Abteilung Gerontopsychiatrie der Charité Berlin

Untersuchung der räumlichen Orientierung bei Mäusen in einem neuartigen komplexen Labyrinth

Paradigmen, biochemische und neurophysiologische Korrelate

Dissertation (kumulativ) zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.
der Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Ulm

vorgelegt von

Peter Lohmann

aus Gelsenkirchen

Berlin 2006

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Günter Ehret
Zweiter Gutachter:	PD. Dr. Wolfgang Weidemann
Dritter Gutachter:	Prof. Dr. Matthias W. Riepe
Tag der mündlichen Prüfung:	26. Juni 2006

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG 1

1.1. HYPOTHESEN & FRAGESTELLUNGEN 1
1.2. DER HIPPOKAMPUS 3
1.3. LABYRINTHVERSUCHE 5
1.4. DIE ALZHEIMER KRANKHEIT 8
1.5. PRÄKONDITIONIERUNG UND METABOLISCHES IMPRINTING 9
1.6. LTP UND LTD 10

2. MATERIAL UND METHODEN 15

2.1. VERSUCHSTIERE 15
2.1.1 Auswahl und Haltung der Tiere 15
2.1.2 Präkonditionierung der Versuchstiere mit 3-Nitropropionsäure (3-NPA) 15
2.2. LABYRINTHE 15
2.2.1 Komplex-Labyrinth 15
2.2.2 Radial-Labyrinth 16
2.3. ELEKTROPHYSIOLOGIE (LTP) 17
2.3.1 Präparation der Hippokampus-Schnitte 17
2.3.2 Versuchsaufbau und Ablauf der LTP 19
2.3.3 Auswertung der LTP-Versuche 20

3. SPATIAL NAVIGATION IN COMPLEX AND RADIAL MAZES IN APP23 ANIMALS AND NEUROTROPHIN SIGNALING AS A BIOLOGICAL MARKER OF EARLY IMPAIRMENT 23

4. THE STAMP OF ANCESTRY: ROOTS OF BEHAVIORAL AND NEURONAL IMPAIRMENT IN ADULTHOOD 24

5. SPATIAL LEARNING IN A COMPLEX MAZE IS ACCOMPANIED BY HIPPOCAMPAL SYNAPTIC DEPRESSION 25

6. ZUSAMMENFASSUNG 26

6.1. ERGEBNISSE 26
6.2. DISKUSSION 29

7. LITERATURVERZEICHNIS 34

8. ANHANG 47

1. Einleitung

1.1. Hypothesen & Fragestellungen

Übergeordnetes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, grundlegende Aspekte von Lernvorgängen zu erforschen. Dafür wurden visuell-räumliches Lernen von Mäusen in Labyrinthen und verschiedene zelluläre Abläufe, die eng mit diesen Lernvorgängen verknüpft sind, untersucht. In Zusammenhang damit stand die Einführung eines neuen Komplex-Labyrinths im Interesse dieser Arbeit. Da dem Hippokampus eine entscheidende Rolle bei der Orientierung und Navigation in Umgebungen zugeschrieben wird (Pigott & Milner 1993; Nunn et al. 1999; Milner 1965), war die zentrale Frage hierbei, ob sich das neu gestaltete komplexe Labyrinth in Tierversuchen als hilfreich erweist, hippokampale Lernvorgänge zu untersuchen. Ein etwas abgewandeltes virtuelles Labyrinth fand bereits bei Probanden erfolgreich Anwendung (Grön et al. 2000). Dies sollte an einem bekannten Maus-Modell der Alzheimer-Erkrankung, bei dem bereits frühere Studien zu hippokampalen Lernvorgängen in Labyrinthen durchgeführt wurden, getestet werden. Darüber hinaus sollten die Neurotrophin-Konzentrationen nach den Labyrinthversuchen im Hippokampus, Striatum und frontalen Kortex durch molekularbiologische Methoden untersuchen werden. Diese sollten Aufschluß über die Regulation der Neurotrophine nach den Lernvorgängen im Komplex-Labyrinth geben.

Ein weiteres Hauptaugenmerk dieser Arbeit war es, ein bestehendes Paradigma bei CD-1 Mäusen in abgewandelter Form nachzuweisen. Das Paradigma besagt, daß die wiederholte Gabe von 3-Nitropropionsäure (3-NPA) je nach Dosierung und Intervall zum einen Neuroprotektion und zum anderen Neurodegeneration hervorrufen kann (Hellweg et al. 2003). Hierbei sollte geklärt werden, ob sich die neurodegenerativen Eigenschaften von 3-NPA nach Behandlung der Muttertiere auf die Nachkommen übertragen können. Durch visuell-räumliches Lernen in dem neu gestalteten Komplex-Labyrinth und durch elektrophysiologische Untersuchungen im Hippokampus sollten eventuelle Lerndefizite und Auswirkungen auf zellulärer Ebene der Nachkommen untersucht werden.

Darüber hinaus sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluß von intensiven Lernvorgängen in dem neuen Komplex-Labyrinth auf die synaptischen Übertragungen der Schaffer´schen Kollateralen im Hippokampus bei CD-1 Mäusen untersucht werden. In

anderen Studien zeigten sich verstärkte synaptische Übertragung z. B. im motorischen Kortex nach Erlernen motorischer Fähigkeiten (Rioult-Pedotti et al. 1998) und im Hippokampus nach assoziativen Lernvorgängen (Power et al. 1997). Eine Verstärkung der synaptischen Übertragung im Hippokampus nach Lernvorgängen im Komplex-Labyrinth könnte auf zellulärer die Hippokampus-Sensitivität des Komplex-Labyrinths untermauern.

Folgende Hypothesen standen bei der vorliegenden Arbeit im Vordergrund:

- Das neu entwickelte Komplex-Labyrinth erweist sich als sensitiv für hippokampale Lernvorgänge und kann bei APP23-Mäusen die beginnende Alzheimer-Erkrankung anhand von Lerndefiziten aufzeigen.

- Die Inhibition des mitochondrialen Stoffwechsels durch wiederholte Applikation von 3-NPA bei CD-1-Muttertieren vor der Schwangerschaft schlägt sich bei der Folgegeneration nieder.

- Die intensiven hippokampalen Lernvorgänge in einem Komplex-Labyrinth spiegeln sich in einer verstärkten synaptischen Übertragung der Schaffer´schen Kollateralen im Hippokampus wider.

Um diesen Hypothesen nachzugehen wurde in **Kapitel 3** das neu gestaltetes Komplex-Labyrinth anhand eines etablierten Mausmodells der Alzheimer-Erkrankung auf seine Tauglichkeit getestet, hippokampale Lernvorgänge zu erforschen. Darüber hinaus wurden sowohl bei den im Labyrinth trainierten als auch bei Kontroll-Tieren die Konzentrationen der NGF-, BDNF- und NT-3-Neurotrophine im Hippokampus, Striatum und dem frontalen Kortex gemessen. Als Alzheimer-Modell dienten dabei zehn Monate alte, weibliche B6-Tg(ThylAPP)23Sdz-Tiere (APP23-Tiere), bei denen sich Alzheimer-typische Amyloid-Plaques im neuronalen Zwischenzellraum finden ließen (Burbach et al. 2004; Stalder et al. 1999). Darüber hinaus wurden an diesem Mausmodell bereits mannigfaltige Untersuchungen im Morris Wasserlabyrinth durchgeführt (Dumont et al. 2004; Kelly et al. 2003; Sykova et al. 2005).

In der Studie des **4. Kapitels** wurde untersucht, in wie weit sich die Behandlung weiblicher CD-1 Mäuse durch wiederholte chemische Inhibition des mitochondrialen Stoffwechsels

mit 3-NPA vor der Schwangerschaft auf die nächste Generation auswirken kann. Dies wurde sowohl durch Verhaltensexperimente im Komplex-Labyrinth als auch auf zellulärer Ebene durch LTP-, Hypoxie- und NADH-Autofluoreszenzversuche an Hippokampus-Schnitten der männlichen Nachkommen untersucht.

Das **5. Kapitel** befaßte sich mit der Frage, in wie weit intensive Lernvorgänge in einem Komplex-Labyrinth Veränderungen der synaptischen Übertragungen im Hippokampus hervorrufen können. Dafür wurden vier Monate alte, männliche CD-1 Mäuse fünf Mal am Tag über einen Zeitraum von acht Tagen im Komplex-Labyrinth trainiert, ehe die exzitatorischen postsynaptischen Feldpotenziale (fEPSPs) in der CA1-Region des Hippokampus von trainierten und untrainierten Tieren gemessen wurden.

Die vorliegende kumulative Dissertationsschrift umfasst neben der Einleitung, den wichtigsten Materialien und Methoden und einer Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussionen drei Kapitel, die bereits in Fachzeitschriften publiziert bzw. zur Publikation vorbereitet sind. Einige Wiederholungen bei einführenden oder zusammenfassenden Worten waren daher unvermeidlich.

1.2. Der Hippokampus

Räumliche Orientierung und Navigation stellen eine der wichtigsten Voraussetzungen für viele Lebewesen dar, sich in ihrem Lebensraum zurechtzufinden (Etienne et al. 1996). So ist es für viele Tierarten von immenser Wichtigkeit, sich Wege einzuprägen oder sich an Landmarken zu orientieren, um z.B. Futterplätze wieder zu finden oder den schützenden Bau bei drohender Gefahr aufzusuchen (Etienne et al. 2000; Stopka & Macdonald 2003). Für derartige visuell-räumliche Wahrnehmungen sind unterschiedliche neuronale Strukturen im Gehirn verantwortlich. Neben verschiedenen Regionen des Neokortex (Alexinsky 2001; Zola-Morgan et al. 1989; Zola-Morgan et al. 1982) wird dem Hippokampus eine entscheidende Rolle bei der Repräsentation der Umgebung und der Navigation in dieser zugeordnet (Pigott & Milner 1993; Nunn et al. 1999; Wood et al. 1999; Crandall et al. 2004; Jarrard 1993; Knierim et al. 1995; Taube et al. 1996). Frühere Tierstudien führten zur Identifizierung sog. „Ortszellen“ im Hippokampus. Diese „Ortszellen“ sind Pyramidenzellen, die auf einen Teil der räumlichen Umwelt des Tieres reagieren, also orts-spezifische Aktivität aufweisen (O'Keefe & Dostrovsky 1971). Weitere

Untersuchungen ergaben, dass mehrere Hippokampusneuronen zusammen „Ortsfelder“ bilden, welche die Umwelt in einer neuronalen Karte repräsentieren (O´Keefe & Nadel 1978). Das heißt, daß Ortszellen nicht nur beim Aufenthalt an einer bestimmten Stelle einer Umgebung feuern (O'Keefe & Speakman 1987), sondern vielmehr codieren Ensembles verschiedener Ortszellen die jeweilige Umwelt, in der sich das Individuum aufhält (Wilson & McNaughton 1993). So kann man z.B. bei Ratten allein durch die Betrachtung der Ortsfelder, d.h. durch die Analyse der Feuerungsmuster vieler Nervenzellen im Hippokampus die Position der Tiere in ihrer Umgebung sehr genau angeben (Wilson & McNaughton 1993). Obwohl hippokampale Ortsfelder durch visuelle Hinweisreize angeregt werden, können die Ortszellen auch bei der Navigation im Dunkeln noch weiter feuern (Quirk et al. 1990; Markus et al. 1994; Mizumori et al. 1999). Darüber hinaus wurden auch bei blinden Ratten Ortszellaktivitäten aufgezeichnet (Save et al. 1998; Hill & Best 1981). Das bedeutet, daß neben visuellen Reizen und anderen sensorischen Eingängen auch motorische Informationen bei der Repräsentation der Umwelt im Hippokampus involviert sind.

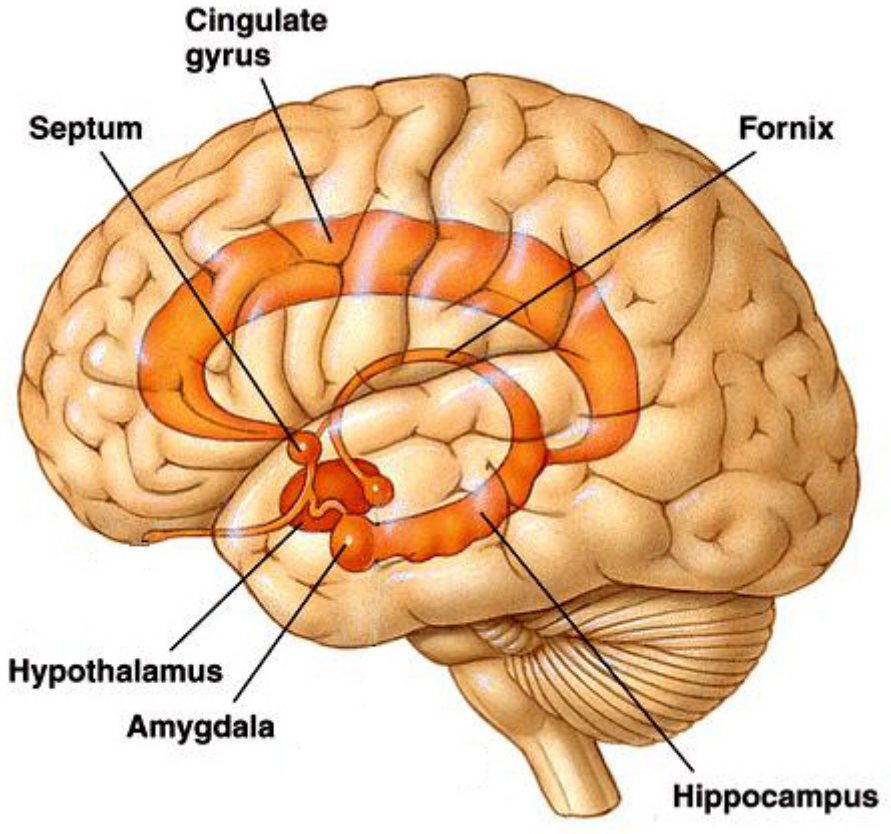

Abb. 1.1: Lage des Hippocampus und der Amygdala im menschlichen Gehirn[1].

[1] Graphik aus: http://www.driesen.com

Neben der Amygdala (der Mandelkern) und dem Hypothalamus ist der Hippokampus eine der wichtigsten Strukturen des limbischen Systems des Gehirns. Abbildung 1.1 zeigt die Lage des Hippokampus und der Amygdala nebst anderen Strukturen des limbischen Systems des menschlichen Gehirns.

Der Hippokampus stellt eine der am besten erforschten Strukturen des Gehirns dar. Er ist sowohl in anatomischer als auch funktioneller Sicht hochgradig regelmäßig organisiert (Brown & Zador 1990). Man kann die Hippokampus-Formation in vier Regionen unterteilen (Giap et al. 2000). Diese werden als CA1 - CA4 (lateinisch: cornu ammonis) bezeichnet, wobei die Regionen CA1 und CA3 den größten Platz einnehmen. Eine schematische Darstellung der Anatomie und ein mikroskopisches Präparat eines sagitalen Hippokampus-Schnittes sind in Abbildung 1.2 zu sehen.

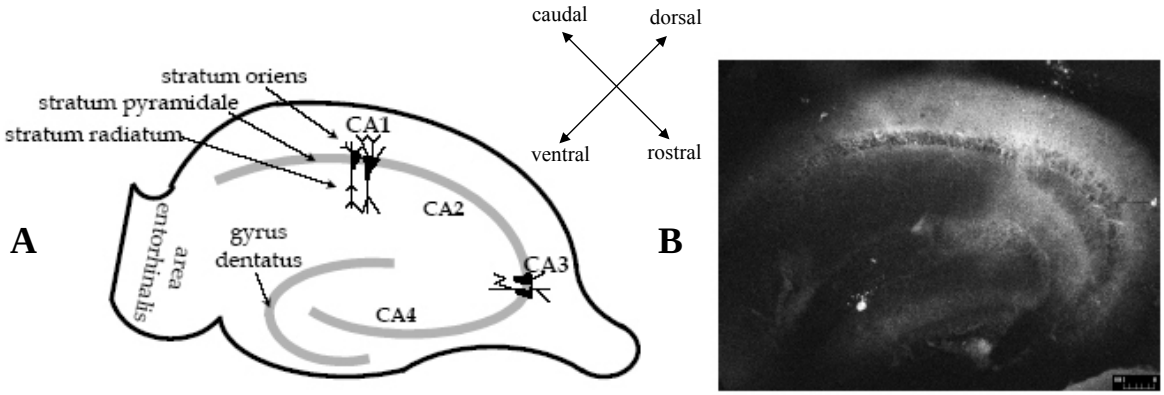

Abb. 1.2: A: Schematische Darstellung des Hippokampus der Maus, grobe Anatomie. B: 300µm dicker Hippokampus-Schnitt der Maus, Färbung: Dipyridamol 10µM, die Pyramidenzellschicht ist sehr gut erkennbar[2].

1.3. Labyrinthversuche

Seit der Wende ins 20. Jahrhundert wurden Labyrinthe eingesetzt (Small 1900; Lashley & Franz 1912), um kognitive Leistungen und Defizite (deklarativer, episodischer oder motorischer Art) bei Versuchstieren zu erforschen (Olton & Samuelson 1976; Young et al. 1994; Nagahara et al. 1995; Sutherland et al. 1983). Anfänglich benutzte man noch sehr komplexe Labyrinthkonstruktionen (siehe Abbildung 1.3). Auf Grund der schwierigen Auswertung solch komplexer Verhaltensstudien bediente man sich später einfacherer

[2] aus Arbeitsgruppe Riepe, Experimentelle Neurologie, Universität Ulm

Labyrinthe wie z.B. dem T-Labyrinth (Gerlai 1998; Farr et al. 2000; Andersen & Sams-Dodd 1998), dem Morris Wasserlabyrinth (Morris 1981; Dringenberg et al. 2001; Logue et al. 1997) oder dem Radial-Labyrinth (siehe Abbildung 1.4) (Schwegler & Crusio 1995; Crusio & Schwegler 2005; Ward et al. 1999).

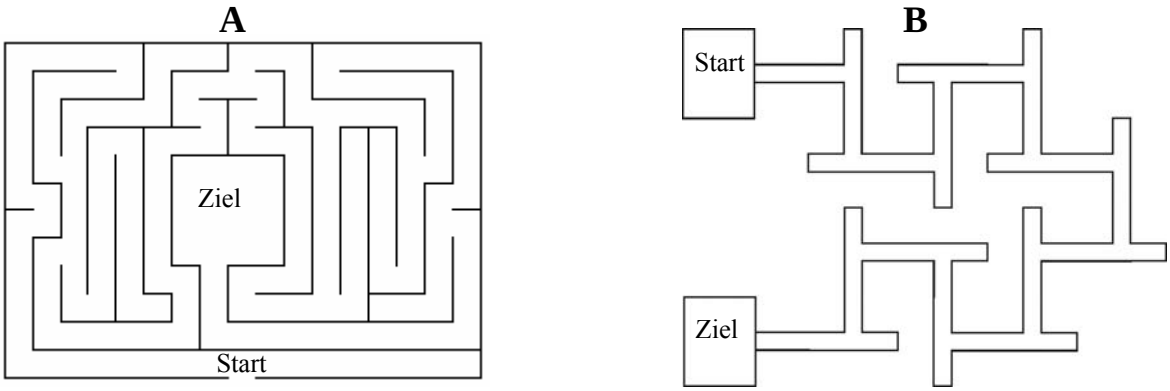

Abb. 1.3: A: Nachbau des Labyrinths von Hampton Court, England mit Start und Ziel, verwendet von Small (um 1900). B: Komplexes Labyrinth mit Start und Ziel, verwendet von Honzik (1936).

Das Morris Wasserlabyrinth besteht aus einem Swimmingpool mit einer entweder für die Tiere sichtbaren oder knapp unter der Wasseroberfläche angebrachten Plattform (Gallagher & Burwell 1989). Da es energetisch günstiger ist, sich auf der Plattform vom Schwimmen auszuruhen, ist es Ziel der Versuchstiere, die Plattform aufzusuchen. Dabei ist es wichtig, sich die Position der Plattform anhand von Raumkoordinaten einprägen zu können, um möglichst gezielt dorthin zu schwimmen.

Das Zentrum des Radial-Labyrinths bildet eine meist runde Plattform, von der aus sich zwischen sechs und zwölf Arme sternförmig wegstrecken. Die Versuchstiere sollen darin versuchen, Futterpellets aus den Trögen am Ende jedes Arms zu finden ohne einen bereits aufgesuchten Arm erneut anzulaufen (Olton & Samuelson 1976).

In Labyrinthversuchen können die Versuchsparameter variiert werden, so daß man unterschiedliche Gehirnregionen untersuchen kann. Zum Beispiel kann man alle Arme oder nur jeden zweiten Arm eines Radial-Labyrinths mit Futterpellets bestücken und somit gezielt das Arbeitsgedächtnis bzw. Referenzgedächtnis erforschen (Ikonen & Riekkinen, Jr. 1999; Ward et al. 1999). Eine wichtige Trennung bei der Untersuchung von Gedächtnisleistungen wird unter anderem zwischen hippokampalen und nicht-hippokampalen Lernvorgängen gezogen (Stoelzel et al. 2002). Unter hippokampalen

Lernvorgängen versteht man Lernvorgänge, an denen der Hippokampus maßgeblich beteiligt ist, z.B. wenn Versuchstiere anhand von visuellen Landmarken im Morris Wasserlabyrinth navigieren und dadurch lernen, die nicht sichtbare Plattform zielgerichtet schwimmend aufzusuchen (Logue et al. 1997). Auch das Navigieren durch komplexe Labyrinthe gilt als hippokampus-abhängiger Lernvorgang (Tolman 1948). Als nicht-hippokampale Lernvorgange werden Lernvörgänge bezeichnet, bei denen der Hippkampus nicht involviert ist, sondern der Lernprozess in anderen Gehirnarealen stattfindet, z.B. im motorischen Cortex beim Erlernen motorischer Fähigkeiten (Rioult-Pedotti et al. 2000). Ebenso scheint der Hippokampus nicht beim Aufsuchen einer sichtbaren Plattform im Wasserlabyrinth involviert zu sein (Gallagher & Burwell 1989). Dies gilt auch wenn ein zusätzlicher Reiz (z.B. ein Lämpchen) auf die nicht sichtbare Plattform hinweist (Stoelzel et al. 2002).

