolischen Rezeptors durch das Training induziert wurde, sondern sogar eine Herabregulation; die der membrangebundenen Rezeptoren zeigten ebenfalls keine Unterschiede. Der membrangebundene MR, welcher im Trend nach dem Training stärker transkribiert wurde, lag dagegen in höheren Proteinkonzentrationen vor, während bei den cytosolischen Rezeptorproteinen keine Unterschiede zwischen trainierten und nicht-trainierten Tieren festgestellt werden konnte. Der Vergleich von guten und schlechten Lernern, letztere wiesen ein signifikant schlechteres Referenzgedächtnis auf, zeigte dagegen, dass ohne erfolgreiche kognitive Stimulation, weder der ER $\alpha$  noch der MR in ihrer Genexpression beeinflusst werden.

Um die Funktion des induzierten ER $\alpha$  noch genauer einzugrenzen, wurde ergänzend ein ER $\alpha$ -Antagonist, welcher sowohl die nukleäre (genomische) Funktion, als auch die Funktion als Membran-Rezeptor (nicht- genomisch) inhibiert, subchronisch über 7 Tage in den rechten Ventrikel injiziert. Die Ergebnisse zeigten eine Dosis-Wirkungs-Beziehung, sowohl im Verhalten, als auch eine negative Korrelation in der Genexpression des ER $\alpha$ , der Rezeptoren für Kortikosteron und Testosteron und für BDNF. Entgegen der Hypothese, dass die Repression des ER $\alpha$  eine Verminderung der Lernleistung zur Folge hat, konnte gezeigt werden, dass ab einer Konzentration von 3,7 $\mu$ Mol bis zu einer Konzentration von 7,4 $\mu$ Mol MPP eine fördernde Wirkung auf die Verhaltensparameter vorlag, jedoch kein Einfluss auf die beiden Gedächtnisformen (Referenz- und Arbeitsgedächtnis) festgestellt werden konnte.

Zusammenfassend ließen diese Befunde die Hypothese zu, dass ER $\alpha$  keinen direkten Einfluss auf die kognitiven Prozesse beim räumlichen Lernen hat, jedoch die Motivationszustände der postpubertären männlichen Tiere entscheidend beeinflusst. Es wird daher hypothetisiert, dass die ER $\alpha$ -Transkripte in einem mRNA-Pool vorliegen, die durch extrazelluläre Stimulation, vermutlich durch membrangebundene MR via Kortikosteron, in risikoreichen Situationen, lokal in Proteine umgeschrieben werden und so die Risikobereitschaft der postpubertären Tiere drosselt. Im Falle der Inhibierung des ER $\alpha$  kann diese Motivationsregulation nicht mehr erfolgen, sodass die Tiere eine höhere Risikobereitschaft zeigen, wobei

die kognitive Verarbeitung eingehender Informationen nicht direkt beeinflusst wird. Diese Hypothese soll in nachfolgenden Studien überprüft werden.

Diese Erkenntnisse könnten auch klinische Relevanz erhalten, etwa durch einen Zusammenhang zwischen der steigenden „Verunreinigung“ der Umwelt durch künstliche Östrogene und dem Anstieg an ADHS-Diagnosen in männlichen Kindern und bilden somit auch eine wichtige Grundlage für die Humanforschung.

## Summary

Steroid hormones and receptors are important modulators of synaptic plasticity and are involved in learning processes and memory formation. While the role of adrenal hormones and their receptors have been well studied in this context, the role of gonadal hormones is still poorly understood. Specifically, the modulation and the functions of estradiol and estrogen receptors in male individuals are less investigated. Testosterone can be converted to estradiol by the aromatase enzyme in brains of male rats; the related receptors are available in higher density in the hippocampus, hypothalamus and other parts of the male brain. The aim of the present study was to establish a data base for the regulation of estrogen receptors and steroid hormones in the hippocampus of male rats during the completion of a spatial learning task. Since these receptors were not regulated independently of other steroid receptors and hormones, also more "classical" receptors and hormones were included in this study. The focus was on the regulation of the steroid hormones 17- $\beta$ -estradiol, testosterone and corticosterone, as well as the hippocampal gene expression of their receptors (the estradiol receptors alpha and beta: ER $\alpha$  and ER $\beta$ , and the androgen receptor AR, and mineralocorticoid receptor and the glucocorticoid receptor: MR and GR). In addition, the gene expression of the neurotrophic growth factor (BDNF) and the aromatase gene (CYP19) was analyzed. In contrast to the considerable literature using gonadal- or adrenalectomized animals to study the role of steroid hormones and their receptors in neuronal or synaptic plasticity, spatial learning, or fear conditioning, this study aimed to investigate regulatory factors under more physiological conditions in gonadal and adrenal intact animals. In the first part of the study the spatial learning behavior, as well as the expression of various genes, and steroid hormone levels as a function of maturity of ontogeny in male Wistar rats were analyzed.

It was shown at the behavioral level, regarding the motivation and the spatial cognition, significant differences between sexually mature but socially not yet fully developed, 8 week old animals and the older 12 week old (socially almost mature) and 24 week old (social adult) animals were detectable. Furthermore, post-pubertal 8 week old animals had a better reference memory, thus long-term memory, as the late-adolescent and adult experimental group. At the molecular level, the spatial training induced an upregulation in the transcription of ER $\alpha$  in 8 weeks old rats; in 12 weeks old animals it had no effect; and in 24 week old animals a down regulation was induced by the training. Based on these results, the 8 week old animals were examined in more detail in the second part of the study. The analysis of the concentrations of the steroid receptor protein complex indicated that, despite the elevated ER $\alpha$  mRNA concentration in 8 week old trained animals, no increase but a decrease in cytosolic receptor protein synthesis could be determined; while the membrane-bound receptors protein levels were not different between trained and untrained rats. The concentrations of protein complexes of membrane-bound MR in contrast, for which a trend to a training induced upregulation of

transcription was found, were significantly higher; whereas no differences between trained and non-trained animals could be detected in the cytosolic MR receptor proteins. In 8 week old poor learners, characterized by reduced motivation and spatial cognition, showed significantly reduced ER $\alpha$  and MR expression when compared to 8 week old good learners.

To examine the function of ER $\alpha$  in more detail, an ER $\alpha$  antagonist which blocks both, the nuclear (genomic) function, and the function as a membrane receptor (non-genomic), was injected subchronically (for 7 days) in the right ventricle. The results showed a dose-response relation for the behavioral parameters and a negative correlation in gene expression of ER $\alpha$ , the receptors for corticosterone and testosterone and BDNF. Contrary to the hypothesis that the repression of the ER $\alpha$  results in a reduction in learning performance, it was shown that at a concentration of 3.7  $\mu$ mol up to a concentration of 7.4  $\mu$ mol MPP promoted the behavioral parameters indicating motivation, whereas, no difference in the two forms of memory (reference and working memory) could be detected in comparison to vehicle treated animals.

In summary, these findings lead us to hypothesize that ER $\alpha$  has no direct effect on the cognitive processes involved in spatial learning; however ER $\alpha$  has a crucial impact on the states of motivation in post-pubertal males. ER $\alpha$  transcripts may be stored in form of a mRNA pool, which can be translated in proteins locally by extracellular stimulation, presumably by membrane-bound MR via corticosterone in risky situations and thus restricts the over-motivated behavior of young post-pubertal animals. In the case of inhibition of ER $\alpha$  this motivation regulation cannot take place. In addition, MR may serve as a molecular switch, also for the regulation of spatial cognition, through other pathways than ER $\alpha$  mediated ones. These hypotheses will be tested in subsequent studies.

These findings could also receive clinical relevance, such as a link between the increase of the "contamination" of the environment by artificial estrogens and the rise in ADHD diagnoses in male children and thus form an important basis for human research.

## Literaturverzeichnis

**Aarnisalo P, Palvimo JJ, Jänne OA.** CREB-binding protein in androgen receptor-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(5):2122-7.