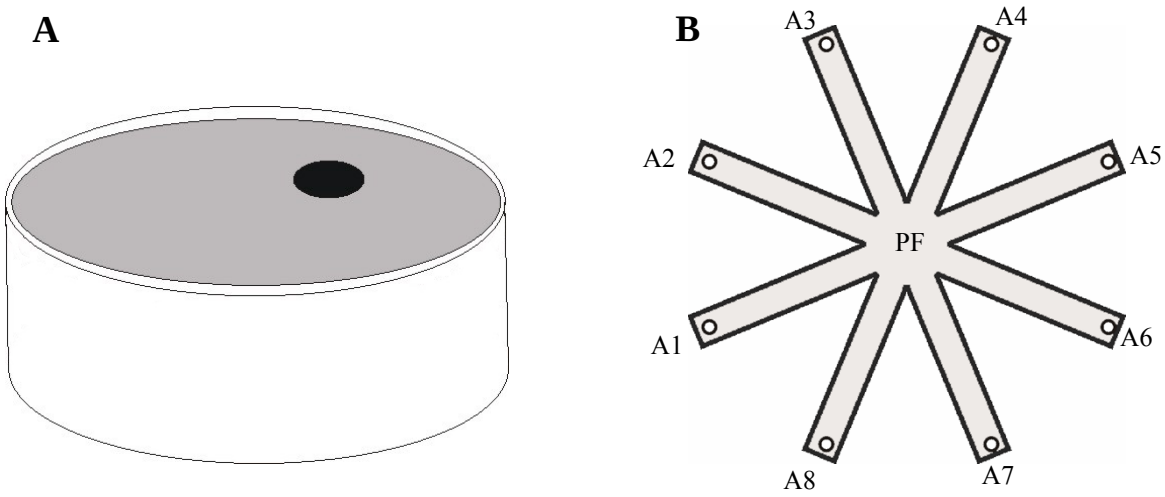

Abb. 1.4: A: Morris Wasserlabyrinth. Der schwarze Kreis zeigt die Lage der Plattform in dem üblicherweise im Durchmesser 1-2 m großen Tank. B: 8-Arm Radial-Labyrinth mit Plattform (PF), den acht Armen (A1-A8) und den endständigen Futtertrögen.

In vielen Studien der letzten Jahrzehnte wurden Auswirkungen von Neuropharmaka auf das Lernverhalten durch Labyrinthexperimente erfaßt (Ohta et al. 1993; Whishaw 1985; Packard & White 1991; Day & Schallert 1996). Darüber hinaus stellen Labyrinthversuche ein wichtiges Instrument dar, um die Auswirkungen von Läsionen im Gehirn zu untersuchen (Floresco et al. 1997; Taube et al. 1992; Nagahara et al. 1995; Packard & McGaugh 1992; Sutherland et al. 1983). So benötigen z.B. Ratten, denen operativ Läsionen im Hippokampus gesetzt wurden, im Gegensatz zu schein-operierten

Tieren deutlich mehr Zeit, um die nicht sichtbare Plattform im Morris Wasserlabyrinth zu finden (Stoelzel et al. 2002).

1.4. Die Alzheimer Krankheit

Nach heutigen Schätzungen leiden ca. 10 –15 % der Bevölkerung über dem 65. Lebensjahr an einem demenziellen Syndrom. Etwa die Hälfte dieser Erkrankungen ist vom Typ einer Alzheimer Demenz. Zeigen sich anfängliche Symptome der Alzheimer Krankheit (AD) in Form von leichten Gedächtnisstörungen, geht die Erkrankung im weiteren Verlauf mit der Beeinträchtigung kognitiver Funktionen, z.B. der Sprache, der Rechenfähigkeit und der Orientierung einher. In post mortem-Studien an Gehirnen von AD-Patienten wurden verschiedene pathophysiologische Veränderungen festgestellt. Eine dieser Veränderungen ist das vermehrte Vorkommen so genannter seniler Plaques. Senile Plaques entstehen durch die Anhäufung fibrillären Materials an beta-Amyloid-Fragmente (Aβ), die sich durch die Abspaltung von Amyloid-Vorläufer-Proteinen (APP) bilden. Im Gegensatz zu gesunden Menschen können diese Aβ-Fragmente bei AD-Patienten nicht abgebaut werden und lagern sich im Zwischenzellraum ab. Im Hippokampus und im Neokortex finden sich diese Ablagerungen bereits in einem sehr frühen Stadium der Alzheimer Erkrankung und breiten sich im Verlauf der Krankheit über weitere Gehirnstrukturen aus.

In vielen Studien wurde eine Abnahme der räumlichen Orientierungs- und Lernfähigkeit auch an einem Mausmodell der Alzheimer-Krankheit aufgezeigt (Berger-Sweeney et al. 1999; Dodart et al. 1999; Chen et al. 2000). Diese Tiere zeigen dieselbe vermehrte Ablagerung von Aβ sowohl im Neokortex als auch im Hippokampus (Hsiao 1998; Hsiao et al. 1996; Holcomb et al. 1999). Ebenso stehen alzheimerbedingte Lerndefizite in unmittelbarem Zusammenhang mit Konzentrationsänderungen von Nervenwachstumsfaktoren (Neurotrophine). Neurotrophine sind Signalpeptide, die einen stabilisierenden Effekt auf bereits bestehende synaptische Verbindungen von Nervenzellen haben. Zur Familie der Neurotrophine gehören die Signalpeptide NGF (*nerve growth factor*), BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), NT-3 (*neurotrophin-3*) und NT-4/5 (*neurotrophin-4/5*) (Levi-Montalcini 1987). In post mortem-Studien an AD-Gehirnen fand man eine erhöhte Konzentration von NGF im Neokortex (Crutcher et al. 1993; Scott et al. 1995; Peng et al. 2004) und BDNF im Hippokampus (Durany et al. 2000). Im Gegensatz dazu waren die BDNF- und NT-3-Konzentrationen im Neokortex vermindert (Durany et al. 2000).

In einer früheren Arbeit an Mäusen begünstigte ein chronischer Mangel an NGF die Bildung der Aβ-Plaques (Capsoni et al. 2002). Darüber hinaus zeigte eine neuere Studie an AD-Patienten, daß die selektive Applikation von NGF ins Vorderhirn den kognitiven Verfall verzögern kann (Tuszynski et al. 2005).

1.5. Präkonditionierung und Metabolisches Imprinting

Schon seit längerem ist bekannt, daß sich der Zellstoffwechsel einer anhaltend verminderten Sauerstoffkonzentration anpassen kann (Lutz 1992; Schurr & Rigor 1987). Am Herzmuskel wurde gezeigt (Murry et al. 1986), daß das Gewebe durch eine kurzfristige Ischämie[3] gegen eine nachfolgende Ischämie geschützt werden kann. Dieses Phänomen bezeichnete man als „Präkonditionierung". Nur wenige Jahre später konnte dieser Anpassungsprozess auch für das Zentralnervensystem bei Wüstenrennmäusen gezeigt werden (Kitagawa et al. 1990). Weitere Untersuchungen legten dar, daß man mit rezidivierender Hypoxie ähnliche ischämische Präkonditionierungseffekte an Hippokampus-Schnitten bei Ratten erreichen kann (Schurr et al. 1986). Je nach zeitlichem Abstand zwischen den aufeinander folgenden Hypoxien konnte entweder ein Schutzeffekt (= Hypoxietoleranz; (Chen et al. 1994)) oder ein vermehrter Zelltod beobachtet werden (Hellweg et al. 2003).

Das Phänomen der Präkonditionierung erlangte praktische Bedeutung, nachdem auch durch chemische Substanzen der Energiestoffwechsel von Nervenzellen gehemmt werden konnte und sich auf diese Weise ebenfalls Präkonditionierungseffekte hervorrufen ließen (Riepe et al. 1997a; Riepe et al. 1996a; Riepe et al. 1996b). Man spricht in diesem Fall von „chemischer Präkonditionierung". Dabei wurden verschiedene Substanzen, die an unterschiedlichen Komplexen[4] (I-IV) des mitochondrialen Energiestoffwechsels eingreifen, erfolgreich als Ersatz zur kurzen Ischämie oder Hypoxie eingesetzt. So inhibiert Amobarbital den mitochondrialen Komplex I, während die 3-Nitropropionsäure[5] den mitochondrialen Komplex II hemmt. Die Wirkung der einzelnen Substanzen ist stark

[3] Infolge mangelnder Blutzufuhr entstehende Blutleere einzelner Organe, z.B. durch einen Schlaganfall

[4] vier Protein-Komplexe, bei denen in einer Reihe von Redoxsystemen durch NADH-Oxidation in den Mitochondrien ATP gebildet wird.

[5] Die 3-Nitropropionsäure ist ein toxisches Stoffwechselprodukt von Leguminosen (Hülsenfrüchten), das auch von Pilzen der Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus* produziert wird. Sie kommt bei Pflanzen sowohl in freier Form als auch mit Glucose verestert vor (Steglich et al., 1997). Die Säure wurde bereits von mehreren Naturstoffchemikern isoliert und auf biologische Aktivität untersucht. Sie zeigt sich als wirksames Mittel gegen Mycobacterium tuberculosis (Wise et al., 1988).

Dosis-abhängig und bei wiederholter Applikation auch Intervall-abhängig und kann bis zu vier Tage anhalten (Riepe & Ludolph 1997; Riepe et al. 1997b).

Das vermehrte Auftreten von Krankheiten, wie z.B. mancher Tumore oder Erkrankungen des Immunsystems durch giftige Belastungen konnten innerhalb von Familien über Generationen hinweg beobachtet werden (Beach et al. 1982; Chandra 1975; Hemsworth 1991; Lundin et al. 1999). Weitere Studien zeigten, daß sich z.B. Diabetes oder Unterernährung der Mutter während der Schwangerschaft auf den Stoffwechsel der Nachkommen auswirken kann. Vorgeburtliche Erkrankungen der Mutter können somit im Energiemetabolismus der nächsten Generation einen „metabolischen Fingerabdruck" (metabolic imprinting) hinterlassen (Lumey & Stein 1997a; Lumey & Stein 1997b; Levin 2000). In Bezug auf das Nervensystem wurde gezeigt, daß die Behandlung trächtiger Kaninchen mit neurotoxischen Substanzen die neuronalen Funktionen des Nachwuchses beeinflußt (Levitt et al. 1998; Stanwood & Levitt 2004).

In der überwiegenden Anzahl der Studien über die Auswirkungen von Noxen auf die Nachkommen wurden die jeweiligen Substanzen während der Schwangerschaft verabreicht, so daß Muttertier und Embryo diesen Noxen direkt ausgesetzt sind (Chalon et al. 1981; Fofana et al. 2002; Konecki et al. 2000; Hansen et al. 2000; Sitarek et al. 1992). Es gibt nur wenige Hinweise darauf, daß Noxen, denen das Muttertier vor einer Schwangerschaft ausgesetzt war, neuronale Veränderungen bei der nächsten Generation hervorrufen können (Popova 1993; Popova 1988; Popova & Frumkina 1982; Popova 2004). Popova zeigte in diesen Studien, daß sich mütterlicher Alkoholkonsum vor der Schwangerschaft auf neuronale Strukturen des sensomotorischen Kortex der Nachkommen auswirken kann. Jedoch gibt es bislang keine Hinweise darauf, ob die Behandlung der Eltern mit Substanzen, die klinisch nicht auffällig sind, das Zentralnervensystem der Nachkommen beeinträchtigen kann.

1.6. LTP und LTD

Um Lernvorgänge auf zellulärer Ebene verstehen und erklären zu können, brachte das von Yamamoto und McIlwain (Yamamoto & McIlwain 1966) in den fünfziger und sechziger Jahren entwickelte Hirnschnitt-Modell einen entscheidenden Durchbruch. Dies erlaubt *in vitro* Methoden an *in vivo* entnommenen Hirnschnitten im zusammenhängenden Gewebsverband, wodurch entscheidende Vorteile bei der Untersuchung von Hirngeweben

entstehen (Dingledine et al. 1980). Unter kontrollierten Bedingungen kann das Nervengewebe von isolierten Hirnschnitten ca. acht Stunden *in vitro* erhalten bleiben. Neuronen und Gliazellen[6] zeigen dabei physiologische Eigenschaften, die weitgehend mit Zellen im unversehrten Gehirn verglichen werden können (Teyler 1980). Die Hirnschnitte werden während der Präparation und elektrophysiologischen Untersuchung konsequent in einer Flüssigkeit gelagert, die der Hirnflüssigkeit (zerebrospinale Flüssigkeit, Liquor) nachempfunden ist. In dieser artifiziellen zerebrospinalen Flüssigkeit (ACSF) lassen sich physiologische Parameter wie Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck, Glukosegehalt und Elektrolyt-Konzentrationen genau kontrollieren und einfach manipulieren.

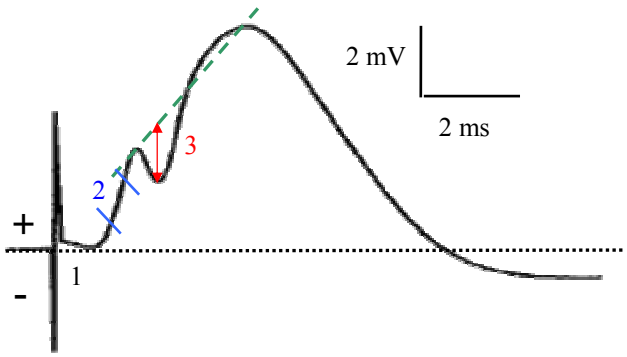

Abb. 1.5: Antwort mehrerer Zellen (fEPSP) auf einen elektrischen Stimulus; 1 = Stimulus-Artefakt; 2 = fEPSP-Anstieg; die beiden kurzen Linien zeigen die Cursorpunkte, zwischen denen die fEPSP-Steigung durch lineare Regression berechnet wird; 3 = abfallender Einschnitt des Populationsspikes; die rote Pfeillinie, die von der Spikespitze bis zur gestrichelten Linie zwischen beiden Maxima führt, zeigt die Höhe des Populationsspikes; modifiziert nach Jeffery (1997).

In den letzten Jahrzehnten entstanden viele Arbeiten, die elektrophysiologisch an präparierten Hippokampus-Schnitten durchgeführt wurden (Perez-Pinzon & Born 1999; Centeno et al. 1999; Aketa et al. 2000). Bei Hippokampus-Schnitten können mit Elektroden durch gezielte Stimulation der Neuronen in der CA3-Region die Antworten auf die Stimulationsreize in der CA1-Region abgeleitet und aufgezeichnet werden. Dabei werden keine einzelnen Aktionspotenziale gemessen. Es handelt sich vielmehr um die

[6] Gliazellen sind nichtneurale Zellen, zu deren wichtigsten Aufgaben es gehört, Substanzen im Gehirn aufzunehmen, die im Überschuß vorhanden sind oder nicht gebraucht werden. Zwei spezielle Funktionen im Wirbeltiergehirn: sie bilden die Myelinhüllen um die Axone und sind am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke beteiligt.

Summe kurzer Depolarisierungen, die durch die Reizung ausgelöst wurden. Die Summe dieser kurzen Depolarisierungen bezeichnet man als exzitatorisches postsynaptisches Potenzial (EPSP). Bei extrazellulären Ableitungen detektiert man jedoch die Summenpotenziale von einer Gruppe von Neuronen. Man spricht deshalb von exzitatorischen postsynaptischen Feldpotenzialen (aus dem englischen als fEPSPs bezeichnet). Abbildung 1.5 zeigt die hervorgerufene Antwort mehrerer Zellen auf einen elektrischen Stimulus.

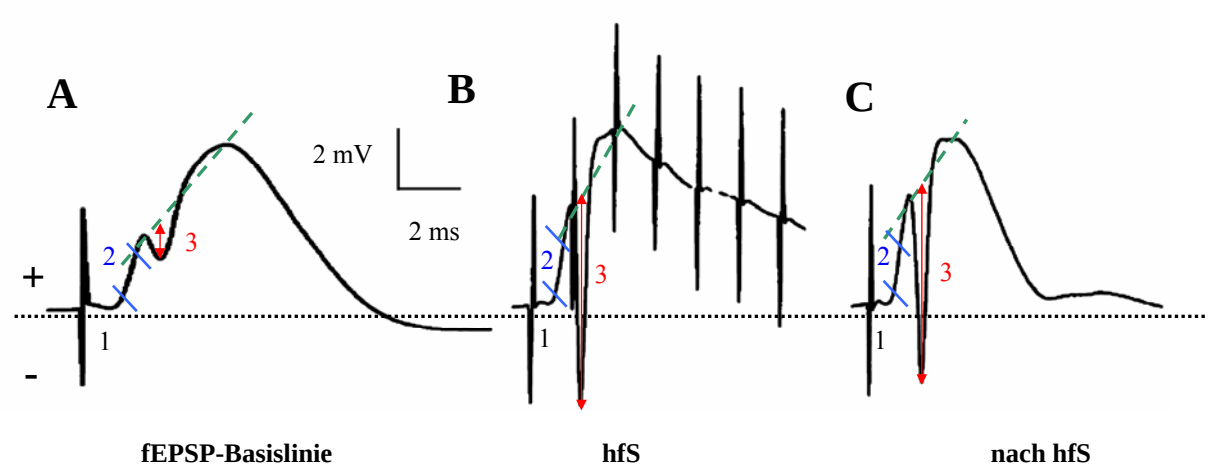

Abb. 1.6: Darstellung der Antworten mehrerer Zellen vor (A), während (B) und nach (C) einem hochfrequenten Stimulus; 1 = Stimulus-Artefakt; 2 = Veränderung der fEPSP-Steigung; 3 = deutliche Zunahme der Populationsspikes; modifiziert nach Jeffery (1997).

In den siebziger Jahren stießen Bliss und Lomo (Bliss & Lomo 1970) bei ihren Experimenten über die synaptische Reaktion des Hippokampus auf elektrische Reizung seiner zuführenden Leitungsbahnen auf das Phänomen der Langzeitpotenzierung (LTP). Sie stimulierten die zuführende Leitungsbahn kurzzeitig mit einem hochfrequenten Stimulus (hfS; 100 Hertz Strompulse für eine Sekunde) und entdeckten, daß die synaptische Antwort der Nervenzellen des Hippocampus auf weitere Reize derselben Bahn nach dem hfS immens zunahm. Diese erhöhte Reaktionsstärke blieb über mehrere Stunden erhalten. Später wurde dieses Phänomen vollständig am Gyrus Dentatus bei Hasen beschrieben (Bliss & Lomo 1973) und ebenso in der CA1/CA3-Region des Hippokampus nachvollzogen (Shapiro 2001; Vaillend et al. 2004; Ishihara et al. 1997). Der steilere Anstieg der fEPSPs und die Vergrößerung der Populationsspikes nach hfS (vgl. Abbildung

1.6) geben Auskunft über die gesteigerte synaptische Wirksamkeit, die die LTP umfasst (Jeffery 1997).

Im Folgenden wird das Prinzip der Langzeitpotenzierung kurz erklärt:

Langzeitpotenzierung läßt sich an Neuronen beobachten, die Glutamat als Neurotransmitter benutzen und NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)- und AMPA (Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropion-Säure)-Rezeptoren, beides Glutamat-Rezeptoren, besitzen. Die Schlüsselrolle bei der Entstehung einer LTP spielt der NMDA-Rezeptor, der jedoch bei schwachen synaptischen Wirkungen nicht aktiv ist, da die mit den NMDA-Rezeptoren verbundenen Ca^{2+}-Kanäle durch Mg^{2+}-Ionen besetzt sind. Nur bei ausreichender Depolarisation verlassen die Mg^{2+}-Ionen diese Kanäle (Gustafsson et al. 1987). Die durch Glutamat aktivierten NMDA-Rezeptoren öffnen daraufhin die Kanäle und Ca^{2+}-Ionen können in die Nervenzelle einströmen (Ascher & Nowak 1986; Mayer et al. 1984). Dieser gewaltige Einstrom von Ca^{2+}-Ionen scheint die Initialzündung für das Auslösen einer LTP zu sein (Malenka et al. 1988). Fällt eines dieser Ereignisse weg, also Glutamat-Bindung an den NMDA-Rezeptor und der dadurch bedingte, hohe Ca^{2+}-Ionen-Einstrom oder die starke Depolarisation des Nervenzellmembranpotenzials, kann keine LTP ausgelöst werden. Aus diesem Grund müssen mehrere Fasern, die auf das Zielneuron projizieren, gereizt werden, da die Menge an Glutamat-Freisetzung von nur wenigen Synapsen die postsynaptische Nervenzelle nicht ausreichend depolarisieren kann. Der erhöhte Kalzium-Einstrom führt zu einer Reihe komplexer molekularer Veränderungen, die in einer Verstärkung der synaptischen Effizienz resultieren. Eine zentrale Rolle spielt die Bindung von Kalzium an Calmodulin und die damit verbundende Aktivierung der Kalzium-Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKII) (Malenka & Nicoll 1999; Vianna et al. 2000). Diese bleibt auch nach Absinken des Kalziumpegels noch längere Zeit aktiv (Braun & Schulman 1995). Aufgrund der Phosphorilierung der AMPA-Rezeptoren durch CaMKII kommt es durch Erhöhung der Ionenleitfähigkeit zu einer Verstärkung des AMPA-vermittelten Stroms und damit zu einer schnelleren und stärkeren Depolarisierung der postsynaptischen Membran (Soderling & Derkach 2000). Darüber hinaus wird durch den übertragenen Impuls in der postsynaptischen Zelle das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthetase (NO-Synthetase) angeregt, welches NO produziert. NO wird nicht in Vesikeln gespeichert, sondern diffundiert frei zur Präsynapse zurück, stimuliert dort die Ausschüttung von Glutamat und verstärkt somit den Nervenreiz durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus (Hawkins et al. 1998; Bohme et al. 1991; O'Dell et al. 1991; Schuman & Madison 1991).

Hemmte man den NMDA-Rezeptor bei Ratten durch einen Antagonisten, ließ sich im CA1-Feld des Hippocampus keine LTP mehr auslösen (Collingridge et al. 1983). Ebenso zeigte sich bei Mäusen, denen eine Untereinheit des AMPA-Rezeptors fehlte, dass keine LTP im Hippokampus mehr ausgelöst werden konnte (Zamanillo et al. 1999). Auch eine Blockierung der NO-Synthetase verhinderte das Auslösen von LTP (Son et al. 1996).

Diese Vorgänge stellen die frühe Phase der LTP (early-LTP, E-LTP) dar und können ungefähr eine Stunde anhalten (Abel & Kandel 1998). Die darauf folgende späte Phase der LTP (late-LTP, L-LTP) führt zu einer dauerhaften Konsolidierung der eingetretenen Veränderungen und kann über Tage hinweg andauern (Bailey et al. 1996). Die L-LTP beginnt, wenn ein Reiz, der zur E-LTP geführt hat, wiederholt dargeboten wird. Dadurch kommt es zur Modifikation der Transkription verschiedener Gene. Durch Phosphorilierung der CaMKII wird das membranständige Enzym Adenylatzyklase aktiviert (Cali et al. 1994), das den sog. *second messenger* cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) bildet. cAMP wiederum aktiviert das Enzym Proteinkinase A (PKA), welches unter anderem den Transkriptionsfaktor CREB (C-AMP-Response Element Binding) phosphoriliert. Parallel dazu steuert NO zur L-LTP bei, indem es die Guanylatzyklase und cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat)-abhängige Proteinkinase stimuliert, die ebenfalls eine Steigerung der Phosphorilierung von CREB hervorruft (Lu et al. 1999).

Durch diese Veränderungen der Transkriptionskaskade kommt es zu einer modifizierten Proteinbiosynthese und zur Änderung vorhandener Zellmembranproteine (Lynch 1998). Auf Grund der strukturellen Veränderungen und durch die Ausbildung neuer Synapsen (Toni et al. 1999) können Gedächtnisinhalte dauerhaft gespeichert werden. Langzeitpotenzierung kann somit als ein Modell für synaptische Plastizität bei Lern- und Gedächtnisvorgängen angesehen werden (Morris & Baker 1984; Kandel 2001). Verschiedene Arbeiten der letzten Jahre bei Ratten brachten LTP in direkten Zusammenhang mit kognitiven Lernleistungen (Sakimura et al. 1995; Okada et al. 2003; Martin et al. 2000; Deupree et al. 1991; Diana et al. 1995). Tombaugh et al. (Tombaugh et al. 2002) zeigten darüber hinaus, daß die individuelle Schwimmzeit von Ratten im Morris Wasserlabyrinth streng mit dem Ausmaß der hippokampalen LTP korrelierte. Kurze Schwimmzeiten gingen dabei mit einer höheren LTP und längere Schwimmzeiten mit einem geringeren Ausmaß der LTP einher.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

2.1.1 Auswahl und Haltung der Tiere

Es wurden zehn Monate alte, weibliche B6-Tg(ThylAPP)23Sdz-Tiere (APP23-Tiere), ein transgenes Tiermodell der Alzheimer Erkrankung, und weibliche B6-Tiere als Kontrolle verwendet. Darüber hinaus wurden sowohl weibliche als auch männliche CD-1 Mäuse im Alter von vier und fünf Monaten in die Versuche einbezogen. Die Tiere wurden geschlechtlich voneinander getrennt in Standardkäfigen für Labormäuse gehalten. Ein 12:12 h Hell-Dunkel-Wechsel, eine durchschnittliche Temperatur von 22 ± 1˚C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 55 ± 5% sorgten für einen geregelten Tag-Nacht-Rhythmus und ein konstantes Klima. Den Tieren stand Wasser und Futter ad libitum zur Verfügung. Lediglich drei Tage vor Beginn der Labyrinthversuche wurde das Futter kontrolliert reduziert, so daß die Tiere 90-85% ihres Ursprungsgewichts erreichten, welches den gesamten Versuch hindurch gehalten wurde. Das Gewicht der Versuchstiere wurde während der Diät-Tage und des gesamten Versuchs hindurch protokolliert. Die Tiere befanden sich unter ständiger medizinischer Aufsicht.

2.1.2 Behandlung der Versuchstiere mit 3-Nitropropionsäure (3-NPA)

Einige Mäusegruppen in Kapitel 4 wurden mit 3-Nitropropionsäure (3NPA, Sigma) bei einer Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht behandelt. Die 3-NPA-Lösung wurde mittels NaOH auf einen pH-Wert von 7.4 titriert und jeden zweiten Tag durch eine intraperitoneale Injektion verabreicht. Insgesamt erhielten die Versuchstiere jeweils neun Injektionen. Einige Tiere erhielten nur eine Injektion.

2.2. Labyrinthe

2.2.1 Komplex-Labyrinth

Als komplexes Labyrinth diente eine 200 cm x 180 cm große, aus undurchsichtigem PVC gefertigte Konstruktion, dessen Laufwege rot und 10 cm breit waren. Die 10 cm hohen Wände bestanden aus grauem Material. Das Labyrinth hatte einen Startpunkt, Kreuzungen, T-Kreuzungen, Sackgassen und eine Zielzone. Es war von einem grauen Vorhang

umgeben, an dem in einer Höhe von 140 cm rote, geometrische Figuren (Kreis, Raute, Viereck, Dreieck) in allen vier Himmelsrichtungen als optische Landmarken befestigt waren (Abbildung 2.1). Das Ziel der Versuchstiere im Komplex-Labyrinth war es, den Zielbereich, in dem sie mit Futterpellets belohnt wurden, zu erreichen. Die Tiere hatten dafür maximal 300 s Zeit.

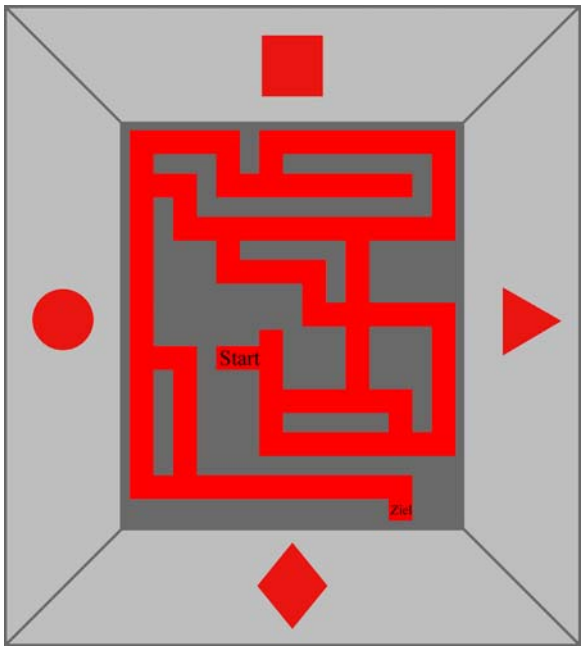

Abb. 2.1: Schematische Sicht aus der Vogelperspektive auf das Komplex-Labyrinth mit Startzone, Kreuzungen, T-Kreuzungen, Sackgassen und einer Zielzone umgeben von einem Vorhang mit optischen Landmarken.

2.2.2 Radial-Labyrinth

Es wurde ein Acht-Arm-Radial-Labyrinth verwendet (Abbildung 2.2), dessen Arme eine Länge von 60 cm und Breite von 10 cm maßen. Eine 10 cm hohe, durchsichtige Plexiglaswand umrandete die von einer im Durchmesser 30 cm großen Plattform abgehenden acht Arme. Für eine bessere Zugänglichkeit stand das Labyrinth auf 65 cm hohen Standbeinen. Am Ende eines jeden Armes befand sich ein kleiner Futternapf. Das Labyrinth war von einem grauen Vorhang umgeben, um optische Landmarken des Labors auszuschließen. Im Radial-Labyrinth war es Ziel der Versuchstiere, in max. 300s die Futterpellets in den Futternäpfen am Ende jedes Arms zu finden.

Um die Orientierung an Duftmarkierungen zu vermeiden, wurde sowohl das Komplex-Labyrinth als auch das Radial-Labyrinth vor jedem Versuch gründlich gereinigt.

Sowohl über dem Komplex-Labyrinth als auch dem Radial-Labyrinth war in der Mitte eine Video-Kamera (CCD-TR818, Sony, USA) befestigt, die die Bilder der Versuche an einen PC weiterleitete. Die Software des PCs (Multitrack, Accuscan, USA) zeichnete aus den von der Video-Kamera empfangenen Bildern unterschiedlichste Parameter, wie z.B. die Laufzeit auf.

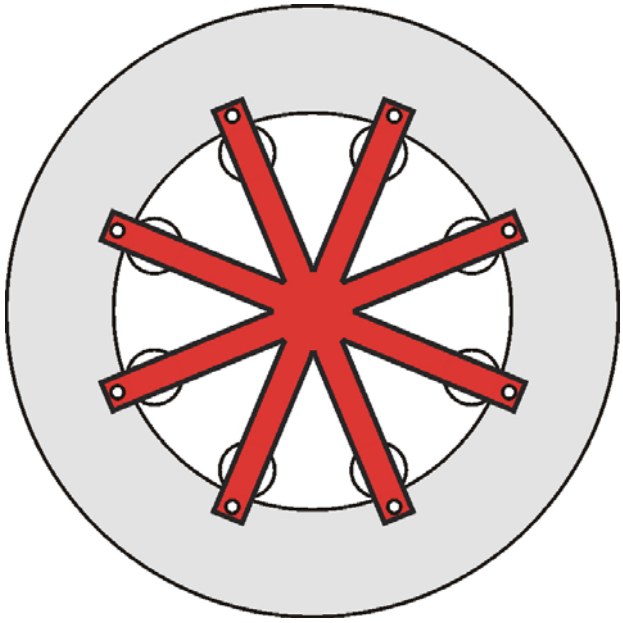

Abb. 2.2: Schematische Sicht aus der Vogelperspektive auf das Acht-Arm-Radial-Labyrinth mit Futternäpfen an den Enden der Arme umgeben von einem grauen Vorhang.

2.3. Elektrophysiologie (LTP)

2.3.1 Präparation der Hippokampus-Schnitte

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Innerhalb von 45 bis 60 Sekunden wurde die Schädeldecke eröffnet, die Hirnhäute aufgetrennt und das Gehirn in ein Becherglas mit 2 – 4 ˚C kalter artifizieller zerebrospinaler Flüssigkeit (ACSF) überführt. In dieser waren 126 mM NaCl, 26 mM $NaHCO_3$, 5 mM KCl, 2.4 mM $CaCl_2$, 1.3 mM KH_2PO_4, 1.3 mM $MgSO_4$ und 10 mM Glukose (alle Chemikalien der Firma Sigma) in bi-destilliertem Wasser gelöst. Nach Abkühlung des Gehirns wurde das Kleinhirn abgetrennt (Abbildung 2.3, Schnitt 1). Ein weiterer Schnitt durch das verbleibende Hirn ca. 1 mm

rechts von seiner Längsachse (Abbildung 2.3, Schnitt 2) hinterließ etwa ein viertel der rechten Hemisphäre und die komplette linke Hemisphäre.

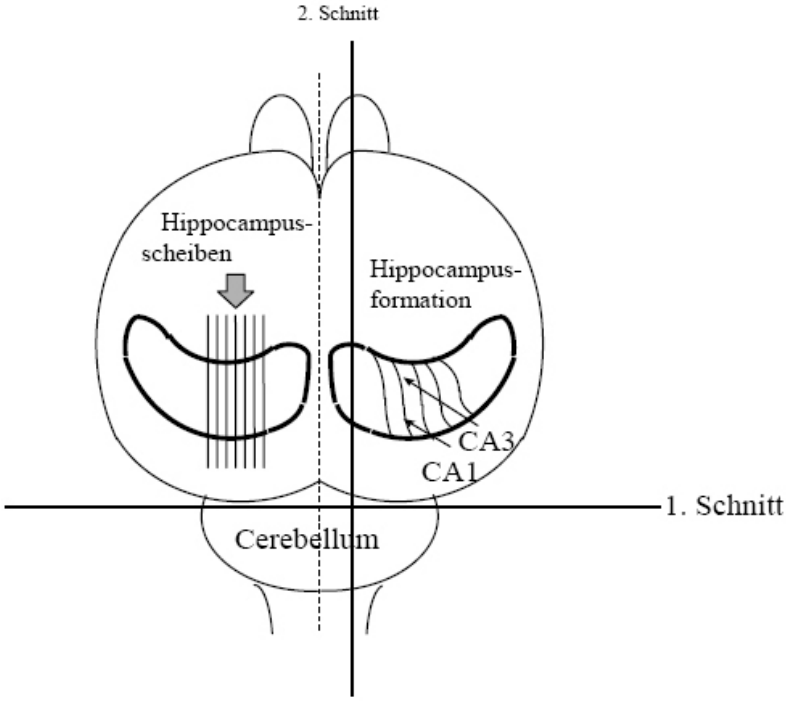

Abb. 2.3: Blick von oben auf das schematisierte Gehirn.

Diese Hirnhälfte wurde mit der Schnittfläche, der Kortex zur Klinge zeigend, auf einen Teflonblock geklebt und in die Schneidekammer eines elektrischen Vibratoms (Campden Instruments, USA) überführt. Ein 1 cm^3 großer Agarblock, der von der Klinge weg zeigend hinter die Hirnbasis geklebt wurde, stabilisierte das in Scheiben zu schneidende Gehirn. Die Schneidekammer wurde anschließend mit 2 – 4 ˚C kalter ACSF gefüllt, so daß das Hirngewebe vollständig eingetaucht war. Auf Grund der anatomischen Lage der Hippokampus-Formation der Maus wurde der Hippokampus beim Schneiden transversal zu seiner eigenen Längsachse getroffen und bei einer Dicke von 400 µm konnten mit dem Vibratom je nach Größe des Gehirns vier bis fünf Hirnschnitte in sagitaler Richtung geschnitten werden. Mit einer Saugpipette wurden die Hirn-Scheiben aufgenommen und in eine mit oxygenierter, 2 – 4 ˚C kalter ACSF gefüllte Petrischale übertragen. Dort wurden die Hippokampus-Schnitte mit einem Skalpell herauspräpariert und mit der Saugpipette in kleine Käfige einer Inkubationskammer gelegt. Bis zu diesem Zeitpunkt dauerte die Präparation ca. 9 bis 10 Minuten. In der Inkubationskammer wurden die Scheiben auf feinmaschigem Nylongitter gelagert und mindestens eineinhalb bis maximal drei Stunden in ACSF bei Raumtemperatur (23 ± 1 ˚C) inkubiert. Durch begasen der

Inkubationsflüssigkeit mit einem Gasgemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxyd war die Sauerstoffversorgung und somit die Erholung der Hippokampus-Schnitte von der Präparation gewährleistet (Riepe et al. 1996c). Die Stärke der Begasung war so eingestellt, dass der für die Erhaltung von Hirnscheiben erforderliche Sauerstoffpartialdruck von mindestens 400mmHg in der Inkubationslösung erreicht wurde.

2.3.2 Versuchsaufbau und Ablauf der LTP

Für die Versuche wurden die Hippokampus-Schnitte aus der Inkubationskammer in eine Messkammer transferiert, die auf einem auf Druckluft gelagerten Messtisch angebracht und von einem Faradayschen Käfig umgeben war. Eine peristaltische Pumpe durchspülte die Kammer mit 30 ± 1 ˚C warmer oxygenierter ACSF (6 ml/min). Um ein Fortspülen der Hippokampus-Schnitte zu verhindern, wurden die Schnitte zur Stabilisierung mit einem Nylonnetz bedeckt.

Im Folgenden wurden zwei Mikroelektroden mittels Mikromanipulatoren im Gewebe positioniert (Abbildung 2.4). Als Stimulationselektroden dienten bipolare Wolfram-Elektroden. Die Meßelektroden wurden aus Borosilikatglaskapillaren (World Precision Instruments, Berlin) mit einem Innendurchmesser von 1,0 mm gefertigt. Dazu mussten die Glaskapillaren mit einem Elektrodenpuller (Sutter Instruments Co., USA) erhitzt und gezogen werden, so dass die Spitze einen Durchmesser von ca. 20 µm erhielt. Anschließend wurden die Kapillaren mit ACSF gefüllt, wodurch sie einen Widerstand von 1 – 3 MΩ erhielten.

Nachdem die Meßelektrode im Stratum radiatum der hippokampalen CA1-Region und die Stimulationselektrode in der CA3-Region des Hippokampus schrittweise angelegt wurden, wurden die Bahnen der Schaffer´schen Kollateralen durch einen Stimulusgenerator (S48 Stimulator, Grass Instrument Co., W. Warwick, USA) über eine Isoliereinheit mit galvanischer Trennung (Grass Instrument Co., W. Warwick, USA) mit einer Stimulusfrequenz von 0,05 Hz gereizt. Hierbei handelte es sich um 200 µs Rechteckimpulse. Die von der Meßelektrode empfangenen exzitatorischen post-synaptischen Feldpotentiale (fEPSPs) wurden über einen Vorverstärker (Super-Z, CWE Inc., USA) und einen Verstärker (Bioamplifier BMA-931, CWE Inc., USA) zum D/A-Wandler (DIGI DATA 1200 Series, Axon Instruments, USA) geleitet. Von dort konnten die Signale mit einer Software (Axoscope 8.0, Axon Instruments, USA) über einen Rechner visualisiert und gespeichert werden. Als zusätzliche visuelle Kontrolle über die

Signale wurde ein Oszilloskop vom Stimulator getriggert und erhielt ein Output-Signal des Verstärkers. Ebenso wurde der D/A-Wandler durch das Stimulationssignal für die Aufnahme durch den Rechner getriggert (Abbildung 2.5).

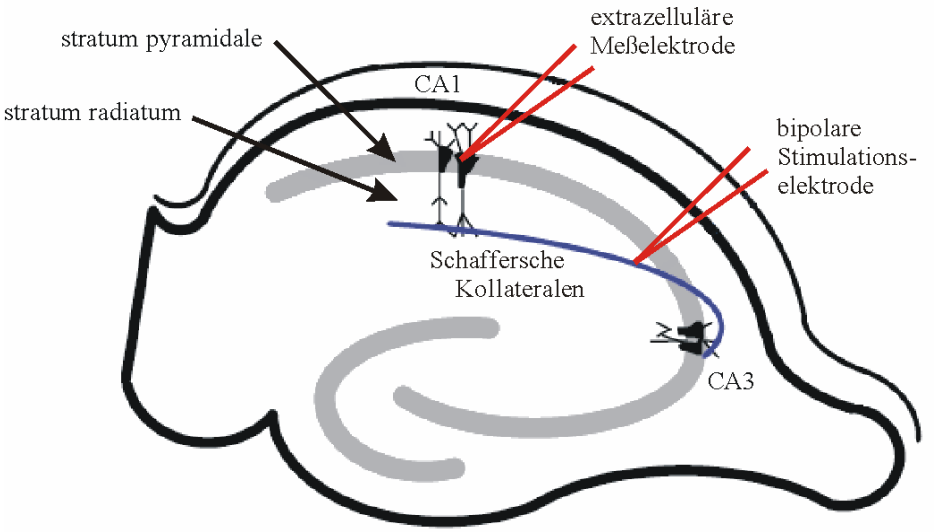

Abb. 2.4: Grobe Anatomie eines Hippokampus-Schnitts der Maus und Lage der Elektroden bei LTP-Versuchen.

Nachdem sich die fEPSPs stabilisiert hatten, wurde die spätere Stimulusintensität, die den gesamten Versuch hindurch verwendet wurde, eingestellt. Dies geschah durch eine Input-Output-Kurve, die durch Reizstärken zwischen 5 - 9 V in 0,5 V Schritten ermittelt wurde. War die maximale Antwort auf einen Reiz erreicht, wurde die Reizstärke für den weiteren Versuch so eingestellt, dass man ca. 50 % der maximalen Antwort erhielt. Nach einer zehn Minuten langen Aufnahme der Basisableitung, wurde die Langzeitpotentierung eingeleitet. Dazu wurden die Schaffer´schen Kollateralen mit einem hochfrequenten Stimulus (hfS, 100 Hz) für eine Sekunde lang gereizt. Nach Stabilisierung des LTP-Effekts wurden weitere 60 min fEPSPs mit 0,05 Hz ausgelöst und aufgezeichnet.

2.3.3 Auswertung der LTP-Versuche

Als Kontrollkurven dienten zwischen acht und zehn fEPSPs der Basislinie vor dem hfS. Nach dem hochfrequenten Stimulus (hfS) wurden die Steigungen von je fünf aufeinander folgenden fEPSP-Kurven bei 5, 30 und 60 min gemittelt und das Ausmaß der LTP als

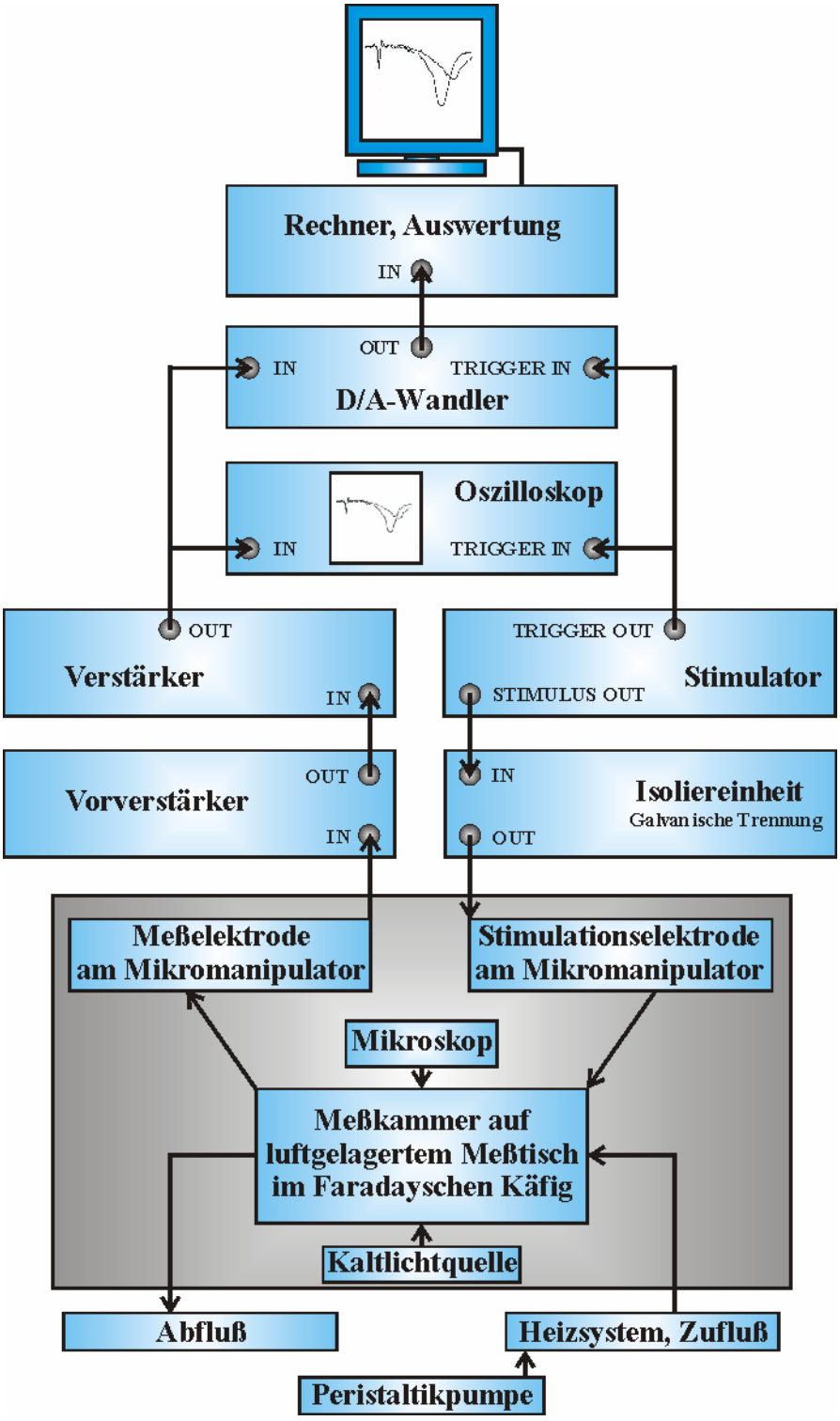

Abb. 2.5: Aufbau der LTP-Versuche.

prozentuale Vergrößerung der Steigung der fEPSPs vor der dem hfS angegeben. Durch Anlegen einer Steigungsgeraden an die fEPSPs und Markierung von zwei Punkten auf dieser Geraden wurden die Steigungen berechnet (Abbildung 2.6). Für die Steigung m vor

LTP galt $m_{PQ} = (Y_Q-Y_P)/(X_Q-X_P)$. Die Steigung m´ nach LTP wurde mit $m'_{P'Q'} = (Y_{Q'}-Y_{P'})/(X_{Q'}-X_{P'})$ berechnet.