**Adams N, Boice R.** Development of dominance in domestic rats in laboratory and seminatural environments. *Behav Prozesses* 1998; 19: 127-142

**Aguirre CC, Baudry M.** Progesterone reverses 17beta-estradiol-mediated neuroprotection and BDNF induction in cultured hippocampal slices. *Eur J Neurosci.* 2009; 29(3):447-54.

**Ahmed T, Frey JU, Korz V.** Long-term effects of brief acute stress on cellular signaling and hippocampal LTP. *J Neurosci.* 2006; 26(15):3951-8.

**Alejandro-Gomez M, Garcia-Segura LM, Gonzalez-Burgos I.** Administration of an inhibitor of estrogen biosynthesis facilitates working memory acquisition in male rats. *Neurosci Res.* 2007; 58(3):272-7.

**Alger BE, Teyler TJ.** Long-term and short-term plasticity in the CA1, CA3, and dentate regions of the rat hippocampal slice. *Brain Res.* 1976; 110(3):463-80.

**Allen AL, McCarson KE.** Estrogen increases nociception-evoked brain-derived neurotrophic factor gene expression in the female rat. *Neuroendocrinology.* 2005; 81(3):193-9.

**Anagnostaras SG, Gale GD, Fanselow MS.** Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippokampus.* 2001; 11(1):8-17.

**Andersen SL.** Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev.* 2003; 27(1-2):3-18.

**Anton-Tay F, Wurtman RJ.** Norepinephrine: turnover in rat brains after gonadectomy. *Science.* 1968; 159(3820):1245.

**Arimatsu Y, Hatanaka H.** Estrogen treatment enhances survival of cultured fetal rat amygdala neurons in a defined medium. *Brain Res.* 1986; 391(1):151-9.

**Arnold SE, Trojanowski JQ.** Human fetal hippocampal development: II. The neuronal cytoskeleton. *J Comp Neurol.* 1996; 367(2):293-307.

**Baddeley AD.** Short-term memory for word sequences as a function of acoustic, semantic and formal similarity. *Q J Exp Psychol.* 1966; 18(4):362-5.

- Baddeley AD.** The influence of acoustic and semantic similarity on long-term memory for word sequences. *Q J Exp Psychol.* 1966; 18(4):302-9.
- Bakker J, Baum MJ.** Role for estradiol in female-typical brain and behavioral sexual differentiation. *Front Neuroendocrinol.* 2008; 29(1):1-16.
- Ball GF, Balthazart J.** Hormonal regulation of brain circuits mediating male sexual behavior in birds. *Physiol Behav.* 2004; 83(2):329-46.
- Bear MF, Abraham WC.** Long-term depression in Hippokampus. *Annu Rev Neurosci.* 1996; 19:437-62.
- Bear MF, Malenka RC.** Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol.* 1994; 4(3):389-99.
- Beato M, Herrlich P, Schütz G.** Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell.* 1995; 83(6):851-7.
- Beato M.** Gene regulation by steroid hormones. *Cell.* 1989; 56(3):335-44.
- Beyenburg S, Watzka M, Clusmann H, Blümcke I, Bidlingmaier F, Elger CE, Stoffel-Wagner B.** Androgen receptor mRNA expression in the human Hippokampus. *Neurosci Lett.* 2000; 294(1):25-8.
- Bliss TV, Collingridge GL.** A synaptic model of memory: long-term potentiation in the Hippokampus. *Nature.* 1993; 361(6407):31-9.
- Boissier JR, Simon P.** [The exploration reaction in the mouse. Preliminary note]. *Therapie.* 1962; 17:1225-32.
- Bradbury MJ, Akana SF, Dallman MF.** Roles of type I and II corticosteroid receptors in regulation of basal activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during the diurnal trough and the peak: evidence for a nonadditive effect of combined receptor occupation. *Endocrinology.* 1994; 134(3):1286-96.
- Broadus WC, Bennett JP Jr.** Postnatal development of striatal dopamine function. I. An examination of D1 and D2 receptors, adenylate cyclase regulation and presynaptic dopamine markers. *Brain Res Dev Brain Res.* 1990; 52(1-2):265-71.
- Burgess LH, Handa RJ.** Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and Glukokortikoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinology.* 1992; 131(3):1261-9.

**Chang LL, Kau MM, Wun WS, Ho LT, Wang PS.** Effects of fasting on corticosterone production by zona fasciculata-reticularis cells in ovariectomized rats. *J Investig Med.* 2002; 50(2):86-94.

**Chen Sy, Wang J, Yu Gq, Liu W, Pearce D.** Androgen and Glukokortikoid receptor heterodimer formation. A possible mechanism for mutual inhibition of transcriptional activity. *J Biol Chem.* 1997; 272(22):14087-92.

**Choi S, Kellogg CK.** Norepinephrine utilization in the hypothalamus of the male rat during adolescent development. *Dev Neurosci.* 1992; 14(5-6):369-76.

**Chowen JA, Torres-Alemán I, García-Segura LM.** Trophic effects of estradiol on fetal rat hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology.* 1992; 56(6):895-901.

**Collingridge GL.** Long term potentiation in the Hippokampus: mechanisms of initiation and modulation by neurotransmitters. *Trends Pharmacol Sci.* 1985; (6): 407-411

**Córdoba Montoya DA, Carrer HF.** Estrogen facilitates induction of long term potentiation in the Hippokampus of awake rats. *Brain Res.* 1997; 778(2):430-8.

**Cornil CA, Charlier TD.** Rapid behavioural effects of oestrogens and fast regulation of their local synthesis by brain aromatase. *Neuroendocrinol.* 2010; 22(7):664-73.

**Coulter DA, Yue C, Ang CW, Weissinger F, Goldberg E, Hsu FC, Carlson GC, Takano H.** Hippokampal microcircuit dynamics probed using optical imaging approaches. *J Physiol.* 2011; 589(Pt 8):1893-903.

**Cross E, Roselli CE.** 17beta-estradiol rapidly facilitates chemoinvestigation and mounting in castrated male rats. *Am J Physiol.* 1999; 276(5 Pt 2):R1346-50.

**Cvoro A, Tzagarakis-Foster C, Tatomer D, Paruthiyil S, Fox MS, Leitman DC.** Distinct roles of unliganded and liganded estrogen receptors in transcriptional repression. *Mol Cell.* 2006; 21(4):555-64.

**Cvoro A, Yuan C, Paruthiyil S, Miller OH, Yamamoto KR, Leitman DC.** Cross talk between Glukokortikoid and estrogen receptors occurs at a subset of proinflammatory genes. *J Immunol.* 2011; 186(7):4354-60.

**Day M, Sung A, Logue S, Bowlby M, Arias R.** Beta estrogen receptor knockout (BERKO) mice present attenuated hippokampal CA1 long-term potentiation and related memory deficits in contextual fear conditioning. *Behav Brain Res.* 2005; 164(1):128-31.

**de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F.** Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6(6):463-75.

**de Kloet ER, Oitzl MS, Joëls M.** Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci.* 1999; 22(10):422-6.

**de Kloet ER.** Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. *Frontiers Neuroendocrinol.* 1991; 12: 95-164

**Dedovic K, Duchesne A, Andrews J, Engert V, Pruessner JC.** The brain and the stress axis: the neural correlates of cortisol regulation in response to stress. *Neuroimage.* 2009; 47 (3):864-71.

**Diamond DM, Campbell AM, Park CR, Halonen J, Zoladz PR.** The temporal dynamics model of emotional memory processing: a synthesis on the neurobiological basis of stress-induced amnesia, flashbulb and traumatic memories, and the Yerkes-Dodson law. *Neural Plast.* 2007; 2007:60803

**Diamond MI, Miner JN, Yoshinaga SK, Yamamoto KR.** Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science.* 1990; 249(4974):1266-72.

**Dubrovsky B, Gijsbers K, Filipini D, Birmingham MK.** Effects of adrenocortical steroids on long-term potentiation in the limbic system: basic mechanisms and behavioral consequences. *Cell Mol Neurobiol.* 1993; 13(4):399-414.

**Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB, Korach KS.** Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology.* 1996; 137(11):4796-805.

**El Faza S, Gharbi N, Kamoun A, Somody L.** Vasopressin and A1 noradrenaline turnover during food or water deprivation in the rat. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2000 Jun;126(2):129-37.

**Evans RM.** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 1988; 240(4854):889-95.

**Ferbinteanu J, McDonald RJ.** Dorsal/ventral Hippokampus, fornix, and conditioned place preference. *Hippokampus.* 2001; 11(2):187-200.

**Ferbinteanu J, Ray C, McDonald RJ.** Both dorsal and ventral Hippokampus contribute to spatial learning in Long-Evans rats. *Neurosci Lett.* 2003; 345(2):131-5.

**Filipini D, Gijsbers K, Birmingham MK, Dubrovsky B.** Effects of adrenal steroids and their reduced metabolites on hippocampal long-term potentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1991; 40(1-3):87-92.

**Flood JF, Morley JE, Roberts E.** Memory-enhancing effects in male mice of pregnenolone and steroids metabolically derived from it. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(5):1567-71.

**Foidart A, Reid J, Absil P, Yoshimura N, Harada N, Balthazart J.** Critical re-examination of the distribution of aromatase-immunoreactive cells in the quail forebrain using antibodies raised against human placental aromatase and against the recombinant quail, mouse or human enzyme. *J Chem Neuroanat.* 1995; 8(4):267-82.

**Foy MR, Xu J, Xie X, Brinton RD, Thompson RF, Berger TW.** 17beta-estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation. *J Neurophysiol.* 1999; 81(2):925-9.

**Friedman HR, Goldman-Rakic PS.** Activation of the Hippokampus and dentate gyrus by working-memory: a 2-deoxyGlucose study of behaving rhesus monkeys. *J Neurosci.* 1988; 8(12):4693-706.

**Fugger HN, Cunningham SG, Rissman EF, Foster TC.** Sex differences in the activational effect of ERalpha on spatial learning. *Horm Behav.* 1998; 34(2):163-70.

**Fugger HN, Foster TC, Gustafsson J, Rissman EF.** Novel effects of estradiol and estrogen receptor alpha and beta on cognitive function. *Brain Res.* 2000; 883(2):258-64.

**Fusani L, Gahr M.** Hormonal influence on song structure and organization: the role of estrogen. *Neuroscience.* 2006; 138(3):939-46.

**Fyhn M, Molden S, Witter MP, Moser EI, Moser MB.** Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science.* 2004; 305(5688):1258-64.

**Gagnidze K, Pfaff DW.** Sex on the brain. *Cell.* 2009; 139(1):19-21.

**Garcia-Segura LM, Veiga S, Sierra A, Melcangi RC, Azcoitia I.** Aromatase: a neuroprotective enzyme. *Prog Neurobiol.* 2003; 71(1):31-41.

**Garcia-Segura LM.** Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore. *J Neuroendocrinol.* 2008; 20(6):705-12.

- Gaskin JH, Kitay JI.** Adrenocortical function in the hamster. Sex differences and effects of gonadal hormones. *Endocrinology*. 1970; 87(4):779-86.
- Genn RF, Tucci SA, Thomas A, Edwards JE, File SE.** Age-associated sex differences in response to food deprivation in two animal tests of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003; 27(1-2):155-61.
- Gesing A, Bilang-Bleuel A, Droste SK, Linthorst AC, Holsboer F, Reul JM.** Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels: involvement of corticotropin-releasing hormone. *J Neurosci*. 2001;21(13):4822-9.
- Gibbs RB.** Testosterone and estradiol produce different effects on cognitive performance in male rats. *Horm Behav*. 2005; 48(3):268-77.
- Gibbs RB.** Treatment with estrogen and progesterone affects relative levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in different regions of the adult rat brain. *Brain Res*. 1999; 844(1-2):20-7.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ.** Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci*. 1999; 2(3):260-5.
- Han F, Ozawa H, Matsuda K, Nishi M, Kawata M.** Colocalization of Mineralokortikoid receptor and Glukokortikoid receptor in the Hippokampus and hypothalamus. *Neurosci Res*. 2005; 51(4):371-81.
- Handa RJ, Burgess LH, Kerr JE, O'Keefe JA.** Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Horm Behav*. 1994; 28(4):464-76.
- Handa RJ, Kerr JE, DonCarlos LL, McGivern RF, Hejna G.** Hormonal regulation of androgen receptor messenger RNA in the medial preoptic area of the male rat. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996; 39(1-2):57-67.
- Harrington WR, Sheng S, Barnett DH, Petz LN, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS.** Activities of estrogen receptor alpha- and beta-selective ligands at diverse estrogen responsive gene sites mediating transactivation or transrepression. *Mol Cell Endocrinol*. 2003; 206(1-2):13-22.
- Hart SA, Snyder MA, Smejkalova T, Woolley CS.** Estrogen mobilizes a subset of estrogen receptor-alpha-immunoreactive vesicles in inhibitory presynaptic boutons in hippocampal CA1. *J Neurosci*. 2007; 27(8):2102-11.
- Hayden-Hixson DM, Ferris CF.** Steroid-specific regulation of agonistic responding in the anterior hypothalamus of male hamsters. *Physiol Behav*. 1991; 50(4):793-9.

**Hebbard PC, King RR, Malsbury CW, Harley CW.** Two organizational effects of pubertal testosterone in male rats: transient social memory and a shift away from long-term potentiation following a tetanus in hippocampal CA1. *Exp Neurol.* 2003; 182(2):470-5.

**Hefner K, Holmes A.** Ontogeny of fear-, anxiety- and depression-related behavior across adolescence in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res.* 2007; 176(2):210-5.

**Heiderstadt KM, McLaughlin RM, Wright DC, Walker SE, Gomez-Sanchez CE.** The effect of chronic food and water restriction on open-field behaviour and serum corticosterone levels in rats. *Lab Anim.* 2000; 34(1):20-8.

**Henke PG.** Potentiation of inputs from the posterolateral amygdala to the dentate gyrus and resistance to stress ulcers formation in rats. *Physiol Behav.* 1990; 48(5):659-64.

**Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H.** Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2005; 29(8):1201-13.

**Het S, Ramlow G, Wolf OT.** A meta-analytic review of the effects of acute cortisol administration on human memory. *Psychoneuroendocrinology.* 2005; 30(8):771-84.

**Hill AJ.** First occurrence of hippocampal spatial firing in a new environment. *Exp Neurol.* 1978; 62(2):282-97.

**Hörtnagl H, Berger ML, Sperk G, Pifl C.** Regional heterogeneity in the distribution of neurotransmitter markers in the rat Hippokampus. *Neuroscience.* 1991; 45(2):261-72.

**Hunsaker MR, Kesner RP.** Dissociations across the dorsal-ventral axis of CA3 and CA1 for encoding and retrieval of contextual and auditory-cued fear. *Neurobiol Learn Mem.* 2008; 89(1):61-9.

**Hutchison JB.** Hormonal control of behaviour: steroid action in the brain. *Curr Opin Neurobiol.* 1991; 1(4):562-70.

**Huttenlocher PR.** Synaptic density in human frontal cortex - developmental changes and effects of aging. *Brain Res.* 1979; 163(2):195-205.

**Imwalle DB, Scordalakes EM, Rissman EF.** Estrogen receptor alpha influences socially motivated behaviors. *Horm Behav.* 2002; 42(4):484-91.