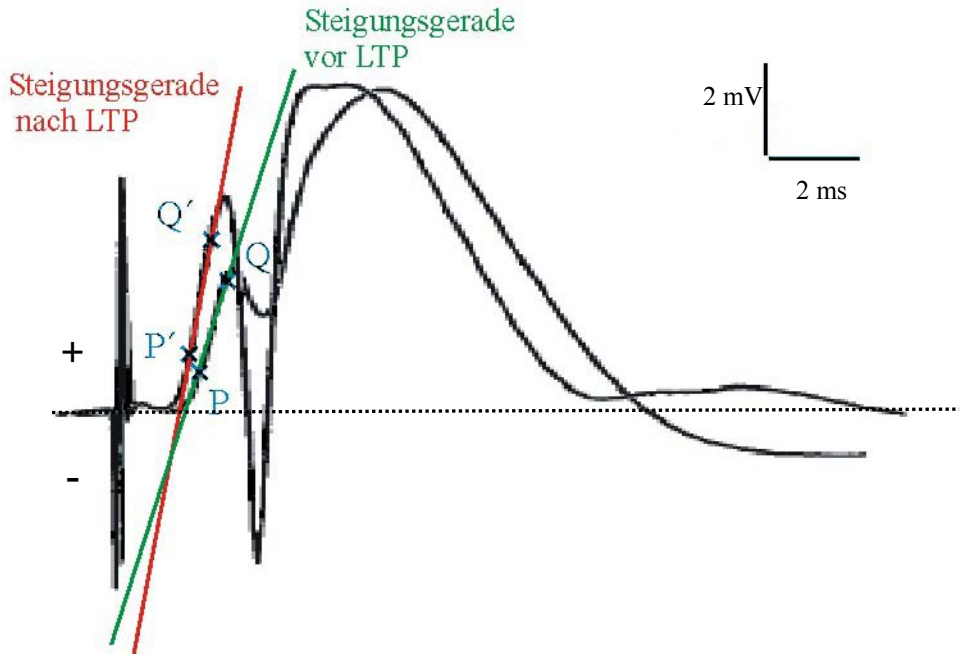

Abb. 2.6: Darstellung der Steigungsberechnung vor und nach LTP anhand zweier fEPSPs.

3. Spatial navigation in complex and radial mazes in APP23 animals and neurotrophin signaling as a biological marker of early impairment

Hellweg, R., Lohmann, P., Huber, R., Kühl, A. & Riepe, M. W. 2006
Learn. Mem. 13: 63-71

Abstract

Impairment of hippocampal function precedes frontal and parietal cortex impairment in human Alzheimer's disease (AD). Neurotrophins are critical for behavioral performance and neuronal survival in AD. We used complex and radial mazes to assess spatial orientation and learning in wild-type and B6-Tg(ThylAPP)23Sdz (APP23) animals, a transgenic mouse model of AD. We also assessed brain content of nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and neurotrophin-3 (NT-3). Performance was alike in wild-type and APP23 animals in the radial maze. In contrast, performance in the complex maze was better in wild-type than APP23 animals. Contrary to the wild-type, hippocampal BDNF levels decreased on training in APP23 animals. Hippocampal and frontal cortex NGF levels in APP23 animals correlated with the time to solve the complex maze, but correlated inversely with escape time in wild-type animals. NT-3 levels were alike in wild-type and APP23 animals and were unchanged even after training. Both types of mazes depend on hippocampal integrity to some extent. However, according to the cognitive mapping theory of spatial learning the complex maze due to the increased complexity of the environment most likely depends stronger on preserved hippocampal function than the radial maze in the working memory configuration applied here. Greater impairment in complex maze performance than in radial maze performance thus resembles the predominant affliction of the loss of hippocampal function in human AD. NGF- and BDNF-levels on maze learning are different in wild-type and transgenic animals, indicating that biological markers of AD may be altered on challenge even though equilibrium levels are alike.

4. The stamp of ancestry: roots of behavioral and neuronal impairment in adulthood

Peter Lohmann, Christian Lange-Asschenfeldt, Roman Huber, Matthias W. Riepe

Exp. Neurol. 2006 in press

Abstract

Exposure of pregnant animals to noxious conditions affects neuronal function in the offspring. However, exposure or treatment of the maternal animal during pregnancy affects both ancestor and offspring. In the present study, female CD-1 mice were repetitively treated with 3-nitropropionate (3-np), a selective inhibitor of succinic dehydrogenase, exclusively prior to mating. Clinically, mice appeared normal during treatment. Five days after cessation of treatment animals were mated with control male animals. At 4 months of age spatial learning, LTP, NADH autofluorescence, and hypoxic tolerance were alike in controls and the offspring of treated female ancestors. However, an additional metabolic challenge in the offspring unmasks impairment of spatial learning, diminuition of long-term potentiation (LTP), an altered protein microenvironment of mitochondrial enzymes, and reduced hypoxic tolerance. We conclude that the exposure of maternal ancestors to subclinical repetitive impairment of oxidative phosphorylation fosters impairment of behavior and neuronal function in the adult offspring, becoming apparent only on additional challenge. This finding may ultimately help to understand the causes of neuronal impairment or even neuropsychiatric disease in old age.

5. Spatial learning in a complex maze is accompanied by hippocampal synaptic depression

Christian Lange-Asschenfeldt, Peter Lohmann, and Matthias W. Riepe

Submitted to Neurobiol. Learn. Mem.

Abstract

Activity-dependent alteration in synaptic efficacy is referred to as synaptic plasticity and is the believed hallmark of any learning process. Here we employed a recently validated complex maze for spatial training and investigated the impact of repeated task exposure on basal synaptic transmission of the hippocampal Schaffer collateral-CA1 synaptic connection in vitro. In the present experiments, male CD-1 mice were trained in a complex maze for eight consecutive days five times a day. Subsequently, field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) recorded in the CA1 area following stimulation of the Schaffer collateral-commissural fiber pathway were analyzed in acute hippocampal slices. We found a marked decrease of the fEPSP response in trained compared to untrained animals. The findings provide evidence for a direct implication of homosynaptic hippocampal long-term depression in a spatial learning paradigm.

6. Zusammenfassung

6.1. Ergebnisse

In den Versuchen aus **Kapitel 3** absolvierten die Tiere sowohl ein acht-Arm Radial-Labyrinth als auch das neu entwickelte Komplex-Labyrinth ein Mal am Tag über eine Periode von 20 Tagen. Im Radial-Labyrinth konnten sowohl die weiblichen B6-Kontrolltiere als auch die APP23-Tiere die Anzahl ihrer Fehler, d.h. den wiederholten Eintritt in einen bereits aufgesuchten Arm vom ersten auf den letzten Tag signifikant verringern. Die Zeit, die sie benötigten, um alle Futterpellets in den acht Armen des Radial-Labyrinths zu finden, war bei beiden Gruppen über die gesamte Versuchsperiode nicht signifikant verschieden. Die Experimente im Komplex-Labyrinth zeigten dagegen einen deutlichen Lernunterschied auf. Während die B6-Kontrolltiere die Zeit, die Zielzone zu erreichen, vom ersten auf den letzten Tag signifikant verringerten, gelang es den APP23-Tieren über die gesamte Versuchsperiode nicht, ihre Laufzeit zum Aufsuchen der Zielzone signifikant zu verkürzen. Daraus folgte ein signifikanter Unterschied in den kumulierten Laufzeiten der beiden Gruppen.

Im Anschluß an die Labyrinthversuche wurden die Neurotrophin-Konzentrationen im Hippokampus, Striatum und frontalen Kortex analysiert. Diese Konzentrationsmessungen wurden ebenso an B6- und APP23-Kontrolltieren, die nicht in Labyrinthversuche eingebunden waren, durchgeführt. Bei nichttrainierten B6-Tieren war die Konzentration von NGF im Hippokampus und Striatum, nicht aber im frontalen Kortex, gegenüber den nichttrainierten APP23-Mäusen signifikant höher. Sowohl bei den trainierten B6-Mäusen als auch bei der trainierten APP23-Gruppe ergab die Messung von NGF im Hippokampus gegenüber untrainierten Tieren eine signifikant geringere Konzentration. Die Analyse der NGF-Konzentration im Striatum und frontalen Kortex zeigte dagegen bei nichttrainierten und trainierten B6- und APP23-Mäusen ein ähnliches Niveau. Die BDNF-Konzentration im frontalen Kortex der nichttrainierten APP23-Tiere war signifikant höher als bei den nichttrainierten B6-Kontrollen, während im Hippokampus und im Striatum ein ähnlicher BDNF-Level gemessen wurde. Bei der trainierten APP23-Gruppe fand sich eine signifikant geringere BDNF-Konzentration im Hippokampus im Vergleich zu nichttrainierten APP23-Tieren, während in anderen Hirnregionen sowie bei den trainierten und nichttrainierten Kontrolltieren keine signifikanten Unterschiede ermittelt wurden. Die Analyse von NT-3 zeigte im frontalen

Kortex bei trainierten APP23-Mäusen eine signifikant höhere Konzentration gegenüber der nichttrainierten APP23-Gruppe. In anderen Hirnregionen der APP23-Tiere ebenso wie bei trainierten als auch untrainierten B6-Mäusen gab es keine signifikanten Unterschiede der NT-3-Konzentrationen.

Die Korrelationsanalyse der Laufzeiten im Komplex-Labyrinth mit der NGF-Konzentration zeigte für die B6-Kontrolltiere, daß eine kürzere Laufzeit (= verbesserte Leistung) mit einer Erhöhung der NGF-Konzentration im Hippokampus einhergeht. Im Gegensatz dazu korrelierten diese beiden Parameter bei der APP23-Gruppe in entgegen gesetzter Richtung. Hier ist eine verbesserte Leistung im Komplex-Labyrinth mit einer niedrigeren NGF-Konzentration verbunden. Einen ähnlichen Trend zeigte auch der NGF-Level im frontalen Kortex der APP23-Mäuse. Bei den Kontrolltieren war keine Korrelation zwischen Laufzeit und NGF-Konzentration im frontalen Kortex zu finden. In anderen Hirnregionen waren keine Wechselbeziehungen zu Laufzeiten im Komplex-Labyrinth nachzuweisen. Dasselbe galt für die Neurotrophine BDNF und NT-3. Auch zwischen Neurotrophin-Konzentrationen und den Lernleistungen im Radial-Labyrinth waren keine Zusammenhänge ersichtlich.

Durch die Versuche in dem neu entwickelten Komplex-Labyrinth kann die Alzheimer-Erkrankung bei APP23-Tieren bereits in einem frühen Stadium aufgezeigt werden. Ebenso weist die unterschiedliche Korrelation von NGF im Hippokampus und Laufzeit im Komplex-Labyrinth zwischen Kontroll- und APP23-Tieren auf einen Beginn der Alzheimer-Krankheit hin.

Bei der Studie in **Kapitel 4** wurden die männlichen Nachkommen (im Weiteren als F1-Tiere bezeichnet) von CD-1 Müttern, die durch neun Injektionen mit 3-NPA präkonditioniert wurden, herangezogen. Als Kontrollen dienten männliche Nachkommen (im Weiteren als F0-Tiere bezeichnet) unbehandelter Muttertiere. Eine F1-Gruppe sowie eine F0-Gruppe wurden zusätzlich durch neun Injektionen mit 3-NPA behandelt. Diese vier Gruppen durchliefen das Komplex-Labyrinth fünf Mal täglich über einen Zeitraum von acht Tagen. Alle Gruppen konnten darin ihre Laufzeiten vom ersten auf den letzten Tag signifikant verkürzen. Während sich die Laufzeiten der unbehandelten F1- und F0-Tiere über die gesamte Versuchsperiode nicht unterschieden, zeigte der Vergleich der mit 3-NPA behandelten F1- und F0-Gruppe an Tag zwei und drei ein signifikant langsameres Lösungsverhalten der F1-Mäuse. An den restlichen Tagen gab es keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Zwischen den Tieren der nicht behandelten und mit 3-NPA

behandelten F0-Gruppen gab es während der gesamten Versuchsperiode keine signifikanten Unterschiede in der Laufzeit. Auch beide F1-Gruppen erreichten am ersten Tag noch in fast in gleicher Zeit die Zielzone des Komplex-Labyrinths. Von Tag zwei bis Tag vier jedoch waren die unbehandelten F1-Tiere signifikant schneller beim Aufsuchen des Zielbereichs.

In den anschließenden LTP-Versuchen dienten sowohl F1- als auch F0-Gruppen, die keine Versuche im Komplex-Labyrinth absolvierten, als Kontrolle. Der Vergleich der LTP dieser Gruppen erbrachte keine Unterschiede. Bei den trainierten, unbehandelten F0-Mäusen war allerdings eine signifikant größere Steigung der fEPSPs gegenüber der untrainierten, unbehandelten F0-Gruppe zu beobachten. Die unbehandelten, trainierten sowie untrainierten F1-Gruppen wiesen dagegen das gleiche LTP-Ausmaß auf. Der Vergleich der LTP trainierter F0- gegenüber trainierter F1-Mäuse zeigte jedoch sowohl bei unbehandelten als auch bei zusätzlich mit 3-NPA behandelten Tieren einen signifikant steileren Anstieg der fEPSPs bei den F0-Tieren.

Für die Hypoxie-Versuche wurden nur F0- und F1-Gruppen herangezogen, die keine Labyrinthversuche durchgeführt haben. Verglichen wurden hierbei sowohl unbehandelte als auch einmalig mit 3-NPA (20 mg/kg KG; i.p.) behandelte F0- und F1-Tiere. Dabei zeigte sich in der Erholungsphase nach einer 15-minütigen hypoxischen Episode, daß die Neuronenantworten im Hippokampus der einmalig mit 3-NPA behandelten F0-Tiere gegenüber der unbehandelten Gruppe signifikant stärker waren. Bei den F1-Tieren verringerten sich dagegen die Neuronenantworten durch die einmalige Gabe von 3-NPA signifikant gegenüber der unbehandelten F1-Gruppe. Die NADH-Spektren vor der hypoxischen Episode ergaben für die F0- und F1-Tiere ein signifikant verschiedenes Maximum des Wellenbereichs und blieben in der Erholungsphase bei der F0-Gruppe unverändert, während es sich bei der F1-Gruppe signifikant in den roten Wellenbereich verlagerte. Dagegen zeigte die zusätzliche Behandlung mit 3-NPA bei der F0-Gruppe eine signifikante Verlagerung in den blauen Wellenbereich. Bei der F1-Gruppe verlagerte sich der Wellenbereich nicht und blieb im Vergleich zur F0-Gruppe signifikant unverändert.

Diese Einzelergebnisse zeigen, daß die männlichen Nachkommen von wiederholt vor der Schwangerschaft mit 3-NPA behandelten Muttertieren Veränderungen der Lernleistungen in einem Komplex-Labyrinth aufweisen. Darüber hinaus zeigen Versuche am Hippokampus dieser Tiere abgewandelte neurophysiologische Eigenschaften.

In den Experimenten des **5. Kapitels** absolvierte eine Gruppe männlicher CD-1 Mäuse das Komplex-Labyrinth fünf Mal am Tag über einen Zeitraum von acht Tagen. Anschließend wurden in Hippokampus-Schnitten dieser Tiere und bei Kontrolltieren fEPSPs in Schaffer´schen Kollateralen der CA-3-Region ausgelöst und in CA-1 abgeleitet.

Die Versuchstiere zeigten ein ausgeprägtes Lernverhalten, welches sich durch eine signifikante Abnahme sowohl der Laufzeit als auch der zurückgelegten Distanz bis zur Zielzone, darlegte. In den darauf folgenden elektrophysiologischen Messungen waren die Steigungen der fEPSPs im Hippokampus der trainierten Tiere gegenüber der nichttrainierten Gruppe hoch signifikant verringert. Das heißt, daß die Anstiegsdauer der fEPSPs länger und somit die Steigung kleiner geworden war. Die intensiven Lernvorgänge im Komplex-Labyrinth spiegelten sich, entgegen allen Erwartungen, in diesem Versuchsparadigma durch eine verminderte synaptische Übertragung in den Schaffer´schen Kollateralen im Hippokampus wider (siehe Diskussion).

6.2. Diskussion

Labyrinthexperimente stellen ein etabliertes Modell dar, um Lernvorgänge bei Versuchstieren zu erforschen (Tolman 1948). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb ein neu entwickeltes Komplex-Labyrinth anhand eines bekannten Tiermodells der Alzheimer Erkrankung (APP23-Tiere) auf seine Tauglichkeit, hippokampus-sensitive Lernvorgänge zu erforschen, getestet. Ein ähnliches Labyrinth wurde in virtueller Form bereits in einer früheren Studie erfolgreich beim Menschen angewandt (Grön et al. 2000). Da Aβ-Plaques im Hippokampus bereits in einem sehr frühen Stadium der Alzheimer-Erkrankung zu finden sind und die APP23-Mäuse in diesem Komplex-, nicht aber im Radial-Labyrinth deutlich schlechtere Lernleistungen zeigten als die Kontrolltiere, konnte dieses neue Labyrinth als durchaus hippokampus-sensitiv angesehen werden. In älteren Tierstudien wurden häufig Wasserlabyrinthe eingesetzt, um hippokampale Lernvorgänge zu erforschen (Avital et al. 2003; Bennett & Rose 1992; Nelson et al. 1997). Der dabei auftretende Stress durch das Schwimmen konnte die Lernleistung der Versuchstiere beeinträchtigen (Holscher 1999). Ebenso zeigten andere Studien, daß bei Versuchen in Wasserlabyrinthen unterschiedliche korrelative Beziehungen zwischen Lernleistungen und Neurotrophinen auftraten (Sugaya et al. 1998; Bimonte-Nelson et al. 2003; Schaaf et al. 2001) und daß die Neurotrophin-Konzentrationen im Hippokampus unter Stressbedingungen abnahmen (Ueyama et al. 1997; Scaccianoce et al. 2003; von Richthofen et al. 2003; Adlard & Cotman 2004). Diese Ergebnisse waren für die vorliegende Arbeit von Bedeutung, da nach

den Versuchen im Komplex-Labyrinth die Neurotrophin-Konzentrationen in verschiedenen Hirnregionen (Hippokampus, Striatum und frontaler Kortex) der Versuchstiere untersucht wurden. Zwar könnte die Futterreduktion vor und während der Labyrinth-Versuche ebenfalls einen Stressfaktor für die Tiere darstellen, doch zeigten einige Studien, daß auf Diät gehaltene Mäuse und Ratten in verschiedenen Labyrinthen (Radial-Labyrinth, Morris Wasserlabyrinth, Komplex-Labyrinth) bessere Lernleistungen erzielten als Artgenossen, denen Futter ad libitum zur Verfügung stand (Idrobo et al. 1987; Ingram et al. 1987; Stewart et al. 1989).

Die Untersuchung der Neurotrophin-Konzentrationen ergab, gleich einer früheren Studie (Bimonte et al. 2003), dass die NGF- und BDNF-Konzentrationen im frontalen Kortex bei trainierten und untrainierten Versuchstieren ähnlich waren. Im Gegensatz dazu waren der hippokampale NGF-Level bei den trainierten Kontrolltieren sowie der NGF- und der BDNF-Level bei den trainierten APP23-Tieren herabgesetzt. Die Korrelationsanalyse der Neurotrophin-Konzentrationen mit den Laufzeiten im Komplex-Labyrinth ergab einen qualitativen Unterschied zwischen den Kontroll- und APP23-Tieren. Während die Laufzeiten im Komplex-Labyrinth bei APP23-Tieren positiv mit der NGF-Konzentration im Hippokampus und frontalen Kortex korrelierten, zeigte sich im Hippokampus der Kontrolltiere eine negative Korrelation. Welche Mechanismen zu dieser entgegengesetzten Regulation führen, ist derzeit ungeklärt. Ob unterschiedliche Umgebungsbedingungen (Mohammed et al. 1990; Pham et al. 1999) oder alters- und Aβ-bedingte Beeinträchtigungen von Transportketten im Gehirn für die unterschiedlichen hippokampalen NGF-Konzentrationen bei APP23- und Kontrolltieren verantwortlich sind (Burbach et al. 2004; Crutcher et al. 1993; Hock et al. 2000), bleibt in weiteren Versuchen zu klären. Ebenso könnte die gegenläufige NGF-Regulation ein erstes Anzeichen pathophysiologischer Vorgänge der beginnenden Alzheimererkrankung darstellen (Hellweg et al. 1998b), bei denen durch exogene Zuführung von NGF in einem sehr frühen Stadium eine Verzögerung des kognitiven Verfalls bewirkt werden könnte, was durch Applikation ins Vorderhirn in einer neuen Studie an Alzheimer-Patienten bereits erfolgreich gezeigt wurde (Tuszynski et al. 2005).

Nachdem sich das neu gestaltete Komplex-Labyrinth in der ersten Studie für die Erforschung hippokampaler Lernvorgänge als geeignet erwies, wurde es in einer weiteren Studie herangezogen, um ein in der Arbeitsgruppe bereits etabliertes Hypoxie-Paradigma (Riepe & Ludolph 1997; Riepe et al. 1996b; Hellweg et al. 2003) durch Verhaltensstudien

zu ergänzen. Die Lernleistungen der F1-Nachkommen von wiederholt mit 3-NPA-behandelten Muttertieren wurden im Komplex-Labyrinth untersucht. Anschliessend wurden an den Hippokampi der Versuchstiere elektrophysiologischen LTP- und Hypoxie-Versuchen vollzogen. Die unbehandelten F1- und F0-Kontroll-Tiere absolvierten das Labyrinth in gleicher Zeit, während eine zusätzliche Behandlung mit 3-NPA die F1-Tiere offensichtlich in ihrer Lernleistung beeinträchtigte. Dies ging in Übereinstimmung mit früheren Studien auch mit einer Abschwächung des LTP-Anstiegs gegenüber den Kontrolltieren einher (Kleschevnikov & Marchbanks 1993; Richardson et al. 2002). Ebenso resultierte die zusätzliche Applikation von 3-NPA bei den Hypoxieversuchen, im Gegensatz zur Kontrollgruppe (Riepe et al. 1997a), in einer verminderten Hypoxietoleranz der Hippokampus-Schnitte bei den F1-Tieren. Im Einklang mit den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten, bei denen die Verlagerung des NADH-Spektrums in den blauen Bereich mit einer verbesserten posthypoxischen Erholung der Hippokampus-Neuronen verknüpft war (Huber et al. 2000; Büchner et al. 2002), zeigte sich bei den F1-Tieren mit verminderter Hypoxietoleranz eine Verlagerung des Spektrums in den roten Bereich. Das NADH-Spektrum der Kontrollgruppe verschob sich jedoch in den blauen Bereich. Abgesehen von rein spekulativen Erklärungsversuchen (Costa 2005; Wilkins 2005) kann die Frage nach den zugrunde liegenden molekularen Mechanismen derzeit noch nicht beantwortet werden. Möglich wären unterschiedliche Auswirkungen der Präkonditionierung auf das Muttertier. Daß sich die wiederholte Applikation von 3-NPA in irgendeiner Form auf die Eizellen der Mütter ausgewirkt hat, ist nicht anzunehmen, da die Muttertiere fertil waren und keine offensichtlichen Mutationen der Nachkommen zu beobachten waren. Vielmehr könnte man annehmen, daß die den mitochondrialen Energiestoffwechsel hemmende 3-Nitropropionsäure Veränderungen im Energie-metabolismus der Zelle hervorruft, die von längerer Dauer sind und sich sogar während einer später folgenden Schwangerschaft noch negativ auf die heranreifenden Nachkommen auszuwirken vermögen.

Diese Studie zeigt erstmals bei Mäusen, daß sich klinisch nicht auffällige, noxische Bedingungen im Leben der Muttertiere vor der Schwangerschaft auf die neuronalen Funktionen der Nachkommen auswirken können. Diese Auswirkungen betreffen sowohl die Lernfähigkeit in einem Komplex-Labyrinth als auch zellphysiologische und molekularbiologische Bereiche. Das bedeutet, daß nicht nur unmittelbare Umweltbedingungen, sondern auch ungünstige Einflüsse auf die Vorfahren in zukünftigen Studien bei Versuchstieren nicht außer Acht gelassen werden sollten.

Die dritte Versuchsreihe dieser Arbeit sollte die Hippokampus-Sensitivität des Komplex-Labyrinths dahingehend untermauern, indem sich die Lernvorgänge im Labyrinth in einer verstärkten synaptischen Übertragung der Schaffer´schen Kollateralen im Hippokampus von Mäusen niederschlagen. Die Versuchstiere absolvierten das Labyrinth fünf Mal am Tag über eine Versuchsperiode von acht Tagen. Bei anschließenden elektro-physiologischen Untersuchungen des Hippokampus im Hirnschnittpräparat wurden durch die Stimulation der Schaffer´schen Kollateralen der hippokampalen CA3-Region die exzitatorischen postsynaptischen Feldpotenziale (fEPSPs) in der CA1-Region des Hippokampus bei 0,05 Hz für zehn Minuten gemessen. Dabei zeigten die synaptischen Übertragungen der Hippokampus-Schnitte der trainierten Tiere gegenüber untrainierten Kontrollen entgegen allen Erwartungen eine stark verminderte Antwort auf die Stimuli. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu anderen Experimenten, bei denen man lernbezogene Steigerungen der synaptischen Übertragungen in unterschiedlichen Gehirnregionen fand (Rioult-Pedotti et al. 2000; Lebel et al. 2001; Montkowski et al. 1995). So waren z.B. die im motorischen Kortex abgeleiteten fEPSPs bei Ratten nach einfachen motorischen Lernvorgängen deutlich größer als bei nichttrainierten Kontrolltieren (Rioult-Pedotti et al. 1998). Ebenso zeigten Power et al. (Power et al. 1997) im Hippokampus Lidschlag-konditionierter Kaninchen eine verstärkte synaptische Übertragung. Diese Verstärkung wurde beobachtet, wenn die Präparation der Hippokampus-Schnitte eine Stunde nach Erreichen des Lernkriteriums durchgeführt wurde. Der Effekt war bei der Präparation nach 24 Stunden allerdings nicht mehr von Bedeutung. Folglich könnte auch der Zeitpunkt der Präparation am nächsten Tag zwar erklären, warum in der vorliegenden Arbeit keine verstärkte synaptische Übertragung stattfand, nicht aber, wie es hierbei sogar zu einer Abschwächung kommen konnte. Eine Steigerung der synaptischen Übertragung gilt als Unterstützung des LTP-Paradigmas, bei dem durch hochfrequente Stimulation, z.B. der Schaffer´schen Kollateralen im Hippokampus eine gesteigerte synaptische Übertragung über Minuten und Stunden gemessen werden kann (Bach et al. 1995; Sacchetti et al. 2002; Pu et al. 2002; Bliss & Gardner-Medwin 1973; Bliss & Lomo 1973). Soll LTP als Model für synaptische Plastizität dienen, das Lern- und Gedächtnisvorgänge erklärt, so sollten intensive Lernvorgänge dem hochfrequenten Stimulus in LTP-Versuchen gleich kommen und auch zu einer gesteigerte synaptischen Übertragungen führen (Hodgson et al. 2005). Im Gegensatz dazu könnten aber auch LTD-ähnliche Mechanismen, die durch das komplexe Lernverhalten bei den Labyrinthaufgaben ausgelöst wurden, für die abgeschwächte

Übertragung verantwortlich sein. Zwar wurde LTD in mehreren Arbeiten an Hippokampus-Schnitten gezeigt (Diamond et al. 2005; Malenka 1994; Muller et al. 1995), doch wurden, anders als in der vorliegenden Arbeit, üblicherweise Stimulusprotokolle von 1 - 5 Hz über 3 - 15 Minuten verwendet (Malenka 2002), um LTD auszulösen. Ebenso gibt es erste Hinweise darauf, daß LTD nicht nur das einfache Gegenstück zur LTP darstellt, sondern vielmehr selbst als ein mögliches Erklärungsmodell für Lernvorgänge fungieren könnte (Bear 1999; Manahan-Vaughan & Braunewell 1999). Über die genauen Vorgänge der LTD als möglicher Lernmechanismus kann zurzeit aber nur spekuliert werden. Möglich wäre eine regulierende Herabsetzung der synaptischen Übertragung als Vorbereitung auf eine nachfolgende synaptische Verstärkung.

Ebenso ließe sich in anderer Richtung spekulieren. Da der Hippokampus bei den Säugern als wichtige Schnittstelle zwischen Kurz- und Langzeitgedächtnis anzusehen ist (Vertes 2005; Winocur 1985; Alvarez et al. 1994; Izquierdo et al. 1999), könnte man auch annehmen, daß nach intensiven Lernvorgängen, wie sie die Versuchstiere in der vorliegenden Arbeit durch acht Tage Training in einem Komplex-Labyrinth absolvierten, die verstärkte synaptische Übertragung nicht mehr im Hippokampus stattfindet, sondern bereits ins Langzeitgedächtnis übergegangen ist. Eventuell können weitere Versuche, z.B. durch Verkürzung der Versuchsdauer auf ein bis sieben Tage, Aufschluß darüber geben.

Die Überlegung, daß der Hippokampus nicht in die Lernvorgänge des Komplex-Labyrinths involviert ist, und folglich dadurch die Übertragungsstärke der hippokampalen Synapsen reduziert ist, ist wenig haltbar, da sich das Komplex-Labyrinth in den Arbeiten aus Kapitel 3 und 4 als durchaus hippokampus-sensitiv erwies.

Diesen ersten Hinweis einer herabgesetzten synaptischen Übertragung als Antwort auf intensives Training in einem Komplex-Labyrinth gilt es in weiteren Studien zu erforschen.

7. Literaturverzeichnis

Abel, T. & Kandel, E. 1998. Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. *Brain Res. Rev.* 26: 360-378.

Adlard, P. A. & Cotman, C. W. 2004. Voluntary exercise protects against stress-induced decreases in brain-derived neurotrophic factor protein expression. *Neuroscience* 124: 985-992.

Aketa, S., Nakase, H., Kamada, Y., Hiramatsu, K. & Sakaki, T. 2000. Chemical preconditioning with 3-nitropropionic acid in gerbil hippocampal slices: therapeutic window and the participation of adenosine receptor. *Exp. Neurol.* 166: 385-391.

Alexinsky, T. 2001. Differential effect of thalamic and cortical lesions on memory systems in the rat. *Behav. Brain Res.* 122: 175-191.

Almli, C. R., Levy, T. J., Han, B. H., Shah, A. R., Gidday, J. M. & Holtzman, D. M. 2000. BDNF protects against spatial memory deficits following neonatal hypoxia-ischemia. *Exp. Neurol.* 166: 99-114.

Alonso, M., Vianna, M. R., Depino, A. M., Mello e Souza, Pereira, P., Szapiro, G., Viola, H., Pitossi, F., Izquierdo, I. & Medina, J. H. 2002. BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus* 12: 551-560.

Alvarez, P., Zola-Morgan, S. & Squire, L. R. 1994. The animal model of human amnesia: long-term memory impaired and short-term memory intact. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91: 5637-5641.

Andersen, M. B. & Sams-Dodd, F. 1998. Impairment of working memory in the T-maze after transient global cerebral ischemia in the Mongolian gerbil. *Behav. Brain Res.* 91: 15-22.

Arendash, G. W., King, D. L., Gordon, M. N., Morgan, D., Hatcher, J. M., Hope, C. E. & Diamond, D. M. 2001. Progressive, age-related behavioral impairments in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes. *Brain Res.* 891: 42-53.

Ascher, P. & Nowak, L. 1986. A patch-clamp study of excitatory amino acid activated channels. *Adv. Exp. Med. Biol.* 203: 507-511.

Avital, A., Goshen, I., Kamsler, A., Segal, M., Iverfeldt, K., Richter-Levin, G. & Yirmiya, R. 2003. Impaired interleukin-1 signaling is associated with deficits in hippocampal memory processes and neural plasticity. *Hippocampus* 13: 826-834.

Bach, M. E., Hawkins, R. D., Osman, M., Kandel, E. R. & Mayford, M. 1995. Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency. *Cell* 81: 905-915.

Bailey, C. H., Bartsch, D. & Kandel, E. R. 1996. Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93: 13445-13452.

Beach, R. S., Gershwin, M. E. & Hurley, L. S. 1982. Gestational zinc deprivation in mice: persistence of immunodeficiency for three generations. *Science* 218: 469-471.

Bear, M. F. 1999. Homosynaptic long-term depression: a mechanism for memory? *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A* 96: 9457-9458.

Bennett, M. C. & Rose, G. M. 1992. Chronic sodium azide treatment impairs learning of the Morris water maze task. *Behav. Neural. Biol.* 58: 72-75.

Berger-Sweeney, J., McPhie, D. L., Arters, J. A., Greenan, J., Oster-Granite, M. L. & Neve, R. L. 1999. Impairments in learning and memory accompanied by neurodegeneration in mice transgenic for the carboxyl-terminus of the amyloid precursor protein. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 66: 150-162.

Bimonte-Nelson, H. A., Hunter, C. L., Nelson, M. E. & Granholm, A. C. 2003. Frontal cortex BDNF levels correlate with working memory in an animal model of Down syndrome. *Behav. Brain Res.* 139: 47-57.

Bimonte, H. A., Nelson, M. E. & Granholm, A. C. 2003. Age-related deficits as working memory load increases: relationships with growth factors. *Neurobiol. Aging* 24: 37-48.

Bliss, T. V. & Gardner-Medwin, A. R. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaestetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232: 357-374.

Bliss, T. V. & Lomo, T. 1970. Plasticity in a monosynaptic cortical pathway. *J. Physiol.* 207: 61P.

Bliss, T. V. & Lomo, T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232: 331-356.

Bohme, G. A., Bon, C., Stutzmann, J. M., Doble, A. & Blanchard, J. C. 1991. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur. J. Pharmacol.* 199: 379-381.

Braun, A. P. & Schulman, H. 1995. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu. Rev. Physiol* 57: 417-445.

Braunewell, K. H. & Manahan-Vaughan, D. 2001. Long-term depression: a cellular basis for learning? *Rev. Neurosci.* 12: 121-140.

Brown, T. H. & Zador, A. M. 1990. The synaptic organisation of the brain. *Hippocampus,Oxford University Press* 346.

Büchner, M., Huber, R., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M. & Riepe, M. 2002. Impaired hypoxic tolerance and altered protein binding of NADH in presymptomatic APP23 transgenic mice. *Neuroscience* 114: 285.

Burbach, G. J., Hellweg, R., Haas, C. A., Del Turco, D., Deicke, U., Abramowski, D., Jucker, M., Staufenbiel, M. & Deller, T. 2004a. Induction of brain-derived neurotrophic factor in plaque-associated glial cells of aged APP23 transgenic mice. *J. Neurosci.* 24: 2421-2430.

Cali, J. J., Zwaagstra, J. C., Mons, N., Cooper, D. M. & Krupinski, J. 1994. Type VIII adenylyl cyclase. A Ca2+/calmodulin-stimulated enzyme expressed in discrete regions of rat brain. *J. Biol. Chem.* 269: 12190-12195.

Capsoni, S., Giannotta, S. & Cattaneo, A. 2002. beta-Amyloid Plaques in a Model for Sporadic Alzheimer's Disease Based on Transgenic Anti-Nerve Growth Factor Antibodies. *Mol. Cell Neurosci.* 21: 15.

Centeno, J. M., Orti, M., Salom, J. B., Sick, T. J. & Perez-Pinzon, M. A. 1999. Nitric oxide is involved in anoxic preconditioning neuroprotection in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 836: 62-69.

Chalon, J., Tang, C. K., Ramanathan, S., Eisner, M., Katz, R. & Turndorf, H. 1981. Exposure to halothane and enflurane affects learning function of murine progeny. *Anesth. Analg.* 60: 794-797.

Chandra, R. K. 1975. Antibody formation in first and second generation offspring of nutritionally deprived rats. *Science* 190: 289-290.

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

Chen, T., Kato, H., Liu, X. H., Araki, T., Itoyama, Y. & Kogure, K. 1994. Ischemic tolerance can be induced repeatedly in the gerbil hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 177: 159-161.

Collingridge, G. L., Kehl, S. J. & McLennan, H. 1983. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J. Physiol.* 334: 33-46.

Costa, F. F. 2005. Non-coding RNAs: new players in eukaryotic biology. *Gene.* 357: 83-94.

Crandall, J., Sakai, Y., Zhang, J., Koul, O., Mineur, Y., Crusio, W. E. & McCaffery, P. 2004. 13-cis-retinoic acid suppresses hippocampal cell division and hippocampal-dependent learning in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101: 5111-5116.

Crusio, W. E. & Schwegler, H. 2005. Learning spatial orientation tasks in the radial-maze and structural variation in the hippocampus in inbred mice. *Behav. Brain Funct.* 1: 3.

Crutcher, K. A., Scott, S. A., Liang, S., Everson, W. V. & Weingartner, J. 1993. Detection of NGF-like activity in human brain tissue: increased levels in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 13: 2540-2550.

Day, L. B. & Schallert, T. 1996. Anticholinergic effects on acquisition of place learning in the Morris water task: spatial mapping deficit or inability to inhibit nonplace strategies? *Behav. Neurosci.* 110: 998-1005.

Deupree, D. L., Turner, D. A. & Watters, C. L. 1991. Spatial performance correlates with in vitro potentiation in young and aged Fischer 344 rats. *Brain Res.* 554: 1-9.

Diamond, D. M., Park, C. R., Campbell, A. M. & Woodson, J. C. 2005. Competitive interactions between endogenous LTD and LTP in the hippocampus underlie the storage of emotional memories and stress-induced amnesia. *Hippocampus* 15: 1006-1025.

Diana, G., Domenici, M. R., Scotti, d. C., Loizzo, A. & Sagratella, S. 1995. Reduced hippocampal CA1 Ca(2+)-induced long-term potentiation is associated with age-dependent impairment of spatial learning. *Brain Res.* 686: 107-110.

Dingledine, R., Dodd, J. & Kelly, J. S. 1980. The in vitro brain slice as a useful neurophysiological preparation for intracellular recording. *J. Neurosci. Meth.* 2: 323-362.

Dodart, J. C., Meziane, H., Mathis, C., Bales, K. R., Paul, S. M. & Ungerer, A. 1999. Behavioral disturbances in transgenic mice overexpressing the V717F beta-amyloid precursor protein. *Behav. Neurosci.* 113: 982-990.

Dringenberg, H. C., Richardson, D. P., Brien, J. F. & Reynolds, J. N. 2001. Spatial learning in the guinea pig: cued versus non-cued learning, sex differences, and comparison with rats. *Behav. Brain Res.* 124: 97-101.

Dumont, M., Strazielle, C., Staufenbiel, M. & Lalonde, R. 2004. Spatial learning and exploration of environmental stimuli in 24-month-old female APP23 transgenic mice with the Swedish mutation. *Brain Res.* 1024: 113-121.

Durany, N., Michel, T., Kurt, J., Cruz-Sanchez, F. F., Cervas-Navarro, J. & Riederer, P. 2000. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 levels in Alzheimer's disease brains. *Int. J. Dev. Neurosci* 18: 807-813.

Eriksdotter, J. M., Nordberg, A., Amberla, K., Backman, L., Ebendal, T., Meyerson, B., Olson, L., Seiger, Shigeta, M., Theodorsson, E., Viitanen, M., Winblad, B. & Wahlund, L. O. 1998. Intracerebroventricular infusion of nerve growth factor in three patients with Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 9: 246-257.

Etienne, A. S., Boulens, V., Maurer, R., Rowe, T. & Siegrist, C. 2000. A brief view of known landmarks reorientates path integration in hamsters. *Naturwissenschaften.* 87: 494-498.

Etienne, A. S., Maurer, R. & Seguinot, V. 1996. Path integration in mammals and its interaction with visual landmarks. *J. Exp. Biol.* 199: 201-209.

Fahnestock, M., Scott, S. A., Jette, N., Weingartner, J. A. & Crutcher, K. A. 1996. Nerve growth factor mRNA and protein levels measured in the same tissue from normal and Alzheimer's disease parietal cortex. *Brain Res. Mol..Brain Res* 42: 175-178.

Farr, S. A., Banks, W. A., La Scola, M. E., Flood1 JF & Morley, J. E. 2000. Permanent and temporary inactivation of the hippocampus impairs T-maze footshock avoidance acquisition and retention. *Brain Res.* 872: 242-249.

Feig, S. & Lipton, P. 1990. N-methyl-D-aspartate receptor activation and Ca2+ account for poor pyramidal cell structure in hippocampal slices. *J. Neurochem.* 55: 473-483.

Fischer, W., Bjorklund, A., Chen, K. & Gage, F. H. 1991. NGF improves spatial memory in aged rodents as a function of age. *J. Neurosci* 11: 1889-1906.

Fischer, W., Chen, K. S., Gage, F. H. & Bjorklund, A. 1992. Progressive decline in spatial learning and integrity of forebrain cholinergic neurons in rats during aging. *Neurobiol. Aging* 13: 9-23.

Floresco, S. B., Seamans, J. K. & Phillips, A. G. 1997. Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. *J. Neurosci.* 17: 1880-1890.

Fofana, D., Kobae, H., Sameshima, K. & Miyata, K. 2002. Postnatal survival of rat offspring prenatally exposed to pure 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Congenit. Anom.(Kyoto)* 42: 32-35.

Frick, K. M., Price, D. L., Koliatsos, V. E. & Markowska, A. L. 1997. The effects of nerve growth factor on spatial recent memory in aged rats persist after discontinuation of treatment. *J. Neurosci.* 17: 2543-2550.

Gallagher, M. & Burwell, R. D. 1989. Relationship of age-related decline across several behavioral domains. *Neurobiol. Aging* 10: 691-708.

Garcia, R. & Jaffard, R. 1996. Changes in synaptic excitability in the lateral septum associated with contextual and auditory fear conditioning in mice. *Eur. J. Neurosci.* 8: 809-815.

Gerlai, R. 1998. A new continuous alternation task in T-maze detects hippocampal dysfunction in mice. A strain comparison and lesion study. *Behav.Brain Res.* 95: 91-101.

Giap, B. T., Jong, C. N., Ricker, J. H., Cullen, N. K. & Zafonte, R. D. 2000. The hippocampus: anatomy, pathophysiology, and regenerative capacity. *J. Head Trauma Rehabil.* 15: 875-894.

Goldman-Rakic, P. S. 1995. Architecture of the prefrontal cortex and the central executive. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 769: 71-83.

Gomez-Pinilla, F., So, V. & Kesslak, J. P. 2001. Spatial learning induces neurotrophin receptor and synapsin I in the hippocampus. *Brain Res.* 904: 13-19.

Gorczynski, R. M. & Steele, E. J. 1981. Simultaneous yet independent inheritance of somatically acquired tolerance to two distinct H-2 antigenic haplotype determinants in mice. *Nature* 289: 678-681.

Gordon, M. N., King, D. L., Diamond, D. M., Jantzen, P. T., Boyett, K. V., Hope, C. E., Hatcher, J. M., DiCarlo, G., Gottschall, W. P., Morgan, D. & Arendash, G. W. 2001. Correlation between cognitive deficits and Abeta deposits in transgenic APP+PS1 mice. *Neurobiol. Aging* 22: 377-385.

Grön, G., Wunderlich, A. P., Spitzer, M., Tomczak, R. & Riepe, M. W. 2000b. Brain activation during human navigation: gender-different neural networks as substrate of performance. *Nat. Neurosci* 3: 404-408.

Gustafsson, B., Wigstrom, H., Abraham, W. C. & Huang, Y. Y. 1987. Long-term potentiation in the hippocampus using depolarizing current pulses as the conditioning stimulus to single volley synaptic potentials. *J. Neurosci.* 7: 774-780.

Hales, C. N. & Barker, D. J. 1992. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis [see comments]. *Diabetologia* 35: 595-601.

Hansen, J. M., Reynolds, P. R., Booth, G. M., Schaalje, G. B. & Seegmiller, R. E. 2000. Developmental toxicity of carbon black oil in mice. *Teratology* 62: 227-232.

Hawkins, R. D., Son, H. & Arancio, O. 1998. Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Prog. Brain Res.* 118: 155-172.

Hellweg, R., Gericke, C. A., Jendroska, K., Hartung, H. D. & Cervos-Navarro, J. 1998a. NGF content in the cerebral cortex of non-demented patients with amyloid-plaques and in symptomatic Alzheimer's disease. *Int. J. Dev. Neurosci.* 16: 787-794.

Hellweg, R., Hock, C. & Hartung, H. D. 1989. An improved and rapid highly sensitive enzyme immunoassay for nerve growth factor. *Technique, J. Methods Cell Mol. Biol.* 1: 43-48.

Hellweg, R., Lohmann, P., Huber, R., Kühl, A., & Riepe, M.W. 2006. Spatial navigation in complex and radial mazes in APP23 animals and neurotrophin signaling as a biological marker of early impairment. *Learn. Mem.* 13:63-71.