- Izquierdo I, da Cunha C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MB, Medina JH.** Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and Hippokampus of the rat. *Behav Neural Biol.* 1992; 58(1):16-26.
- Jacobson L, Sapolsky R.** The role of the Hippokampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev.* 1991; 12(2):118-34.
- Jankord R, Solomon MB, Albertz J, Flak JN, Zhang R, Herman JP.** Stress vulnerability during adolescent development in rats. *Endocrinology.* 2011; 152(2):629-38.
- Janowsky JS, Oviatt SK, Orwoll ES.** Testosterone influences spatial cognition in older men. *Behav Neurosci.* 1994; 108(2):325-32.
- Joëls M, Pu Z, Wiegert O, Oitzl MS, Krugers HJ.** Learning under stress: how does it work? *Trends Cogn Sci.* 2006; 10(4):152-8.
- Kallio PJ, Poukka H, Moilanen A, Jänne OA, Palvimo JJ.** Androgen receptor-mediated transcriptional regulation in the absence of direct interaction with a specific DNA element. *Mol Endocrinol.* 1995; 9(8):1017-28.
- Kandel ER.** The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science.* 2001; 294(5544):1030-8.
- Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schütz G, Joëls M.** Mineralokortikoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(52):19204-7.
- Karten YJ, Nair SM, van Essen L, Sibug R, Joëls M.** Long-term exposure to high corticosterone levels attenuates serotonin responses in rat hippocampal CA1 neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(23):13456-61
- Keller-Wood ME, Dallman MF.** Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev.* 1984; 5(1):1-24.
- Kelley AE, Schochet T, Landry CF.** Risk taking and novelty seeking in adolescence: introduction to part I. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1021:27-32.
- Kemp A, Manahan-Vaughan D.** Hippokampal long-term depression and long-term potentiation encode different aspects of novelty acquisition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(21):8192-7.

- Kentros C, Hargreaves E, Hawkins RD, Kandel ER, Shapiro M, Muller RV.** Abolition of long-term stability of new hippocampal place cell maps by NMDA receptor blockade. *Science*. 1998; 280(5372):2121-6.
- Kerr JE, Beck SG, Handa RJ.** Androgens selectively modulate C-fos messenger RNA induction in the rat Hippokampus following novelty. *Neuroscience*. 1996; 74(3):757-66.
- Kjelstrup KB, Solstad T, Brun VH, Hafting T, Leutgeb S, Witter MP, Moser EI, Moser MB.** Finite scale of spatial representation in the Hippokampus. *Science*. 2008; 321(5885):140-3.
- Kjelstrup KG, Tuvnes FA, Steffenach HA, Murison R, Moser EI, Moser MB.** Reduced fear expression after lesions of the ventral Hippokampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(16):10825-30.
- Klausberger T, Somogyi P.** Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science*. 2008; 321(5885):53-7.
- Korz V, Frey JU.** Emotional and cognitive reinforcement of rat hippocampal long-term potentiation by different learning paradigms. *Neuron Glia Biol*. 2004; 1(3):253-61.
- Korz V, Frey JU.** Hormonal and monoamine signaling during reinforcement of hippocampal long-term potentiation and memory retrieval. *Learn Mem*. 2007; 14(3):160-6.
- Korz V, Frey JU.** Stress-related modulation of hippocampal long-term potentiation in rats: Involvement of adrenal steroid receptors. *J Neurosci*. 2003; 23(19):7281-7.
- Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, Prange-Kiel J, Naumann T, Jarry H, Frotscher M, Rune GM.** Hippokampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci*. 2004; 24(26):5913-21.
- Kritzer MF, McLaughlin PJ, Smirlis T, Robinson JK.** Gonadectomy impairs T-maze acquisition in adult male rats. *Horm Behav*. 2001; 39(2):167-74.
- Krug M, Lössner B, Ott T.** Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Res Bull*. 1984; 13(1):39-42.
- Kumar RC, Thakur MK.** Androgen receptor mRNA is inversely regulated by testosterone and estradiol in adult mouse brain. *Neurobiol Aging*. 2004; 25(7):925-33.

- Larsen KE, Sulzer D.** Autophagy in neurons: a review. *Histol Histopathol.* 2002; 17(3):897-908.
- Lefstin JA, Yamamoto KR.** Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators. *Nature.* 1998; 392(6679):885-8.
- Leśniewska B, Nowak M, Malendowicz LK.** Sex differences in adrenocortical structure and function. XXVIII. ACTH and corticosterone in intact, gonadectomised and gonadal hormone replaced rats. *Horm Metab Res.* 1990; 22(7):378-81.
- Leutgeb S, Leutgeb JK, Barnes CA, Moser EI, McNaughton BL, Moser MB.** Independent codes for spatial and episodic memory in hippocampal neuronal ensembles. *Science.* 2005; 309(5734):619-23.
- Leutgeb S, Leutgeb JK, Treves A, Moser MB, Moser EI.** Distinct ensemble codes in hippocampal areas CA3 and CA1. *Science.* 2004; 305(5688):1295-8.
- Levin ER.** Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 2009; 20(10):477-82.
- Lindsay RM.** Nerve growth factors (NGF, BDNF) enhance axonal regeneration but are not required for survival of adult sensory neurons. *J Neurosci.* 1988; 8(7):2394-405.
- Lisman JE, Grace AA.** The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron.* 2005; 46(5):703-13.
- Liu F, Day M, Muñoz LC, Bitran D, Arias R, Revilla-Sanchez R, Grauer S, Zhang G, Kelley C, Pulito V, Sung A, Mervis RF, Navarra R, Hirst WD, Reinhart PH, Marquis KL, Moss SJ, Pangalos MN, Brandon NJ.** Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. *Nat Neurosci.* 2008; 11(3):334-43.
- Liu W, Wang J, Sauter NK, Pearce D.** Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(26):12480-4.
- Liu Y, Fowler CD, Young LJ, Yan Q, Insel TR, Wang Z.** Expression and estrogen regulation of brain-derived neurotrophic factor gene and protein in the forebrain of female prairie voles. *J Comp Neurol.* 2001; 433(4):499-514.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC(T)</sup> Method. *Methods.* 2001; 25(4):402-8.

- Lord LD, Bond J, Thompson RR.** Rapid steroid influences on visually guided sexual behavior in male goldfish. *Horm Behav.* 2009; 56(5):519-26.
- Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Sigler PB.** Crystallographic analysis of the interaction of the Glukokortikoid receptor with DNA. *Nature.* 1991; 352(6335):497-505.
- Lupien SJ, McEwen BS.** The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res Brain Res Rev.* 1997; 24(1):1-27.
- Lyss PJ, Andersen SL, LeBlanc CJ, Teicher MH.** Degree of neuronal activation following FG-7142 changes across regions during development. *Brain Res Dev Brain Res.* 1999; 116(2):201-3.
- MacLusky NJ, Naftolin F.** Sexual differentiation of the central nervous system. *Science.* 1981; 211(4488):1294-302.
- Malenka RC, Bear MF.** LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron.* 2004; 44(1):5-21.
- Malleret G, Haditsch U, Genoux D, Jones MW, Bliss TV, Vanhose AM, Weitlauf C, Kandel ER, Winder DG, Mansuy IM.** Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell.* 2001; 104(5):675-86.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM.** The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 1995; 83(6):835-9.
- Maren S, Aharonov G, Fanselow MS.** Neurotoxic lesions of the dorsal Hippokampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav Brain Res.* 1997; 88(2):261-74.
- Martin SJ, Morris RG.** New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippokampus.* 2002; 12(5):609-36.
- McCallum J, Kim JH, Richardson R.** Impaired extinction retention in adolescent rats: effects of D-cycloserine. *Neuropsychopharmacology.* 2010; 35(10):2134-42.
- McEwen BS, Magarinos AM.** Stress effects on morphology and function of the Hippokampus. *Ann N Y Acad Sci.* 1997; 821:271-84.
- McGaugh JL, Roozendaal B.** Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr Opin Neurobiol.* 2002; 12(2):205-10.