Hellweg, R., von Arnim, C. A. F., Büchner, M., Huber, R. & Riepe, M. W. 2003. Neuroprotection and neuronal dysfunction upon repetitive inhibition of oxidative phosphorylation. *Exp. Neurol.* 183: 346-354.

Hellweg, R., von Richthofen, S., Anders, D., Baethge, C., Ropke, S., Hartung, H. D. & Gericke, C. A. 1998b. The time course of nerve growth factor content in different neuropsychiatric diseases--a unifying hypothesis. *J. Neural. Transm.* 105: 871-903.

Hemsworth, B. N. 1991. Embryopathic action of N-nitrosomethylurea in the pregnant mouse manifest for three generations. *In Vivo* 5: 407-411.

Hill, A. J. & Best, P. J. 1981. Effects of deafness and blindness on the spatial correlates of hippocampal unit activity in the rat. *Exp. Neurol* 74: 204-217.

Hock, C., Heese, K., Hulette, C., Rosenberg, C. & Otten, U. 2000. Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: Decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Arch. Neurol.* 57: 846-851.

Hodgson, R. A., Ji, Z., Standish, S., Boyd-Hodgson, T. E., Henderson, A. K. & Racine, R. J. 2005. Training-induced and electrically induced potentiation in the neocortex. *Neurobiol. Learn. Mem.* 83: 22-32.

Holcomb, L. A., Gordon, M. N., Jantzen, P., Hsiao, K., Duff, K. & Morgan, D. 1999. Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations: lack of association with amyloid deposits. *Behav. Genet.* 29: 177-185.

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

Honzik, C. H. 1936. The sensory basis of maze learning in rats. *Comp. Psychol. Monographs* 13: 1-113.

Hsiao, K. 1998. Transgenic mice expressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Exp. Gerontol.* 33: 883-889.

Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F. & Cole, G. 1996. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274: 99-102.

Huber, R., Büchner, M., Li, H., Schlieter, M., Speerfeld, A. D. & Riepe, M. W. 2000. Protein binding of NADH on chemical preconditioning. *J. Neurochem.* 75: 329-335.

Idrobo, F., Nandy, K., Mostofsky, D. I., Blatt, L. & Nandy, L. 1987. Dietary restriction: effects on radial maze learning and lipofuscin pigment deposition in the hippocampus and frontal cortex. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 6: 355-362.

Ikonen, S. & Riekkinen, P., Jr. 1999. Effects of apamin on memory processing of hippocampal-lesioned mice. *Eur. J. Pharmacol.* 382: 151-156.

Ingram, D. K., Weindruch, R., Spangler, E. L., Freeman, J. R. & Walford, R. L. 1987. Dietary restriction benefits learning and motor performance of aged mice. *J. Gerontol.* 42: 78-81.

Irvine, G. I. & Abraham, W. C. 2005. Enriched environment exposure alters the input-output dynamics of synaptic transmission in area CA1 of freely moving rats. *Neurosci. Lett.* 391: 32-37.

Ishihara, K., Mitsuno, K., Ishikawa, M. & Sasa, M. 1997. Behavioral LTP during learning in rat hippocampal CA3. *Behav. Brain Res.* 83: 235-238.

Izquierdo, I., Medina, J. H., Vianna, M. R., Izquierdo, L. A. & Barros, D. M. 1999. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav. Brain Res.* 103: 1-11.

Janicke, B. & Coper, H. 1994. The effects of prenatal exposure to hypoxia on the behavior of rats during their life span. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 48: 863-873.

Jarrard, L. E. 1993. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav. Neural. Biol.* 60: 9-26.

Jeffery, K. J. 1997. LTP and spatial learning-where to next? *Hippocampus* 7: 95-110.

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

Kasischke, K., Ludolph, A. C. & Riepe, M. W. 1996. NMDA-antagonists reverse increased hypoxic tolerance by preceding chemical hypoxia. *Neurosci. Lett.* 214: 175-178.

Kelly, P. H., Bondolfi, L., Hunziker, D., Schlecht, H. P., Carver, K., Maguire, E., Abramowski, D., Wiederhold, K. H., Sturchler-Pierrat, C., Jucker, M., Bergmann, R., Staufenbiel, M. & Sommer, B. 2003a. Progressive age-related impairment of cognitive behavior in APP23 transgenic mice. *Neurobiol. Aging* 24: 365-378.

Kesslak, J. P., So, V., Choi, J., Cotman, C. W. & Gomez-Pinilla, F. 1998. Learning upregulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid: a mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance? *Behav. Neurosci* 112: 1012-1019.

Kitagawa, K., Matsumoto, M., Tagaya, M., Hata, R., Ueda, H., Niinobe, M., Handa, N., Fukunaga, R., Kimura, K., Mikoshiba, K. & Kamada, T. 1990. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res.* 528: 21-24.

Kleschevnikov, A. M. & Marchbanks, R. M. 1993. Behavioral parameters of the spatial memory correlate with the potentiation of the population spike, but not with the population excitatory postsynaptic potential, of the CA1 region in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 152: 125-128.

Knierim, J. J., Kudrimoti, H. S. & McNaughton, B. L. 1995. Place cells, head direction cells, and the learning of landmark stability. *J. Neurosci.* 15: 1648-1659.

Koistinaho, M., Ort, M., Cimadevilla, J. M., Vondrous, R., Cordell, B., Koistinaho, J., Bures, J. & Higgins, L. S. 2001. Specific spatial learning deficits become severe with age in beta -amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse beta -amyloid deposits but do not form plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98: 14675-14680.

Konecki, J., Blazejowski, J., Slowinski, J. & Helewski, K. 2000. Influence of chronic cadmium exposure during pregnancy on DNA synthesis in different organs of rat offspring. *Med. Sci. Monit.* 6: 1077-1081.

Kozorovitskiy, Y., Gross, C. G., Kopil, C., Battaglia, L., McBreen, M., Stranahan, A. M. & Gould, E. 2005. Experience induces structural and biochemical changes in the adult primate brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102: 17478-17482.

Lalonde, R., Dumont, M., Staufenbiel, M., Sturchler-Pierrat, C. & Strazielle, C. 2002. Spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination in female APP23 transgenic mice with the Swedish mutation. *Brain Res.* 956: 36-44.

Lang, U. E., Jockers-Scherubl, M. C. & Hellweg, R. 2004. State of the art of the neurotrophin hypothesis in psychiatric disorders: implications and limitations. *J. Neural Transm.* 111: 387-411.

Lashley, K. S. & Franz, S. I. 1912. The effects of cerebral destruction upon habit-formation and retention in the albino rat. *Psychobiology* 1: 71-139.

Lebel, D., Grossman, Y. & Barkai, E. 2001. Olfactory learning modifies predisposition for long-term potentiation and long-term depression induction in the rat piriform (olfactory) cortex. *Cereb. Cortex* 11: 485-489.

Lebreton, S. & Gontero, B. 1999. Memory and imprinting in multienzyme complexes. Evidence for information transfer from glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to phosphoribulokinase under reduced state in Chlamydomonas reinhardtii. *J. Biol. Chem.* 274: 20879-20884.

Lee, I., Jerman, T. S. & Kesner, R. P. 2005. Disruption of delayed memory for a sequence of spatial locations following CA1- or CA3-lesions of the dorsal hippocampus. *Neurobiol. Learn. Mem.* 84: 138-147.

Levi-Montalcini, R. 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237: 1154-1162.

Levin, B. E. 2000. Metabolic imprinting on genetically predisposed neural circuits perpetuates obesity [In Process Citation]. *Nutrition* 16: 909-915.

Levitt, P., Reinoso, B. & Jones, L. 1998. The critical impact of early cellular environment on neuronal development. *Prev. Med* 27: 180-183.

Linnarsson, S., Bjorklund, A. & Ernfors, P. 1997. Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* 9: 2581-2587.

Logue, S. F., Paylor, R. & Wehner, J. M. 1997. Hippocampal lesions cause learning deficits in inbred mice in the Morris water maze and conditioned-fear task. *Behav. Neurosci.* 111: 104-113.

Lu, Y. F., Kandel, E. R. & Hawkins, R. D. 1999. Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J. Neurosci.* 19: 10250-10261.

Lumey, L. H. & Stein, A. D. 1997a. In utero exposure to famine and subsequent fertility: The Dutch Famine Birth Cohort Study. *Am. J. Public Health* 87: 1962-1966.

Lumey, L. H. & Stein, A. D. 1997b. Offspring birth weights after maternal intrauterine undernutrition: a comparison within sibships. *Am. J. Epidemiol.* 146: 810-819.

Lundin, B. S., Dahlman-Hoglund, A., Pettersson, I., Dahlgren, U. I., Hanson, L. A. & Telemo, E. 1999. Antibodies given orally in the neonatal period can affect the immune response for two generations: evidence for active maternal influence on the newborn's immune system. *Scand. J. Immunol.* 50: 651-656.

Lutz, P. L. 1992. Mechanisms for anoxic survival in the vertebrate brain. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 601-618.

Lynch, G. 1998. Memory and the brain: unexpected chemistries and a new pharmacology. *Neurobiol. Learn. Mem.* 70: 82-100.

Lynch, M.A. 2004. Long-term potentiation and memory. *Physiol. Rev.* 84: 87-136.

Malenka, R. C. 1994. Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell* 78: 535-538.

Malenka, R. C. 2002. Synaptic Plasticity. In Davis, K. L., Charney, D., Coyle, J. T. & Nemeroff, C. (Eds) Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress. (pp. 147-157). American College of Neuropsychopharmacology.

Malenka, R. C. & Bear, M. F. 2004. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44: 5-21.

Malenka, R. C., Kauer, J. A., Zucker, R. S. & Nicoll, R. A. 1988. Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. *Science* 242: 81-84.

Malenka, R. C. & Nicoll, R. A. 1999. Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* 285: 1870-1874.

Manahan-Vaughan, D. & Braunewell, K. H. 1999. Novelty acquisition is associated with induction of hippocampal long-term depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 8739-8744.

Markowska, A. L., Koliatsos, V. E., Breckler, S. J., Price, D. L. & Olton, D. S. 1994. Human nerve growth factor improves spatial memory in aged but not in young rats. *J. Neurosci.* 14: 4815-4824.

Markus, E. J., Barnes, C. A., McNaughton, B. L., Gladden, V. L. & Skaggs, W. E. 1994. Spatial information content and reliability of hippocampal CA1 neurons: effects of visual input. *Hippocampus* 4: 410-421.

Martin, S. J., Grimwood, P. D. & Morris, R. G. 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci.* 23: 649-711.

Mayer, M. L., Westbrook, G. L. & Guthrie, P. B. 1984. Voltage-dependent block by Mg2+ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309: 261-263.

McKernan, M. G. & Shinnick-Gallagher, P. 1997. Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature* 390: 607-611.

Michalski, B. & Fahnestock, M. 2003. Pro-brain-derived neurotrophic factor is decreased in parietal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 111: 148-154.

Milner, B. 1965. Visually-guided maze learning in man: Effects of bilateral hippocampal, bilateral frontal, and unilateral cerebral lesions. *Neuropsychologia* 3: 317-338.

Mizumori, S. J., Ragozzino, K. E., Cooper, B. G. & Leutgeb, S. 1999. Hippocampal representational organization and spatial context. *Hippocampus* 9: 444-451.

Mizuno, M., Yamada, K., Olariu, A., Nawa, H. & Nabeshima, T. 2000. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *J. Neurosci* 20: 7116-7121.

Mohammed, A. K., Winblad, B., Ebendal, T. & Larkfors, L. 1990. Environmental influence on behaviour and nerve growth factor in the brain. *Brain Res.* 528: 62-72.

Montkowski, A., Barden, N., Wotjak, C., Stec, I., Ganster, J., Meaney, M., Engelmann, M., Reul, J. M., Landgraf, R. & Holsboer, F. 1995. Long-term antidepressant treatment reduces behavioural deficits in transgenic mice with impaired glucocorticoid receptor function. *J. Neuroendocrinol.* 7: 841-845.

Morris, R. & Baker, M. 1984. Does long-term potentiation/synaptic enhancement have anything to do with learning and memory? *In L.R.Squires and N.Butters (Eds.), Neuropsychology of memory, Guilford Press, New York* 521-535.

Morris, R. G. M. 1981. Spatial localisation does not require the presence of local cues. *Learn. Mem.* 12: 239-260.

Mufson, E. J., Ginsberg, S. D., Ikonomovic, M. D. & DeKosky, S. T. 2003. Human cholinergic basal forebrain: chemoanatomy and neurologic dysfunction. *J. Chem. Neuroanat.* 26: 233-242.

Muller, D., Hefft, S. & Figurov, A. 1995. Heterosynaptic interactions between LTP and LTD in CA1 hippocampal slices. *Neuron* 14: 599-605.

Murry, C. E., Jennings, R. B. & Reimer, K. A. 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74: 1124-1136.

Nagahara, A. H., Otto, T. & Gallagher, M. 1995. Entorhinal-perirhinal lesions impair performance of rats on two versions of place learning in the Morris water maze. *Behav. Neurosci.* 109: 3-9.

Narisawa-Saito, M. & Nawa, H. 1996. Differential regulation of hippocampal neurotrophins during aging in rats. *J. Neurochem.* 67: 1124-1131.

Nelson, A., Lebessi, A., Sowinski, P. & Hodges, H. 1997. Comparison of effects of global cerebral ischaemia on spatial learning in the standard and radial water maze: relationship of hippocampal damage to performance. *Behav. Brain Res.* 85: 93-115.

Nunn, J. A., Graydon, F. J., Polkey, C. E. & Morris, R. G. 1999. Differential spatial memory impairment after right temporal lobectomy demonstrated using temporal titration. *Brain* 122 (Pt 1): 47-59.

Nyakas, C., Buwalda, B., Markel, E., Korte, S. M. & Luiten, P. G. 1994. Life-spanning behavioural and adrenal dysfunction induced by prenatal hypoxia in the rat is prevented by the calcium antagonist nimodipine. *Eur. J. Neurosci* 6.

O'Dell, T. J., Hawkins, R. D., Kandel, E. R. & Arancio, O. 1991. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88: 11285-11289.

O'Keefe, J. & Dostrovsky, J. 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 34: 171-175.

O'Keefe, J. & Speakman, A. 1987. Single unit activity in the rat hippocampus during a spatial memory task. *Exp. Brain Res.* 68: 1-27.

O´Keefe, J. & Nadel, L. 1978. The hippocampus as a cognitive map. *Oxford: Clarendon Press*.

Ohta, H., Matsumoto, K. & Watanabe, H. 1993. The interaction between central cholinergic and peripheral beta-adrenergic systems on radial maze performance in rats. *Brain Res.* 622: 353-356.

Okada, T., Yamada, N., Tsuzuki, K., Horikawa, H. P., Tanaka, K. & Ozawa, S. 2003. Long-term potentiation in the hippocampal CA1 area and dentate gyrus plays different roles in spatial learning. *Eur. J. Neurosci.* 17: 341-349.

Olton, D. S. & Samuelson, R. J. 1976. Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process* 2: 97-116.

Packard, M. G. & McGaugh, J. L. 1992. Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems. *Behav. Neurosci.* 106: 439-446.

Packard, M. G. & White, N. M. 1991. Dissociation of hippocampus and caudate nucleus memory systems by posttraining intracerebral injection of dopamine agonists. *Behav. Neurosci.* 105: 295-306.

Peng, S., Wuu, J., Mufson, E. J. & Fahnestock, M. 2004. Increased proNGF levels in subjects with mild cognitive impairment and mild Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol* 63: 641-649.

Perez-Pinzon, M. A. & Born, J. G. 1999. Rapid preconditioning neuroprotection following anoxia in hippocampal slices: role of the K+ ATP channel and protein kinase C. *Neuroscience* 89: 453-459.

Pham, T. M., Soderstrom, S., Winblad, B. & Mohammed, A. H. 1999. Effects of environmental enrichment on cognitive function and hippocampal NGF in the non-handled rats. *Behav. Brain Res.* 103: 63-70.

Pigott, S. & Milner, B. 1993. Memory for different aspects of complex visual scenes after unilateral temporal- or frontal-lobe resection. *Neuropsychologia* 31: 1-15.

Popova, E. N. 1988. [Effect of alcoholic intoxication of female mice prior to pregnancy on the ultrastructure of neurons in the sensorimotor cortex of the progeny]. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 106.

Popova, E. N. 1993. Maternal alcohol consumption before pregnancy and ultrastructure of neurons and interneuronal connections in rat offspring. *Int. J. Neurosci* 73.

Popova, E. N. 2004. Structure of the sensorimotor area of the cerebral cortex in the offspring of alcoholized rats. *Neurosci. Behav. Physiol* 34: 663-669.

Popova, E. N. & Frumkina, L. E. 1982. [Changes in the neurons and interneuronal connections of the higher divisions of the motor system in the offspring of alcoholic male and female rats]. *Zh. Nevropatol. Psikhiatr. Im S.S. Korsakova* 82: 99-102.

Power, J. M., Thompson, L. T., Moyer, J. R., Jr. & Disterhoft, J. F. 1997. Enhanced synaptic transmission in CA1 hippocampus after eyeblink conditioning. *J. Neurophysiol.* 78: 1184-1187.

Pu, L., Bao, G. B., Xu, N. J., Ma, L. & Pei, G. 2002. Hippocampal long-term potentiation is reduced by chronic opiate treatment and can be restored by re-exposure to opiates. *J. Neurosci.* 22: 1914-1921.

Quirk, G. J., Muller, R. U. & Kubie, J. L. 1990. The firing of hippocampal place cells in the dark depends on the rat's recent experience. *J. Neurosci.* 10: 2008-2017.

Richardson, D. P., Byrnes, M. L., Brien, J. F., Reynolds, J. N. & Dringenberg, H. C. 2002. Impaired acquisition in the water maze and hippocampal long-term potentiation after chronic prenatal ethanol exposure in the guinea-pig. *Eur. J. Neurosci.* 16: 1593-1598.

Riepe, M. W., Esclaire, F., Kasischke, K., Schreiber, S., Nakase, H., Kempski, O., Ludolph, A. C., Dirnagl, U. & Hugon, J. 1997a. Increased hypoxic tolerance by chemical inhibition of oxidative phosphorylation: "chemical preconditioning&quot. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 17: 257-264.

Riepe, M. W., Kasischke, K., Gericke, C. A., Lowe, A. & Hellweg, R. 1996a. Increase of hypoxic tolerance in rat hippocampal slices following 3-nitropropionic acid is not mediated by endogenous nerve growth factor. *Neurosci. Lett.* 211: 9-12.

Riepe, M. W., Kasischke, K. & Raupach, A. 1997b. Acetylsalicylic acid increases tolerance against hypoxic and chemical hypoxia. *Stroke* 28: 2006-2011.

Riepe, M. W. & Ludolph, A. C. 1997. Chemical preconditioning: a cytoprotective strategy. *Mol. Cell. Biochem.* 174: 249-254.

Riepe, M. W., Niemi, W. N., Megow, D., Ludolph, A. C. & Carpenter, D. O. 1996b. Mitochondrial oxidation in rat hippocampus can be preconditioned by selective chemical inhibition of succinic dehydrogenase. *Exp. Neurol.* 138: 15-21.

Riepe, M. W., Schmalzigaug, K., Fink, F., Oexle, K. & Ludolph, A. C. 1996c. NADH in the pyramidal cell layer of hippocampal regions CA1 and CA3 upon selective inhibition and uncoupling of oxidative phosphorylation. *Brain Res.* 710: 21-27.

Rioult-Pedotti, M. S., Friedman, D. & Donoghue, J. P. 2000. Learning-induced LTP in neocortex. *Science* 290: 533-536.

Rioult-Pedotti, M. S., Friedman, D., Hess, G. & Donoghue, J. P. 1998. Strengthening of horizontal cortical connections following skill learning. *Nat. Neurosci.* 1: 230-234.

Rogan, M. T., Staubli, U. V. & LeDoux, J. E. 1997. Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* 390: 604-607.

Sacchetti, B., Lorenzini, C. A., Baldi, E., Bucherelli, C., Roberto, M., Tassoni, G. & Brunelli, M. 2002. Time-dependent inhibition of hippocampal LTP in vitro following contextual fear conditioning in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 15: 143-150.

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

Salmon, E., Van der Linden, M., Collette, F., Delfiore, G., Maquet, P., Degueldre, C., Luxen, A. & Franck, G. 1996. Regional brain activity during working memory tasks. *Brain* 119: 1617-1625.

Save, E., Cressant, A., Thinus-Blanc, C. & Poucet, B. 1998. Spatial firing of hippocampal place cells in blind rats. *J. Neurosci.* 18: 1818-1826.

Scaccianoce, S., Del Bianco, P., Caricasole, A., Nicoletti, F. & Catalani, A. 2003. Relationship between learning, stress and hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* 121: 825-828.

Schaaf, M. J., Workel, J. O., Lesscher, H. M., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S. & de Kloet, E. R. 2001. Correlation between hippocampal BDNF mRNA expression and memory performance in senescent rats. *Brain Res.* 915: 227-233.

Schaub, R. T., Anders, D., Golz, G., Gohringer, K. & Hellweg, R. 2002. Serum nerve growth factor concentration and its role in the preclinical stage of dementia. *Am. J. Psychiatry* 159: 1227-1229.

Schuman, E. M. & Madison, D. V. 1991. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 254: 1503-1506.

Schurr, A., Reid, K. H., Tseng, M. T., West, C. & Rigor, B. M. 1986. Adaptation of adult brain tissue to anoxia and hypoxia in vitro. *Brain Res.* 374: 244-248.

Schurr, A. & Rigor, B. M. 1987. The mechanism of neuronal resistance and adaptation to hypoxia. *Febs. Lett.* 224: 4-8.

Schwegler, H. & Crusio, W. E. 1995. Correlations between radial-maze learning and structural variations of septum and hippocampus in rodents. *Behav. Brain Res.* 67: 29-41.

Scott, S. A., Mufson, E. J., Weingartner, J. A., Skau, K. A. & Crutcher, K. A. 1995. Nerve growth factor in Alzheimer's disease: increased levels throughout the brain coupled with declines in nucleus basalis. *J. Neurosci.* 15: 6213-6221.

Shapiro, M. 2001. Plasticity, hippocampal place cells, and cognitive maps. *Arch. Neurol.* 58: 874-881.

Siegel, G. J. & Chauhan, N. B. 2000. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 33: 199-227.

Sitarek, K., Baranski, B. & Berlinska, B. 1992. The effect of maternal exposure to dioxolane on prenatal and postnatal development in rats. *Pol. J. Occup. Med. Environ. Health* 5: 159-166.

Small, W. S. 1900. An experimental study of the mental process of the rat. *Am. J. Psychiatry*.

Soderling, T. R. & Derkach, V. A. 2000. Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci.* 23: 75-80.

Son, H., Hawkins, R. D., Martin, K., Kiebler, M., Huang, P. L., Fishman, M. C. & Kandel, E. R. 1996. Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell* 87: 1015-1023.

Stalder, M., Phinney, A., Probst, A., Sommer, B., Staufenbiel, M. & Jucker, M. 1999. Association of microglia with amyloid plaques in brains of APP23 transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 154: 1673-1684.

Stanwood, G. D. & Levitt, P. 2004. Drug exposure early in life: functional repercussions of changing neuropharmacology during sensitive periods of brain development. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4: 65-71.

Stewart, J., Mitchell, J. & Kalant, N. 1989. The effects of life-long food restriction on spatial memory in young and aged Fischer 344 rats measured in the eight-arm radial and the Morris water mazes. *Neurobiol. Aging* 10: 669-675.

Stoelzel, C. R., Stavnezer, A. J., Denenberg, V. H., Ward, M. & Markus, E. J. 2002. The effects of aging and dorsal hippocampal lesions: performance on spatial and nonspatial comparable versions of the water maze. *Neurobiol. Learn. Mem.* 78: 217-233.

Stopka, P. & Macdonald, D. W. 2003. Way-marking behaviour: an aid to spatial navigation in the wood mouse (Apodemus sylvaticus). *BMC. Ecol.* 3: 3.

Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K. H., Mistl, C., Rothacher, S., Ledermann, B., Burki, K., Frey, P., Paganetti, P. A., Waridel, C., Calhoun, M. E., Jucker, M., Probst, A., Staufenbiel, M. & Sommer, B. 1997. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94: 13287-13292.

Sugaya, K., Greene, R., Personett, D., Robbins, M., Kent, C., Bryan, D., Skiba, E., Gallagher, M. & McKinney, M. 1998. Septo-hippocampal cholinergic and neurotrophin markers in age-induced cognitive decline. *Neurobiol. Aging* 19: 351-361.

Sutherland, R. J., Whishaw, I. Q. & Kolb, B. 1983. A behavioural analysis of spatial localization following electrolytic, kainate- or colchicine-induced damage to the hippocampal formation in the rat. *Behav. Brain Res.* 7: 133-153.

Sykova, E., Vorisek, I., Antonova, T., Mazel, T., Meyer-Luehmann, M., Jucker, M., Hajek, M., Ort, M. & Bures, J. 2005. Changes in extracellular space size and geometry in APP23 transgenic mice: a model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102: 479-484.

Taube, J. S., Goodridge, J. P., Golob, E. J., Dudchenko, P. A. & Stackman, R. W. 1996. Processing the head direction cell signal: a review and commentary. *Brain Res. Bull.* 40: 477-484.

Taube, J. S., Kesslak, J. P. & Cotman, C. W. 1992. Lesions of the rat postsubiculum impair performance on spatial tasks. *Behav. Neural. Biol.* 57: 131-143.

Teyler, T. J. 1980. Brain slice preparation: hippocampus. *Brain Res. Bull.* 5: 391-403.

Tolman, E. C. 1948. Cognitive maps in rats and men. *Psychol. Rev.* 55: 189-208.

Tombaugh, G. C., Rowe, W. B., Chow, A. R., Michael, T. H. & Rose, G. M. 2002. Theta-frequency synaptic potentiation in CA1 in vitro distinguishes cognitively impaired from unimpaired aged Fischer 344 rats. *J. Neurosci.* 22: 9932-9940.

Toni, N., Buchs, P. A., Nikonenko, I., Bron, C. R. & Muller, D. 1999. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402: 421-425.

Tuszynski, M. H., Thal, L., Pay, M., Salmon, D. P., HS, U., Bakay, R., Patel, P., Blesch, A., Vahlsing, H. L., Ho, G., Tong, G., Potkin, S. G., Fallon, J., Hansen, L., Mufson, E. J., Kordower, J. H., Gall, C. & Conner, J. 2005. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat. Med.* 11: 551-555.

Ueyama, T., Kawai, Y., Nemoto, K., Sekimoto, M., Tone, S. & Senba, E. 1997. Immobilization stress reduced the expression of neurotrophins and their receptors in the rat brain. *Neurosci. Res.* 28: 103-110.

Vaillend, C., Billard, J. M. & Laroche, S. 2004. Impaired long-term spatial and recognition memory and enhanced CA1 hippocampal LTP in the dystrophin-deficient Dmd(mdx) mouse. *Neurobiol. Dis.* 17: 10-20.

van Assche, F. A. & Aerts, L. 1985. Long-term effect of diabetes and pregnancy in the rat. *Diabetes* 34 Suppl 2: 116-118.

Van Dam, D., D'Hooge, R., Staufenbiel, M., Van Ginneken, C., Van Meir, F. & De Deyn, P. P. 2003. Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition. *Eur. J. Neurosci.* 17: 388-396.

Vertes, R. P. 2005. Hippocampal theta rhythm: a tag for short-term memory. *Hippocampus* 15: 923-935.

Vianna, M. R., Alonso, M., Viola, H., Quevedo, J., de Paris, F., Furman, M., de Stein, M. L., Medina, J. H. & Izquierdo, I. 2000. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn. Mem.* 7: 333-340.

von Richthofen, S., Lang, U. E. & Hellweg, R. 2003. Effects of different kinds of acute stress on nerve growth factor content in rat brain. *Brain Res.* 987: 207-213.

Ward, M. T., Stoelzel, C. R. & Markus, E. J. 1999. Hippocampal dysfunction during aging II: deficits on the radial-arm maze. *Neurobiol. Aging* 20: 373-380.

Westerman, M. A., Cooper-Blacketer, D., Mariash, A., Kotilinek, L., Kawarabayashi, T., Younkin, L. H., Carlson, G. A., Younkin, S. G. & Ashe, K. H. 2002. The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci* 22: 1858-1867.

Whishaw, I. Q. 1985. Cholinergic receptor blockade in the rat impairs locale but not taxon strategies for place navigation in a swimming pool. *Behav. Neurosci.* 99: 979-1005.

Wilkins, J. F. 2005. Genomic imprinting and methylation: epigenetic canalization and conflict. *Trends Genet.* 21: 356-365.

Wilson, M. A. & McNaughton, B. L. 1993. Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science* 261: 1055-1058.

Winocur, G. 1985. The hippocampus and thalamus: their roles in short- and long-term memory and the effects of interference. *Behav. Brain Res.* 16: 135-152.

Wood, E. R., Dudchenko, P. A. & Eichenbaum, H. 1999. The global record of memory in hippocampal neuronal activity. *Nature* 397: 613-616.

Yamamoto, C. & McIlwain, H. 1966. Electrical activities in thin sections from the mammalian brain maintained in chemically-defined media in vitro. *J. Neurochem.* 13: 1333-1343.

Young, B. J., Fox, G. D. & Eichenbaum, H. 1994. Correlates of hippocampal complex-spike cell activity in rats performing a nonspatial radial maze task. *J. Neurosci.* 14: 6553-6563.

Zamanillo, D., Sprengel, R., Hvalby, O., Jensen, V., Burnashev, N., Rozov, A., Kaiser, K. M., Koster, H. J., Borchardt, T., Worley, P., Lubke, J., Frotscher, M., Kelly, P. H., Sommer, B., Andersen, P., Seeburg, P. H. & Sakmann, B. 1999. Impoertance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science* 284: 1805-1811.

Zola-Morgan, S., Squire, L. R., Amaral, D. G. & Suzuki, W. A. 1989. Lesions of perirhinal and parahippocampal cortex that spare the amygdala and hippocampal formation produce severe memory impairment. *J. Neurosci.* 9: 4355-4370.

Zola-Morgan, S., Squire, L. R. & Mishkin, M. 1982. The neuroanatomy of amnesia: amygdala-hippocampus versus temporal stem. *Science* 218: 1337-1339.

8. Anhang

Downloaded from www.learnmem.org on January 26, 2006

Research

Spatial navigation in complex and radial mazes in APP23 animals and neurotrophin signaling as a biological marker of early impairment

Rainer Hellweg,[1,3] Peter Lohmann,[1,3] Roman Huber,[2] Alexander Kühl,[1] and Matthias W. Riepe[1,4]

[1]*Department of Psychiatry, Charité University, 14050 Berlin, Germany;* [2]*Department of Neurology, University of Ulm, 89075 Ulm, Germany*

Impairment of hippocampal function precedes frontal and parietal cortex impairment in human Alzheimer's disease (AD). Neurotrophins are critical for behavioral performance and neuronal survival in AD. We used complex and radial mazes to assess spatial orientation and learning in wild-type and B6-Tg(ThylAPP)23Sdz (APP23) animals, a transgenic mouse model of AD. We also assessed brain content of nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and neurotrophin-3 (NT-3). Performance was alike in wild-type and APP23 animals in the radial maze. In contrast, performance in the complex maze was better in wild-type than APP23 animals. Contrary to the wild-type, hippocampal BDNF levels decreased on training in APP23 animals. Hippocampal and frontal cortex NGF levels in APP23 animals correlated with the time to solve the complex maze, but correlated inversely with escape time in wild-type animals. NT-3 levels were alike in wild-type and APP23 animals and were unchanged even after training. Both types of mazes depend on hippocampal integrity to some extent. However, according to the cognitive mapping theory of spatial learning, the complex maze because of the increased complexity of the environment most likely depends more strongly on preserved hippocampal function than the radial maze in the working memory configuration applied here. Greater impairment in complex maze performance than in radial maze performance thus resembles the predominant affliction of the loss of hippocampal function in human AD. NGF and BDNF levels on maze learning are different in wild-type and transgenic animals, indicating that biological markers of AD may be altered on challenge even though equilibrium levels are alike.

Maze learning has been used to assess learning in experimental animals since the turn of the last century (Lashley and Franz 1912). Several neuronal structures are involved in visuospatial cognition and tasks like the escape from an unknown maze. Results from early animal research were integrated into the cognitive mapping hypothesis (Tolman 1948; O'Keefe and Nadel 1978). Animal research as well as study of patients with brain lesions and normal subjects have demonstrated the crucial role of the hippocampus and the hippocampal formation for the representation of space and navigation therein (Milner 1965; Pigott and Milner 1993; Nunn et al. 1999; Wood et al. 1999; Gron et al. 2000). In addition, the parietal lobes and prefrontal areas have been shown to partake in complex navigation (Goldman-Rakic 1995; Salmon et al. 1996; Gron et al. 2000). Radial mazes may serve as a test for reference memory or working memory, depending on the experimental procedure.

Spatial learning performance decreases with age (Fischer et al. 1992) and in animal models with Aβ overexpression and/or Aβ plaques (Berger-Sweeney et al. 1999; Dodart et al. 1999; Chen et al. 2000; Arendash et al. 2001; Koistinaho et al. 2001; Lalonde et al. 2002; Kelly et al. 2003). A recent study pointed out that addressing the relation between Aβ plaques and memory performance requires careful adjustment for age (Westerman et al. 2002). In studies assessing B6-Tg(ThylAPP)23Sdz (APP23) animals, impairment was assessed in the Morris water maze (Kelly et al. 2003), which poses an additional stress on animals, thus possibly not only assessing navigation but also differences in anxiety. This may explain the hyperactivity observed in young APP23 animals (Van Dam et al. 2003), which makes it impossible to discern impairment in spatial learning per se from differences of activity levels. On the other hand, food deprivation may also be a stressor. However, this has not been systematically assessed in APP23 animals yet. Other than in the study by Van Dam et al. (2003), impairment in spatial learning has been linked to amyloid-associated degeneration in hippocampus and frontal cortex in other studies (Berger-Sweeney et al. 1999; Gordon et al. 2001).

Post mortem studies on Alzheimer's Disease (AD) brains have found increases in nerve growth factor (NGF) (Crutcher et al. 1993; Fahnestock et al. 1996; Hellweg et al. 1998a; Hock et al. 2000; Peng et al. 2004) and decreases in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in surviving neurons of hippocampus and neocortical regions (Hock et al. 2000; Siegel and Chauhan 2000). Reduced levels of neurotrophins have been claimed to be involved in triggering early memory impairment (Hellweg et al. 1998a; Siegel and Chauhan 2000; Schaub et al. 2002; Michalski and Fahnestock 2003; Lang et al. 2004). Chronic deprivation of NGF leads to the formation and deposition of Aβ in mice, suggesting a link between NGF signaling and abnormal processing of amyloid precursor protein (Capsoni et al. 2002). Exogenous application of NGF or BDNF improves spatial memory in aged rats (Fischer et al. 1991; Frick et al. 1997; Almli et al. 2000). Moreover, regional selective application of NGF to the forebrain seemed to bring about a delay of cognitive decline in patients with AD (Tuszynski et al. 2005). Vice versa, endogenous BDNF expression may be linked to learning (Linnarsson et al. 1997; Scaccianoce et

[3]These authors contributed equally to this work.
[4]Corresponding author.
E-mail matthias.riepe@charite.de; fax 49 30 8445 8255.
Article published online ahead of print. Article and publication date are at http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.2606.

Downloaded from www.learnmem.org on January 26, 2006

Table 1. Levels of NGF, BDNF, and NT-3 in the hippocampus, the frontal cortex, and the striatum in wild-type control animals and animals after learning of the maze

	Hippocampus			
	Rest		Trained	
	Mean	SD	Mean	SD
NGF				
Wild-type	5.32	0.82	2.98	1.69
In group			**	
Cross group		**		
APP	3.44	1.16	1.87	0.88
			*	
BDNF				
Wild-type	43.40	13.66	32.97	13.04
In group			n.s.	
Cross group		n.s.		
APP	46.35	21.51	21.53	8.47
			**	
NT-3				
Wild-type	7.13	5.42	3.29	2.24
In group			n.s.	
Cross group		n.s.		
APP	4.70	2.51	3.31	3.31
			n.s.	

	Striatum			
	Rest		Trained	
	Mean	SD	Mean	SD
NGF				
Wild-type	1.42	0.58	1.17	0.38
In group			n.s.	
Cross group		*		
APP23	0.80	0.21	1.07	0.36
			n.s.	
BDNF				
Wild-type	41.02	13.16	29.13	7.25
In group			n.s.	
Cross group		n.s.		
APP23	34.90	7.75	30.55	7.68
			n.s.	
NT-3				
Wild-type	2.17	0.79	2.07	1.01
In group			n.s.	
Cross group		n.s.		
APP23	3.43	2.23	2.39	0.73
			n.s.	

(continued)

Table 1. *Continued*

	Cortex			
	Rest		Trained	
	Mean	SD	Mean	SD
NGF				
Wild-type	3.24	1.12	2.97	0.90
In group			n.s.	
Cross group		n.s.		
APP	2.87	0.76	3.16	0.65
			n.s.	
BDNF				
Wild-type	34.70	14.63	43.15	9.55
In group			n.s.	
Cross group		**		
APP	60.71	12.96	54.58	19.25
			n.s.	
NT-3				
Wild-type	2.21	1.63	2.26	0.88
In group			n.s.	
Cross group		n.s.		
APP	1.75	0.76	2.84	1.17
			*	

*$P < 0.05$; **$P < 0.01$.

al. 2003) and increases on learning in controls (Gomez-Pinilla et al. 2001). The impact of learning on BDNF mRNA expression is confined to the brain areas involved in the processing of spatial information (Kesslak et al. 1998). Similarly, increased NGF expression may result from housing the animals in an enriched environment (Mohammed et al. 1990). Post mortem levels of neurotrophin-3 (NT-3) were found decreased in the cortex of AD brains (Narisawa-Saito and Nawa 1996) but unchanged in another study (Hock et al. 2000). A negative correlation between NT-3 levels and age has been observed in post mortem hippocampus and putamen of control subjects, and for BDNF in post mortem frontal cortex (Durany et al. 2000).

It was the goal of the current study to investigate the spatial learning in young-adult APP23 animals in a newly designed complex maze avoiding interference with stress posed on the animals by swimming. A further goal was to assess the dynamic regulation of neurotrophin levels on spatial learning in these animals.

Results

Basal nonstimulated levels of neurotrophins and their regulation on learning

At baseline, NGF levels in hippocampus and striatum but not in frontal cortex were higher in wild-type controls than in APP23 animals (Table 1). On training, NGF levels decreased in hippocampus in wild-type controls and APP23 animals but remained at control levels in striatum and frontal cortex.

In contrast, BDNF levels were significantly higher in frontal cortex in transgenic animals than in controls but alike in hippocampus and striatum in controls and transgenic animals (Table 1). On training, BDNF levels decreased in hippocampus in APP23 animals but remained alike in all other groups.

No differences between NT-3 levels in wild-type animals and APP23 animals were found in any of the investigated brain regions.

Maze learning in an eight-arm radial maze and a complex maze

In the eight-arm radial maze (Fig. 1), the number of errors decreased from 17.1 ± 5.6 (mean ± standard deviation) in wild-type controls and 13.6 ± 4.7 in APP23 animals (P not significant) to 4.4 ± 3.9 in controls ($P < 0.01$ to onset) and 6.4 ± 4.7 in APP23 animals ($P < 0.01$ to onset; group difference not significant) (Fig. 2). Similarly, the time to solve the task on the last trial was alike in wild-type controls, 235.0 ± 79.0, and APP23 animals, 254.2 ± 68.2 (P not significant) (Fig. 2). Analysis of errors made on individual trials with two-sided t-tests revealed significant differences at trial 2 (8.5 ± 2.8 in wild-type controls vs. 16.6 ± 5.6 in APP23 animals; $P < 0.01$) and trial 3 (6.5 ± 3.6 in wild-type controls vs. 12.3 ± 4.6 in APP23 animals; $P < 0.05$). Even with this liberal analysis no difference was observed concerning the duration of the trial. Thus, at 10 mo of age, only

Downloaded from www.learnmem.org on January 26, 2006

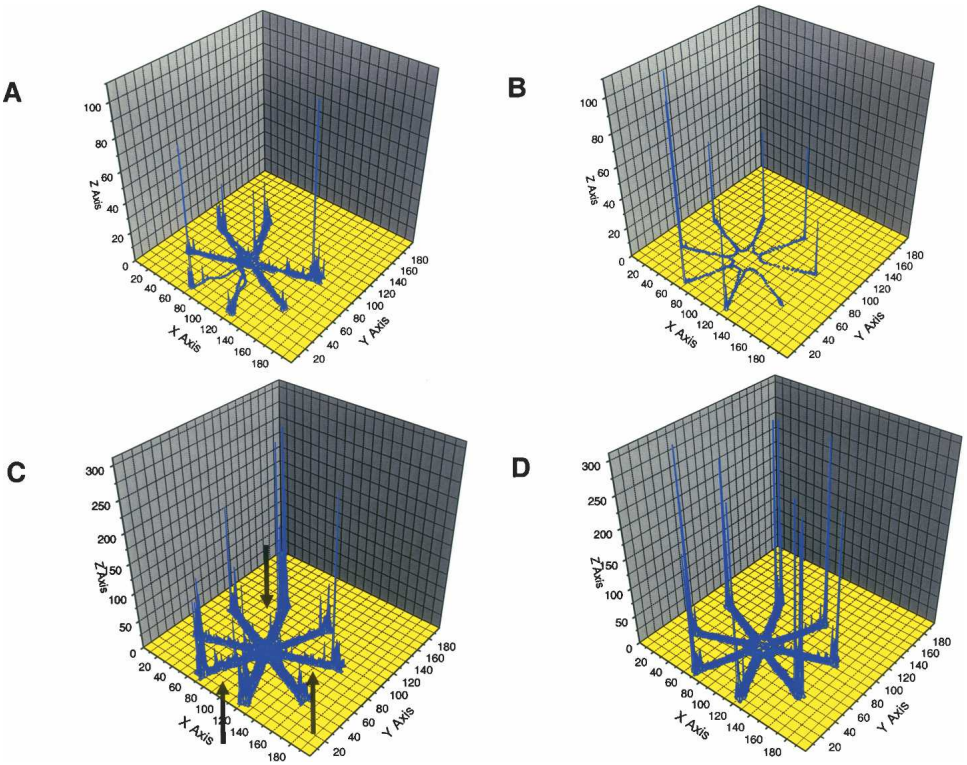

Figure 1. (*A*) Trace for a single animal on first exposure to the radial maze. Note that not all arms of the maze are visited and that the animal rested in some arms or revisited the arms (*x*-axis and *y*-axis refer to the location of the animal, *z*-axis to the number of observations). (*B*) Trace for a single animal after training in the radial maze for 20 d. Note that the end of each arm of the maze is visited without resting or revisiting any arm. (*C*) Overlay of the individual traces for $n = 10$ wild-type animals on first exposure to the maze (arrows indicate resting or turning of animals prior to or after reaching the food pellet at the end of the arm). (*D*) Overlay of the individual traces for $n = 10$ wild-type animals after training in the radial maze for 20 d.

minor differences were observed in learning of the radial maze in wild-type controls and APP23 animals.

In order to further assess spatial learning, a complex maze was designed. In the complex maze, wild-type controls and APP23 animals at 10 mo of age explored the maze on first exposure to the maze in a similar fashion (Fig. 3). At the end of the experiment there were still some APP23 animals that did not avoid the dead end marked by arrow in Figure 3D. However, each and every animal of the control group avoided this dead end.

Upon maze learning, the time to escape the complex maze (Fig. 4) decreases in wild-type controls and APP23 animals (Fig. 4). At the first exposure to the maze, the time to escape from the maze was 152.3 ± 87.7 sec (mean ± standard deviation) in wild-type controls and 116.1 ± 83.3 sec in APP23 animals (P not significant). On the last trial, the average time to escape was 30.1 ± 19.2 sec in wild-type controls ($P < 0.001$ to onset) and 62.4 ± 40.0 sec (n.s. to onset) in APP23 animals ($P < 0.05$ to control). Thus, performance in the complex maze did not significantly improve for the APP23 animals, while a clear-cut improvement of spatial navigation is observed regarding the time to solve the maze as well as the avoidance of certain dead ends for each and every animal of the wild-type group investigated.

Correlational analysis of maze learning and neurotrophins

Performance in the complex maze correlated with NGF levels in hippocampus in trained wild-type control animals, but correlated inversely with NGF levels in transgenic APP23 animals (Fig. 5). Similarly, a trend toward an inverse correlation between NGF levels and behavioral performance was observed in frontal cortex

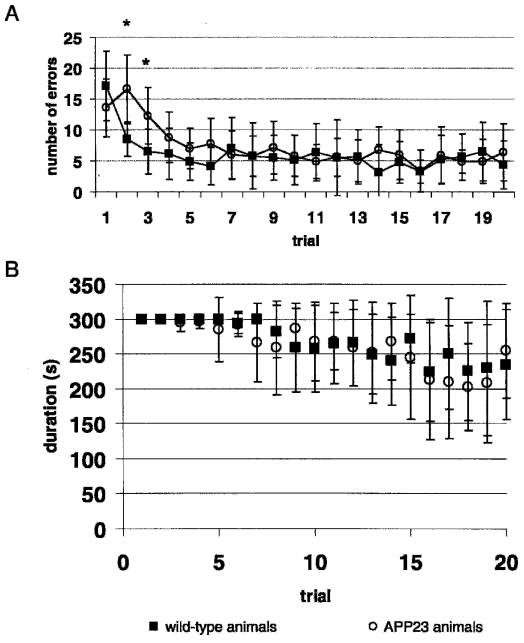

Figure 2. (*A*) Number of errors (mean ± standard deviation) in solving the radial maze in wild-type animals (squares) and APP23 animals (circles). Unpaired *t*-test significant differences are found on day 2 and day 3 (*). However, group difference is not significant (compare Results). (*B*) Time to complete the radial maze (mean ± standard deviation) in control animals (squares) and APP23 animals (circles).