- Meaney MJ, Sapolsky RM, McEwen BS.** The development of the Glukokortikoid receptor system in the rat limbic brain. I. Ontogeny and autoregulation. *Brain Res.* 1985; 350(1-2):159-64.
- Mendoza RA, Enriquez MI, Mejia SM, Moody EE, Thordarson G.** Interactions between IGF-I, estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ), and ER $\beta$  in regulating growth/apoptosis of MCF-7 human breast cancer cells. *J Endocrinol.* 2011; 208(1):1-9.
- Meyer K, Korz V.** Age dependent differences in the regulation of hippocampal steroid hormones and receptor genes: relations to motivation and cognition in male rats. *Horm Behav.* 2013; 63(2):376-84.
- Milner TA, Ayoola K, Drake CT, Herrick SP, Tabori NE, McEwen BS, Warriar S, Alves SE.** Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol.* 2005; 491(2):81-95.
- Miranda RC, Sohrabji F, Toran-Allerand CD.** Presumptive Estrogen Target Neurons Express mRNAs for both the Neurotrophins and Neurotrophin Receptors: A Basis for Potential Developmental Interactions of Estrogen with the Neurotrophins. *Mol Cell Neurosci.* 1993; 4(6):510-25.
- Monder C, Sakai RR, Miroff Y, Blanchard DC, Blanchard RJ.** Reciprocal changes in plasma corticosterone and testosterone in stressed male rats maintained in a visible burrow system: evidence for a mediating role of testicular 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology.* 1994; 134(3):1193-8.
- Montkowski A, Barden N, Wotjak C, Stec I, Ganster J, Meaney M, Engelmann M, Reul JM, Landgraf R, Holsboer F.** Long-term antidepressant treatment reduces behavioural deficits in transgenic mice with impaired Glukokortikoid receptor function. *J Neuroendocrinol.* 1995; 7(11):841-5.
- Moradpour F, Naghdi N, Fathollahi Y.** Anastrozole improved testosterone-induced impairment acquisition of spatial learning and memory in the hippocampal CA1 region in adult male rats. *Behav Brain Res.* 2006; 175(2):223-32.
- Morris RGM.** Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation* 1981; 12:239-260
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J.** Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature.* 1982; 297(5868):681-3.
- Moser EI, Kropff E, Moser MB.** Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annu Rev Neurosci.* 2008; 31:69-89.

- Moser E, Moser MB, Andersen P.** Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci.* 1993; 13(9):3916-25.
- Moser MB, Moser EI, Forrest E, Andersen P, Morris RG.** Spatial learning with a minislab in the dorsal Hippokampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(21):9697-701.
- Mu JS, Li WP, Yao ZB, Zhou XF.** Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. *Brain Res.* 1999; 835(2):259-65.
- Murphy DD, Segal M.** Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J Neurosci.* 1996; 16(13):4059-68.
- Murrin LC, Zeng W.** Postnatal ontogeny of dopamine D2 receptors in rat striatum. *Biochem Pharmacol.* 1986; 35(7):1159-62.
- Nair SM, Karst H, Dumas T, Phillips R, Sapolsky RM, Rumpff-van Essen L, Maslam S, Lucassen PJ, Joëls M.** Gene expression profiles associated with survival of individual rat dentate cells after endogenous corticosteroid deprivation. *Eur J Neurosci.* 2004; 20(12):3233-43.
- Naninck EF, Lucassen PJ, Bakker J.** Sex differences in adolescent depression: do sex hormones determine vulnerability? *J Neuroendocrinol.* 2011; 23(5):383-92.
- Nathan SV, Griffith QK, McReynolds JR, Hahn EL, Roozendaal B.** Basolateral amygdala interacts with other brain regions in regulating Glukokortikoid effects on different memory functions. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1032:179-82.
- Nettles KW, Gil G, Nowak J, Métivier R, Sharma VB, Greene GL.** CBP Is a dosage-dependent regulator of nuclear factor-kappaB suppression by the estrogen receptor. *Mol Endocrinol.* 2008; 22(2):263-72.
- Nicholls RE, Alarcon JM, Malleret G, Carroll RC, Grody M, Vronskaya S, Kandel ER.** Transgenic mice lacking NMDAR-dependent LTD exhibit deficits in behavioral flexibility. *Neuron.* 2008; 58(1):104-17.
- Nishi M, Kawata M.** Brain corticosteroid receptor dynamics and trafficking: Implications from live cell imaging. *Neuroscientist.* 2006; 12(2):119-33.
- Oitzl MS, Champagne DL, van der Veen R, de Kloet ER.** Brain development under stress: hypotheses of Glukokortikoid actions revisited. *Neurosci Biobehav Rev.* 2010; 34(6):853-66.

- Oitzl MS, Reichardt HM, Joëls M, de Kloet ER.** Point mutation in the mouse Glukokortikoid receptor preventing DNA binding impairs spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(22):12790-5.
- O'Keefe J, Conway DH.** Hippokampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire. *Exp Brain Res.* 1978; 31(4):573-90.
- O'Keefe J.** A review of the hippokampal place cells. *Prog Neurobiol.* 1979; 13(4):419-39.
- Olton DS, Branch M, Best PJ.** Spatial correlates of hippokampal unit activity. *Exp Neurol.* 1978; 58(3):387-409.
- Orr TE, Mann DR.** Role of Glukokortikoids in the stress-induced suppression of testicular steroidogenesis in adult male rats. *Horm Behav.* 1992; 26(3):350-63.
- Osborne DM, Edinger K, Frye CA.** Chronic administration of androgens with actions at estrogen receptor beta have anti-anxiety and cognitive-enhancing effects in male rats. *Age (Dordr).* 2009; 31(3):191-8.
- Pardo JV, Creese I, Burt DR, Snyder SH.** Ontogenesis of dopamine receptor binding in the corpus striatum of the rat. *Brain Res.* 1977; 125(2):376-82.
- Pavlidis C, McEwen BS.** Effects of Mineralokortikoid and Glukokortikoid receptors on long-term potentiation in the CA3 hippokampal field. *Brain Res.* 1999; 851(1-2):204-14.
- Pavlidis C, Watanabe Y, Magariños AM, McEwen BS.** Opposing roles of type I and type II adrenal steroid receptors in hippokampal long-term potentiation. *Neuroscience.* 1995; 68(2):387-94.
- Phillips RG, LeDoux JE.** Differential contribution of amygdala and Hippokampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci.* 1992; 106(2):274-85.
- Phoenix CH.** Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Horm Behav.* 2009; 55(5):566.
- Pothuizen HH, Zhang WN, Jongen-Rêlo AL, Feldon J, Yee BK.** Dissociation of function between the dorsal and the ventral Hippokampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur J Neurosci.* 2004; 19(3):705-12.

- Prange-Kiel J, Rune GM.** Direct and indirect effects of estrogen on rat Hippokampus. *Neuroscience*. 2006; 138(3):765-72.
- Pratt WB, Galigniana MD, Harrell JM, DeFranco DB.** Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. *Cell Signal*. 2004; 16(8):857-72.
- Quinn R.** Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005; 21(6):775-7.
- Radecki DT, Brown LM, Martinez J, Teyler TJ.** BDNF protects against stress-induced impairments in spatial learning and memory and LTP. *Hippokampus*. 2005; 15(2):246-53.
- Ramos BP, Arnsten AF.** Adrenergic pharmacology and cognition: focus on the prefrontal cortex. *Pharmacol Ther*. 2007 Mar;113(3):523-36. Epub 2006 Dec 28. *Neural Plast*. 2007; 2007:78970.
- Rao PA, Molinoff PB, Joyce JN.** Ontogeny of dopamine D1 and D2 receptor subtypes in rat basal ganglia: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res Dev Brain Res*. 1991; 60(2):161-77.
- Ray P, Ghosh SK, Zhang DH, Ray A.** Repression of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol: inhibition of the DNA-binding activity of the transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B by the estrogen receptor. *FEBS Lett*. 1997; 409(1):79-85.
- Renner KJ, Biegon A, Luine VN.** Sex differences in long-term gonadectomized rats: monoamine levels and [3H]nitroimipramine binding in brain nuclei. *Exp Brain Res*. 1985; 58(1):198-201.
- Reul JM, de Kloet ER.** Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*. 1985; 117(6):2505-11.
- Richter JD, Lorenz LJ.** Selective translation of mRNAs at synapses. *Curr Opin Neurobiol*. 2002; 12(3):300-4.
- Rissman EF, Heck AL, Leonard JE, Shupnik MA, Gustafsson JA.** Disruption of estrogen receptor beta gene impairs spatial learning in female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(6):3996-4001.
- Rissman EF, Wersinger SR, Fugger HN, Foster TC.** Sex with knockout models: behavioral studies of estrogen receptor alpha. *Brain Res*. 1999; 835(1):80-90.

**Rissman EF, Wersinger SR, Taylor JA, Lubahn DB.** Estrogen receptor function as revealed by knockout studies: neuroendocrine and behavioral aspects. *Horm Behav.* 1997; 31(3):232-43.

**Rooszendaal B, Hahn EL, Nathan SV, de Quervain DJ, McGaugh JL.** Glukokortikoid effects on memory retrieval require concurrent noradrenergic activity in the Hippokampus and basolateral amygdala. *J Neurosci.* 2004; 24(37):8161-9

**Rooszendaal B, McEwen BS, Chattarji S.** Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10(6):423-33.

**Rooszendaal B.** 1999 Curt P. Richter award. Glukokortikoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology.* 2000; 25(3):213-38.

**Roselli CE, Horton LE, Resko JA.** Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. *Endocrinology.* 1985; 117(6):2471-7.

**Roselli CE, Resko JA.** Cytochrome P450 aromatase (CYP19) in the non-human primate brain: distribution, regulation, and functional significance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001; 79(1-5):247-53.

**Roselli CE, Resko JA.** Sex differences in androgen-regulated expression of cytochrome P450 aromatase in the rat brain. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1997; 61(3-6):365-74.

**Rudy JW, Matus-Amat P.** The ventral Hippokampus supports a memory representation of context and contextual fear conditioning: implications for a unitary function of the Hippokampus. *Behav Neurosci.* 2005; 119(1):154-63.

**Ryan KJ, Naftolin F, Reddy V, Flores F, Petro Z.** Estrogen formation in the brain. *Am J Obstet Gynecol.* 1972; 114(4):454-60.

**Sandi C, Pinelo-Nava MT.** Stress and memory: behavioral effects and neurobiological mechanisms. *Neural Plast.* 2007; 2007:78970.

**Sandi C, Woodson JC, Haynes VF, Park CR, Touyarot K, Lopez-Fernandez MA, Venero C, Diamond DM.** Acute stress-induced impairment of spatial memory is associated with decreased expression of neural cell adhesion molecule in the Hippokampus and prefrontal cortex. *Biol Psychiatry.* 2005; 57(8):856-64.

**Sandi C.** Glukokortikoids act on glutamatergic pathways to affect memory processes. *Trends Neurosci.* 2011; 34(4):165-76.

**Sandstrom NJ, Kim JH, Wasserman MA.** Testosterone modulates performance on a spatial working memory task in male rats. *Horm Behav.* 2006; 50(1):18-26.

**Sapolsky RM, Meaney MJ, McEwen BS.** The development of the Glukokortikoid receptor system in the rat limbic brain. III. Negative-feedback regulation. *Brain Res.* 1985; 350(1-2):169-73.

**Sapolsky RM, Meaney MJ.** Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res.* 1986; 396(1):64-76.

**Sara SJ.** The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10(3):211-23.

**Sarabdjitsingh RA, Meijer OC, Schaaf MJ, de Kloet ER.** Subregion-specific differences in translocation patterns of Mineralokortikoid and Glukokortikoid receptors in rat Hippokampus. *Brain Res.* 2009; 1249:43-53.

**Saville B, Wormke M, Wang F, Nguyen T, Enmark E, Kuiper G, Gustafsson JA, Safe S.** Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J Biol Chem.* 2000; 275(8):5379-87.

**Schulz K, Korz V.** Hippokampal testosterone relates to reference memory performance and synaptic plasticity in male rats. *Front Behav Neurosci.* 2010; 4:187.

**Schulz KM, Molenda-Figueira HA, Sisk CL.** Back to the future: The organizational-activational hypothesis adapted to puberty and adolescence. *Horm Behav.* 2009; 55(5):597-604.

**Schwabe L, Dalm S, Schächinger H, Oitzl MS.** Chronic stress modulates the use of spatial and stimulus-response learning strategies in mice and man. *Neurobiol Learn Mem.* 2008; 90(3):495-503.

**Schwabe L, Schächinger H, de Kloet ER, Oitzl MS.** Corticosteroids operate as a switch between memory systems. *J Cogn Neurosci.* 2010; 22(7):1362-72.

**Sengupta P.** A scientific review of age determination for a laboratory rat: how old is it in comparison with human age? *Biomedicine International.* 2012; 2(2): 81-89

**Shen Q, Lal R, Luellen BA, Earnheart JC, Andrews AM, Luscher B.** gamma-Aminobutyric acid-type A receptor deficits cause hypothalamic-pituitary-adrenal axis hyperactivity and antidepressant drug sensitivity reminiscent of melancholic forms of depression. *Biol Psychiatry.* 2010; 68(6):512-20.

- Shughrue PJ, Lane MV, Scrimo PJ, Merchenthaler I.** Comparative distribution of estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract. *Steroids*. 1998; 63(10):498-504.
- Singer CA, Rogers KL, Strickland TM, Dorsa DM.** Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity. *Neurosci Lett*. 1996; 212(1):13-6.
- Sisk CL, Zehr JL.** Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. *Front Neuroendocrinol*. 2005; 26(3-4):163-74.
- Smriga M, Nishiyama N, Saito H.** Mineralokortikoid receptor-mediated enhancement of neuronal excitability and synaptic plasticity in the dentate gyrus in vivo is dependent on the beta-adrenergic activity. *J Neurosci Res*. 1998; 51(5):593-601.
- Sohrabji F, Miranda RC, Toran-Allerand CD.** Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(24):11110-4.
- Solum DT, Handa RJ.** Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat Hippokampus. *J Neurosci*. 2002; 22(7):2650-9.
- Spear LP.** The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000; 24(4):417-63.
- Spear LP, Brake SC.** Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Dev Psychobiol*. 1983; 16(2):83-109.
- Spritzer MD, Gill M, Weinberg A, Galea LA.** Castration differentially affects spatial working and reference memory in male rats. *Arch Sex Behav*. 2008; 37(1):19-29.
- Straube T, Korz V, Frey JU.** Bidirectional modulation of long-term potentiation by novelty-exploration in rat dentate gyrus. *Neurosci Lett*. 2003; 344(1):5-8.
- Sun J, Huang YR, Harrington WR, Sheng S, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS.** Antagonists selective for estrogen receptor alpha. *Endocrinology*. 2002; 143(3):941-7.
- Swanson LW, Cowan WM.** An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol*. 1977; 172(1):49-84.

**ter Horst JP, van der Mark MH, Arp M, Berger S, de Kloet ER, Oitzl MS.** Stress or no stress: Mineralokortikoid receptors in the forebrain regulate behavioral adaptation. *Neurobiol Learn Mem.* 2012; 98(1):33-40.

**Towart LA, Alves SE, Znamensky V, Hayashi S, McEwen BS, Milner TA.** Subcellular relationships between cholinergic terminals and estrogen receptor-alpha in the dorsal Hippokampus. *J Comp Neurol.* 2003; 463(4):390-401.

**Trainor BC, Finy MS, Nelson RJ.** Rapid effects of estradiol on male aggression depend on photoperiod in reproductively non-responsive mice. *Horm Behav.* 2008; 53(1):192-9.

**Trainor BC, Lin S, Finy MS, Rowland MR, Nelson RJ.** Photoperiod reverses the effects of estrogens on male aggression via genomic and nongenomic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(23):9840-5.

**Trapp T, Holsboer F.** Heterodimerization between Mineralokortikoid and Glukokortikoid receptors increases the functional diversity of corticosteroid action. *Trends Pharmacol Sci.* 1996; 17(4):145-9.

**Trapp T, Rupprecht R, Castrén M, Reul JM, Holsboer F.** Heterodimerization between Mineralokortikoid and Glukokortikoid receptor: a new principle of Glukokortikoid action in the CNS. *Neuron.* 1994; 13(6):1457-62.

**Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schütz G.** Disruption of the Glukokortikoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet.* 1999; 23(1):99-103.

**Truss M, Beato M.** Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev.* 1993; 14(4):459-79.

**Tsai MJ, O'Malley BW.** Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem.* 1994; 63:451-86.

**Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S.** The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell.* 1996; 87(7):1327-38.

**Uzakov S, Frey JU, Korz V.** Reinforcement of rat hippocampal LTP by holeboard training. *Learn Mem.* 2005; 12(2):165-71.

**Van Eekelen JA, De Kloet ER.** Co-localization of brain corticosteroid receptors in the rat Hippokampus. *Prog Histochem Cytochem.* 1992; 26(1-4):250-8.

**Vizuete ML, Venero JL, Traiffort E, Vargas C, Machado A, Cano J.** Expression of 5-HT7 receptor mRNA in rat brain during postnatal development. *Neurosci Lett.* 1997; 227(1):53-6.

**von Schassen C, Fester L, Prange-Kiel J, Lohse C, Huber C, Böttner M, Rune GM.** Oestrogen synthesis in the Hippokampus: role in axon outgrowth. *J Neuroendocrinol.* 2006; 18(11):847-56.

**Wagner CK, Morrell JI.** Neuroanatomical distribution of aromatase mRNA in the rat brain: indications of regional regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1997; 61(3-6):307-14.

**Wang H, Meyer K, Korz V.** Stress induced hippocampal Mineralokortikoid and estrogen receptor  $\beta$  gene expression and long-term potentiation in male adult rats is sensitive to early-life stress experience. *Psychoneuroendocrinology.* 2013; 38(2):250-62.

**Wersinger SR, Rissman EF.** Oestrogen receptor alpha is essential for female-directed chemo-investigatory behaviour but is not required for the pheromone-induced luteinizing hormone surge in male mice. *J Neuroendocrinol.* 2000; 12(2):103-10.

**Whitnall MH.** Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog Neurobiol.* 1993; 40(5):573-629.

**Whitnall MH, Perlstein RS, Mougey EH, Neta R.** Effects of interleukin-1 on the stress-responsive and -nonresponsive subtypes of corticotropin-releasing hormone neurosecretory axons. *Endocrinology.* 1992; 131(1):37-44.

**Wilson ME, Rosewell KL, Kashon ML, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Wise PM.** Age differentially influences estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) gene expression in specific regions of the rat brain. *Mech Ageing Dev.* 2002; 123(6):593-601.

**Windle RJ, Wood SA, Lightman SL, Ingram CD.** The pulsatile characteristics of hypothalamo-pituitary-adrenal activity in female Lewis and Fischer 344 rats and its relationship to differential stress responses. *Endocrinology.* 1998; 139(10):4044-52.

**Woolley CS.** Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007; 47:657-80.

**Wu MV, Manoli DS, Fraser EJ, Coats JK, Tollkuhn J, Honda S, Harada N, Shah NM.** Estrogen masculinizes neural pathways and sex-specific behaviors. *Cell.* 2009; 139(1):61-72.

**Yau JL, Noble J, Seckl JR.** Continuous blockade of brain Mineralokortikoid receptors impairs spatial learning in rats. *Neurosci Lett.* 1999; 277(1):45-8.

**Yoshihara T, Honma S, Katsuno Y, Honma K.** Dissociation of paraventricular NPY release and plasma corticosterone levels in rats under food deprivation. *Am J Physiol.* 1996; 271(2 Pt 1):E239-45.

**Zhang TY, Labonté B, Wen XL, Turecki G, Meaney MJ.** Epigenetic mechanisms for the early environmental regulation of hippocampal Glukokortikoid receptor gene expression in rodents and humans. *Neuropsychopharmacology.* 2013; 38(1):111-23.

**Zhou J, Zhang H, Cohen RS, Pandey SC.** Effects of estrogen treatment on expression of brain-derived neurotrophic factor and cAMP response element-binding protein expression and phosphorylation in rat amygdaloid and hippocampal structures. *Neuroendocrinology.* 2005; 81(5):294-310.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	HPA-Achse (links): Wirkt ein Stressor auf den Organismus, führt dies zur Ausschüttung von CRH durch den Hypothalamus. CRH initiiert die Ausschüttung von ACTH in der Hypophyse, welches die Nebennierenrinde zur Freisetzung von Kortikosteron anregt. Kortikosteron reguliert über eine Feedback-Hemmung die weitere Sekretion von CRH im Hypothalamus, sowie ACTH in der Hypophyse und setzt die Stressantwort durch den Metabolismus in Gang. ....	10
Abbildung 2	Ausschnitt aus der Biosynthese der Steroidhormone: Das Progesteron ist sowohl die Ausgangsverbindung für die Synthese von Kortikosteron, als auch für die Androgene; wie Androstenedion und dessen Derivat Testosteron. Aus Testosteron geht wiederum mittels Aromatase das Östrogen Estradiol hervor. ....	17
Abbildung 3	Funktionswege der Steroidhormonrezeptoren: 1. Das Steroidhormon bindet an seinen Membran-gebundenem Rezeptor und aktiviert entweder eine Proteinsynthese unabhängige Signalkaskade; oder vermittelt die Freisetzung von CREB. CREB bindet im Promotorbereich des Zielgens an das CRE-Motiv und veranlasst dessen Transkription. 2. Das Steroidhormon bindet im Zellkern an mögliche Dimere der Rezeptoren (Homo- und Heterodimere möglich). Der Hormon-Rezeptor-Komplex bindet an das entsprechende Bindemotiv im Promotor des Zielgens und bedingt dessen Transkription....	22
Abbildung 4	Stereotaktisches Instrument zur Implantation der i.c.v Kanüle.....	25
Abbildung 5	Übersicht des Versuchsablaufs der ersten Teilstudie; Tag 1: Implantation der i.c.v. Kanüle; Tag 5: Wiegen der Tiere und Beginn der Futterdeprivation; Tag 9: Habituation an den Experimentator und den Versuchsaufbau; Tag 10 – 12: Holeboard-Training; Tag 11: Injektion des Vehikel nach Abschluss des neunten Trials; Tag 12: Dekapitierung der Tiere 15 Minuten nach Abschluss des zehnten Trials. ....	26
Abbildung 6	Übersicht des Versuchsablaufs der ersten Teilstudie; Tag 1: Implantation der i.c.v. Kanüle; Tag 5: Wiegen der Tiere und Beginn der Futterdeprivation; Tag 5 – 11: pharmakologische Behandlung der Tiere zwischen 8:00 und 8:30 (mindestens 30 Minuten vor Beginn des Trainings); Tag 9: Habituation an den Experimentator und den Versuchsaufbau; Tag 10 – 12: Holeboard-Training; Tag 12: Dekapitierung der Tiere 15 Minuten nach Abschluss des zehnten Trials. ....	27
Abbildung 7	Injektion mittels Hamilton-Spritze über einen flexiblen Schlauch zur Gewährleistung der freien Bewegungsfähigkeit der Versuchstiere .....	28
Abbildung 8	Holeboard-Test: 4 von 16 Löchern sind in einem festen Muster mit Belohnungspellets beködert .....	30
Abbildung 9	Open-Field-Test: Zonendefinition .....	32

Abbildung 10	Übersicht des Versuchsablaufs der dritten Teilstudie; Tag 1: Implantation der i.c.v. Kanüle; Tag 5: Wiegen der Tiere, jedoch keine Futterdeprivation; Tag 5 – 11: pharmakologische Behandlung der Tiere zwischen 8:00 und 8:30 (mindestens 30 Minuten vor Beginn des Trainings); Tag 10 und 11: 9:00 Open-Field-Test, 10:00 Plus-Maze-Test; Tag 11: Dekapitierung der Tiere 30 Minuten nach Abschluss des Plus-Maze-Tests.....	33
Abbildung 11	Plus-Maze-Test: geschlossene Arme horizontal, offene Arme vertikal .....	34
Abbildung 12	Übersicht über die Primer-Auswahl und die entsprechenden NCBI Genbank-Bezeichnungen der untersuchten Gene.....	37
Abbildung 13	Verhaltensparameter der 8, 12 und 24 Wochen alten Tiere über die gesamte Trainingsdauer; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, *p<0,05. 43	
Abbildung 14	Referenz- und Arbeitsgedächtnis-Indizes der 8, 12 und 24 Wochen alten Tiere im Retentionsdurchgang (Trial 10, Tag 3); angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, *p<0,05. ....	45
Abbildung 15	Hormonanalysen der 8, 12 und 24 Wochen alten Tiere; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, eingezeichnet sind Signifikanzen der Einzelgruppenvergleiche # p<0,05. ....	47
Abbildung 16	relative Genexpression von ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR und BDNF der 8, 12 und 24 Wochen alten Tiere; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, eingezeichnet sind Signifikanzen der Einzelgruppenvergleiche #p<0,05.....	48
Abbildung 17	relative Genexpression von MR, GR und Cyp 19 der 8, 12 und 24 Wochen alten Tiere; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler. ....	49
Abbildung 18	Angaben der Gewichtsreduktion in Prozent als Anteil des Ausgangsgewichtes; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler; eingezeichnet sind Signifikanzen der Einzelgruppenvergleiche *p<0,05.....	53
Abbildung 19	Verhaltensparameter der guten und schlechten Lerner über die gesamte Trainingsdauer; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler. ....	54
Abbildung 20	Referenz- und Arbeitsgedächtnis-Indizes der guten und schlechten Lerner für den letzten Teil der Akquisitionsphase 2 (Trial 9, Tag 2) und den Retentionsdurchgang (Trial 10, Tag 3); angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, *p<0,05. ....	55
Abbildung 21	relative Genexpression von ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR, GR und MR der guten und schlechten Lerner, sowie ihrer untrainierten Kontrollgruppen; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, eingezeichnet sind Signifikanzen der Einzelgruppenvergleiche *p<0,05.....	57
Abbildung 22	Angaben der Gewichtsreduktion in Prozent, als Anteil des Ausgangsgewichtes; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler; eingezeichnet sind Signifikanzen der Einzelgruppenvergleiche *p<0,05. ....	58
Abbildung 23	Verhaltensparameter der Tiere, die mit MPP behandelt wurden, über die gesamte Trainingsdauer; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler. 60	
Abbildung 24	Referenz- und Arbeitsgedächtnis-Indizes der MPP behandelten Tiere im letzten Durchgang des zweiten Trainingstages (Trial 9) und des	

	Retentionsdurchgangs (Trial 10, Tag 3); angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, * $p < 0,05$ . ....	61
Abbildung 25	Hormonanalysen der MPP behandelten Tiere; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, eingezeichnet sind Signifikanzen der Einzelgruppenvergleiche * $p < 0,05$ . ....	62
Abbildung 26	relative Genexpression der MPP behandelten Tiere; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler; eingezeichnet sind Signifikanzen der Einzelgruppenvergleiche * $p < 0,05$ . ....	64
Abbildung 27	Angaben der Gewichtsreduktion der MPP behandelten Tiere in Prozent als Anteil des Ausgangsgewichtes; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler; keine signifikanten Unterschiede in den Einzelgruppenvergleichen * $p < 0,05$ . ....	65
Abbildung 28	Aufenthaltsdauer, Geschwindigkeit und Wegstrecke der MPP-behandelten Tiere, sowie der Kontrollgruppe für den Open-Field-Test (links) und das elevated Plus-Maze (rechts). ....	67
Abbildung 29	Verhaltensparameter der 8 Wochen alten Tiere des ersten Versuchsteil (8 W Genexpression) und der 8 Wochen alten Tiere, welche ebenfalls das vollständige Holeboard-Training absolvierten und zur Generierung der Daten der Proteinexpression genutzt wurden (8 W Proteinexpression); angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, * $p < 0,05$ . ....	69
Abbildung 30	Referenz- und Arbeitsgedächtnis-Indizes der 8 Wochen alten Tiere im Retentionsdurchgang (Trial 10, Tag 3); angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler; * $p < 0,05$ . ....	70
Abbildung 31	Angaben der Gewichtsreduktion der 8 Wochen alten Tiere des ersten Versuchsteil (8 W Genexpression) und der 8 Wochen alten Tiere, welche ebenfalls das vollständige Holeboard-Training absolvierten und zur Generierung der Daten der Proteinexpression genutzt wurden (8 W Proteinexpression) in Prozent, als Anteil des Ausgangsgewichtes; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler; es konnten keine signifikanten Unterschiede in den Einzelgruppenvergleichen ermittelt werden * $p < 0,05$ . ..	71
Abbildung 32	Auswertung der Western-Blot-Analysen der Steroidrezeptoren in der Membran-Fraktion; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, eingezeichnet sind Signifikanzen der Einzelgruppenvergleiche * $p < 0,05$ . ....	72
Abbildung 33	Auswertung der Western-Blot-Analysen der Steroidrezeptoren in der cytosolischen Fraktion; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, eingezeichnet sind Signifikanzen der Einzelgruppenvergleiche * $p < 0,05$ . ....	73
Abbildung 34	Western Blots der beiden Fraktionen und deren Ladekontrollen .....	74
Abbildung 35	Schematische Darstellung der möglichen Kopplung zwischen ER $\alpha$ und MR zum Erhalt der Motivationsbalance; im Falle der Blockierung von ER $\alpha$ verschiebt sich die Balance zu Gunsten erhöhter Risikobereitschaft .....	94

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ganz besonders Herrn PD. Dr. Volker Korz für die Unterstützung und Ermunterung danken.

Des Weiteren gilt mein Dank meinen Kollegen der Arbeitsgemeinschaft Braun, besonders Ute Kreher und Sylvia Kulik, sowie den fleißigen Mitarbeitern des Tierhauses.

Außerdem möchte ich der AG Stork danken für die Erlaubnis zur Nutzung der Real-Time-PCR und der AG Lubek für die Hilfe bei der Durchführung der Western-Blots.

Abschließend sei selbstverständlich meiner Familie und meinem Partner gedankt.

## Curriculum vitae

### Persönliche Daten

Name:	Meyer, Katrin
Anschrift:	Wostokstraße 12 39118 Magdeburg
Telefon:	0175 / 8578580
E-Mail:	kat_84@web.de
Geburtsdatum:	16.02.1984
Geburtsort:	Magdeburg
Familienstand:	ledig, keine Kinder
Staatsangehörigkeit:	Deutsch

### Schulische Ausbildung

09.1990 – 07.1994	Grundschule, Magdeburg
09.1994 – 07. 2003	Hegel-Gymnasium, Magdeburg Abschluss: Abitur (2,1)

### Studium

10. 2003 – 02. 2009	Martin-Luther-Universität Biologie Hauptfach: Pflanzenphysiologie Abschluss: Diplom (1,9)
---------------------	--

Thema der Diplomarbeit:	„Vergleichende Expressionsstudien der LKR/SDH aus <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Hordeum vulgare</i> , sowie physiologische und molekulare Expressionsstudien von <i>At</i> -Mutanten“
-------------------------	--

### Praktikum

03. 2009 – 06. 2009	Otto-von-Guericke-Universität Hilfswissenschaftler und Ausstattung des Labors in Vorbereitung auf die anschließende Promotion
---------------------	---

### Promotionsstudium

07. 2009 –	Leibniz-Institut für Neurobiologie Magdeburg Otto-von-Guericke-Universität Fachbereich: Neurobiologie Abschluss: voraussichtlich Dr. rer. nat.
------------	--

Thema der Doktorarbeit:	„Untersuchungen zur Rolle des hippocampalen Estrogen Rezeptors $\alpha$ bei räumlichen Lernvorgängen und Gedächtnisbildung in männlichen Wistar Ratten“
-------------------------	---