Downloaded from www.learnmem.org on January 26, 2006

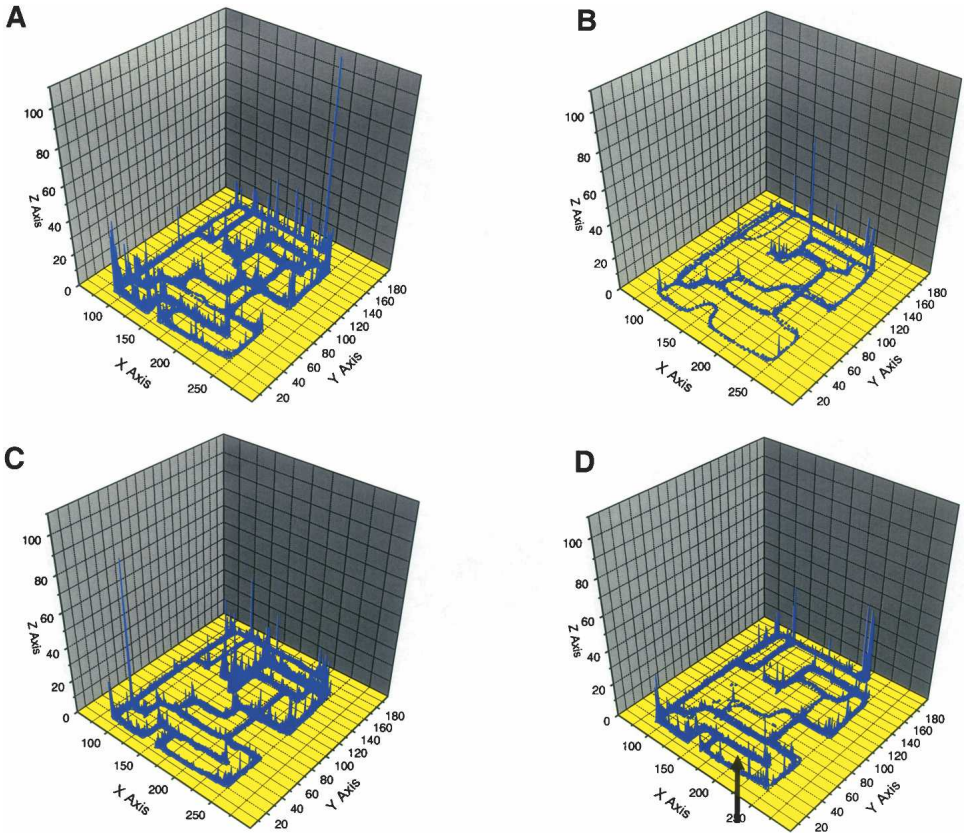

Figure 3. Overlay of the individual traces of $n = 10$ animals to solve the complex maze (*x*-axis and *y*-axis refer to the location of the animal, *z*-axis to the number of observations). (*A*) Wild-type animals on first placement in the complex maze; (*B*) wild-type animals after training in the complex maze for 20 d. (*C*) Overlay of the individual traces of $n = 10$ APP23 animals to solve the complex maze on first placement in the complex maze. (*D*) APP23 animals after training in the complex maze for 20 d. Note that a blind alley avoided by all control animals after training is still visited by APP23 animals (indicated by arrow).

in transgenic animals, but no correlation was observed in wild-type controls.

No other significant correlations were observed in other brain regions investigated or with BDNF or NT-3 levels (data not shown). Similarly, no correlations were observed between any behavioral measure in the radial maze and any of the neurotrophins at 10 mo of age (Figs. 6 and 7).

Discussion

Maze studies are an established means to investigate learning in experimental animals (Tolman 1948). Initially, complex mazes were used, but over the years mostly radial mazes or water mazes have been used. NGF levels were found to be inversely correlated with performance in the Morris water maze (Sugaya et al. 1998). Similarly, BDNF levels in frontal cortex are negatively associated with working memory performance (Mizuno et al. 2000; Alonso et al. 2002; Bimonte-Nelson et al. 2003) but may be positively correlated with performance in a hippocampal task (Schaaf et al. 2001). However, swimming as in water mazes imposes an additional stress on experimental animals that may interfere with the study of cognition per se. This is of particular importance when considering neurotrophin levels since neurotrophin levels in hippocampus have been shown to decrease upon stress (Ueyama et al. 1997; Scaccianoce et al. 2003; von Richthofen et al. 2003; Adlard and Cotman 2004). On the other hand, food deprivation may also be a stressor. However, this has not yet been systematically assessed in APP23 animals.

In the present study, the radial maze was used as a working memory task. Food pellets were placed in all eight arms in every trial, and animals only needed to keep in memory the arms already visited in that specific trial. Performance was alike in wild-type controls and transgenic APP23 animals regarding both errors and the duration to solve the maze. In contrast, a clear-cut difference in performance in the complex maze was observed between controls and APP23 animals. For this maze to be solved, animals needed to build an internal map of the maze to improve performance. While the time to find the way out of the maze decreased in both control and APP23 animals, the rate of decline was greater in control than in APP23 animals. In addition, in the control group some dead-end alleys were avoided by each and every animal, which was not the case for the transgenic animals.

BDNF and NGF levels remained alike in frontal cortex in female rats on training in a working memory task (Bimonte et al. 2003), which is similar to the present results obtained in animals trained in the radial and complex mazes. Complex mazes are known to crucially depend on hippocampal function (Tolman 1948). In contrast to frontal cortex and striatum, we found a decrease in hippocampal NGF levels in female controls and a decrease in both NGF and BDNF levels in APP23 animals. Extending the findings to a correlational analysis between neurotrophin levels in controls and APP23 animals, the data demonstrate a qualitatively different response in control and APP23 animals. The time to navigate to the exit of the complex maze is positively correlated with NGF levels in both hippocampus and frontal cortex in APP23 animals but inversely correlated with hippocampal NGF levels in controls. Notwithstanding this differential regula-

Downloaded from www.learnmem.org on January 26, 2006

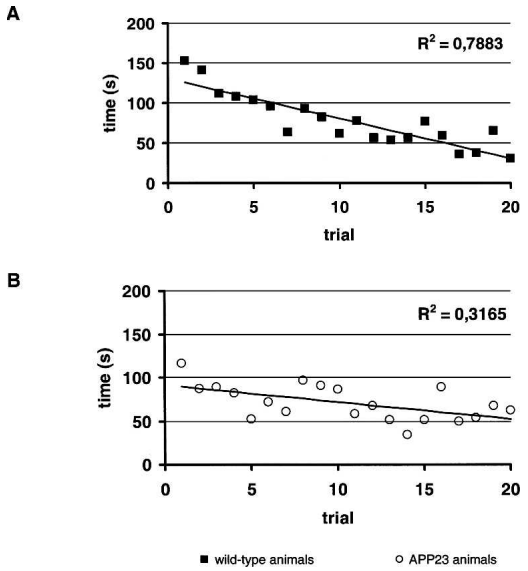

Figure 4. Learning curve for the time to escape from the complex maze. Values represent means for a group ($n = 10$) of (*A*) wild-type animals and (*B*) APP23 animals.

tion, hippocampal and frontal cortex NGF levels are alike in control and APP23 animals. It has been speculated that lack of adequate environmental stimulation might be of importance in age-related behavioral and neurochemical deficits, because novel environments caused significant changes in hippocampal NGF levels (Mohammed et al. 1990; Pham et al. 1999). In contrast, the present work may indicate that after onset of the disease, training may have detrimental effects, as has also been observed in young normal subjects (Markowska et al. 1994). Moreover, supraphysiological neurotrophin concentrations may be part of a pathophysiological cascade and, for example, induce aberrant sprouting (Hellweg et al. 1998b; Burbach et al. 2004).

It needs to be considered that endogenous neurotrophin levels in wild-type controls and transgenic APP23 animals are

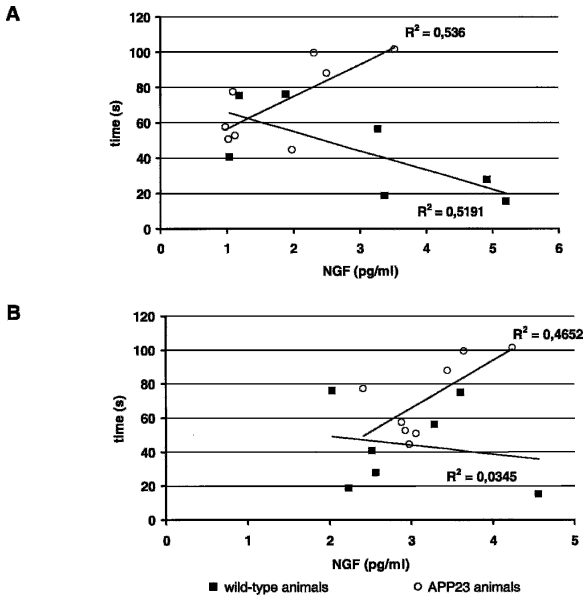

Figure 5. Correlational analysis of NGF levels in (*A*) hippocampus and (*B*) frontal cortex in control animals (squares) and APP23 animals (circles) with time to escape from the complex maze.

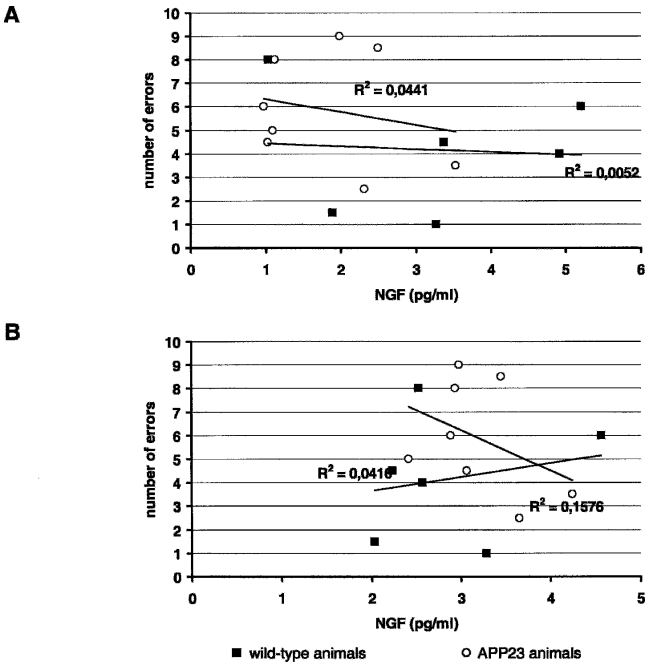

Figure 6. Correlational analysis of NGF levels in (*A*) hippocampus and (*B*) frontal cortex in control animals (squares) and APP23 animals (circles) with number of errors in the radial maze.

subject to age effects in a distinct fashion. On aging, the increase of BDNF in hemizygous APP23 animals exceeds the increase in wild-type animals (Burbach et al. 2004). Unfortunately, this age effect has not yet been investigated for NGF. Age- and/or amyloid-related neurotrophin increase in the brain of APP23 transgenic mice might be due to impaired retrograde transport from the target region of the cholinergic basal forebrain (Crutcher et al. 1993; Scott et al. 1995; Hock et al. 2000; Siegel and Chauhan 2000; Mufson et al. 2003; Peng et al. 2004). There is at least experimental evidence that increased NGF levels are disease- or

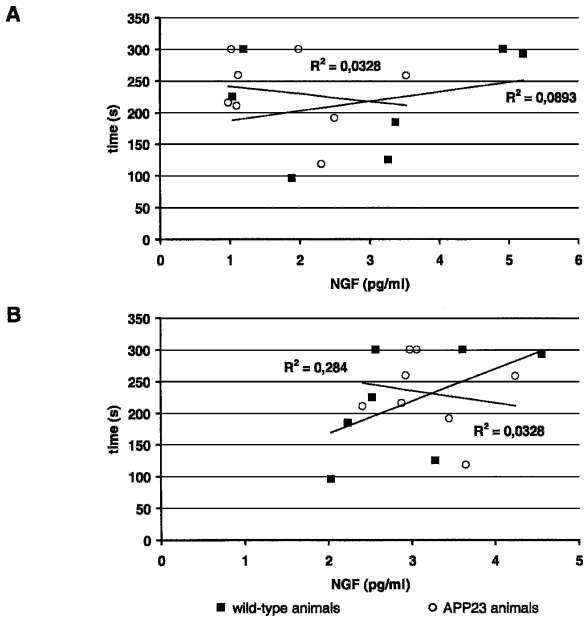

Figure 7. Correlational analysis of NGF levels in (*A*) hippocampus and (*B*) frontal cortex in control animals (squares) and APP23 animals (circles) with time to escape from the radial maze.

Downloaded from www.learnmem.org on January 26, 2006

trauma-related rather than physiological (Lang et al. 2004). With respect to BDNF, we have recently shown in APP23 animals that de novo synthesis of this neurotrophin is stimulated in both astrocytes and microglial cells surrounding amyloid plaques in a disease-related manner in advanced stages of the disease (Burbach et al. 2004). Considering that the endogenous neurotrophin increase in APP23 animals exceeds the increase in wild-type animals, therapeutic trials with exogenous application of neurotrophins seem less promising than anticipated. In fact, preliminary trials with intracerebroventricular application of NGF to patients with severe AD have failed thus far (Eriksdotter et al. 1998). Thus, it can be concluded from the present study that neurotrophin treatment at the earliest possible time point is warranted to assess a potential benefit of exogenous application of neurotrophins. This view is supported by a recent report of NGF-related improvement of symptoms and progression observed in early AD (Tuszynski et al. 2005).

Overall we conclude that neurotrophin regulation is ambiguous in health and disease. While hippocampal NGF levels on training correlate positively with performance in healthy controls, they correlate inversely with performance in a transgenic model of AD.

Materials and Methods

Animals

Littermate wild-type and B6-Tg(ThylAPP)23Sdz (APP23) mice were born and raised at Novartis Pharmaceutical Research (Basel, Switzerland) as previously described (Sturchler-Pierrat et al. 1997). These mice express the human APP751 cDNA with the Swedish double mutation under control of the neuron-specific mouse Thy-1 promoter fragment. APP23 mice were established on a B6D2 background and have been continuously back-crossed to C57BL/6J. Upon arrival several weeks prior to experimentation, animals were housed with four animals of the same age in one cage. Animals had exposure to food and water ad libitum, and were maintained on a 12-h light/12-h dark cycle. The animals were fasted to attain 85%–90% of initial weight prior to and during experimentation in the mazes. Animals were killed by cervical dislocation. The tissue of different brain regions (frontal cortex, hippocampus, striatum) was dissected and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at −80°C until further analysis.

Maze paradigm

1. A complex maze was designed constructed of gray rigid PVC. The aerial view is seen in Figure 8. Animals were trained once a day. Animals were released from the start area facing the center and had 300 sec to find the exit. A food pellet was placed at the exit of the maze to reward the animals.
2. In addition, animals were trained in a standard eight-arm radial maze. At the end of each arm, a food pellet was offered in a bowl. Mice remained in the maze for a maximum time of 300 sec or until they had visited all arms.

Both mazes were surrounded by a curtain with no optical cues and only a red twilight hang above in the middle of the mazes. After each trial, the maze was cleaned to rule out odor cues from previous animals. On each day, all animals were exposed to the complex maze prior to exposure to the radial maze. The time interval between testing in the radial maze and the complex maze was 5 h. Experiments were performed between 10 a.m. and 6 p.m. daily for 20 d.

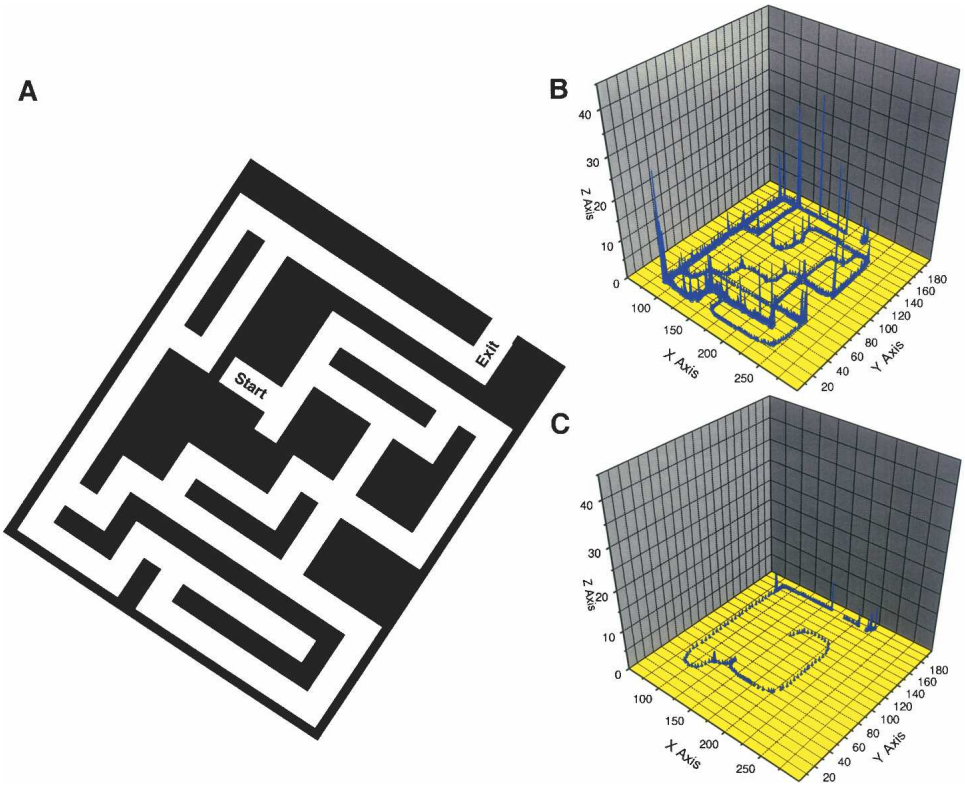

Figure 8. (*A*) Aerial view of the complex maze. Animals were placed in the start zone. A video camera allowed assessment of the position of animals at a frequency of 1 Hz. (*B*) Trace for a single animal on first placement in the complex maze. Note that all alleys of the maze are explored. (*x*-axis and *y*-axis refer to the location of the animal, *z*-axis to the number of observations). (*C*) Trace for a single animal after training in the complex maze for 20 d showing that the animal reaches the exit without errors.

Downloaded from www.learnmem.org on January 26, 2006

Neurotrophin levels

Each frozen brain region was homogenized by ultrasonication in 10–20 vol of lysing buffer containing 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0), 0.4 M NaCl, 0.1% NaN_3, and a variety of protease inhibitors (Hellweg et al. 1989) and was stored at −80°C until analysis. Each brain region was consecutively processed for quantification of each neurotrophin, for example, NGF, BDNF, and NT-3. Determinations of recovery and specific and unspecific neurotrophin binding (the latter against mouse IgG_1 obtained from MOPC 21) involved quadruplicate fluorescence determinations for each tissue sample in each neurotrophin assay. The neurotrophin levels were expressed as picograms per milligram of tissue (wet weight). In order to minimize the influence of unavoidable variances between experiments (Hellweg et al. 1989, 1998a), neurotrophin levels from corresponding controls and transgenic animals were always measured in the same assay.

Endogenous NGF levels in the rethawed homogenates were determined by a fluorometric two-site enzyme immunoassay (ELISA) that has been described in detail elsewhere (Hellweg et al. 1989, 1998a). NGF content was expressed as equivalents of mouse 2.5 S NGF. The detection limit of the assay was 0.25 pg/mL.

Endogenous levels of BDNF were measured in the rethawed homogenates using commercial ELISA kits in principle according to the manufacturer's instructions (Promega Inc., USA) but improved and adapted to the fluorometric technique used also for NGF determination as described in detail previously (Hellweg et al. 2003).

Endogenous levels of NT-3 were measured in the rethawed homogenates using commercial ELISA kits in principle according to the manufacturer's instructions (Promega Inc., USA) but were improved and adapted to the fluorometric technique used also for NGF determination. Briefly, microtiter plates (Dynatech microfluor black 96-well, flat-bottom microtiter plates) were coated with 50 µL/well of primary anti-NT-3 chicken IgY polyclonal antibody diluted [1:1000] in carbonate buffer (pH 9.6). For testing of unspecific binding, parallel wells were coated with unspecific chicken IgG [1:80000] in carbonate buffer (pH 9.6). After overnight incubation at 4°C, the plates were washed four times with washing buffer as described for the NGF assay (Hellweg et al. 1989, 1998a). Homogenates were centrifuged, and supernatants were diluted with the equal amount of 0.1% NP-40 as described elsewhere (Hellweg et al. 1989, 1998a). Each 50 µL of sample was applied in quaduplicate wells along with the standard, then incubated for 4 h in the dark at room temperature. After washing four times, a secondary anti-NT-3 monoclonal antibody diluted [1:6000] in standard/conjugate buffer (Hellweg et al. 1989, 1998a) was added to the appropriate wells (50 µL each) and then incubated overnight at 4°C. After washing out four times, anti-mouse IgG β-galactosidase conjugate Biozol diluted [1:10000] in standard/conjugate buffer (Hellweg et al. 1989, 1998a) was added to the appropriate wells (50 µL each). Incubation was done again at room temperature overnight in the dark at 4°C followed by washing four times with washing buffer (Hellweg et al. 1989, 1998a) and two times with substrate buffer (0.1 M sodium phosphate at pH 8.7, 1 mM $MgCl_2$). Enzyme reaction was started and stopped as described for NGF determination in detail (Hellweg et al. 1989, 1998a). The accumulation of the fluorescent emitter (excitation wavelength 355 nm, emission wavelength 460 nm) was followed in a microplate fluorometer (Labsystems Fluoroskan II). Matched background values were subtracted from each reading, and the results were expressed as enzyme activity by comparison to an external standard of β-galactosidase in antibody-coated microwells. The ELISA values for brain samples were determined from the regression line for the NT-3 standard (recombinant human NT-3) incubated under similar conditions. NT-3 content was expressed as equivalents of recombinant human NT-3. The detection limit of the assay was 1 pg/mL.

Differing from commercial neurotrophin ELISAs, the mean recovery of exogenous neurotrophin (NGF, BDNF, NT-3; 125 pg/mL each) added to the total homogenate ranged from 60% to 90% in each assay. Using these improved fluorometric ELISAs, it is feasible to quantify the endogenous neurotrophins NGF, BDNF, and NT-3 in the same brain tissue with a minimal wet weight of ~5 pg. Typical standard curves are shown in Figure 9.

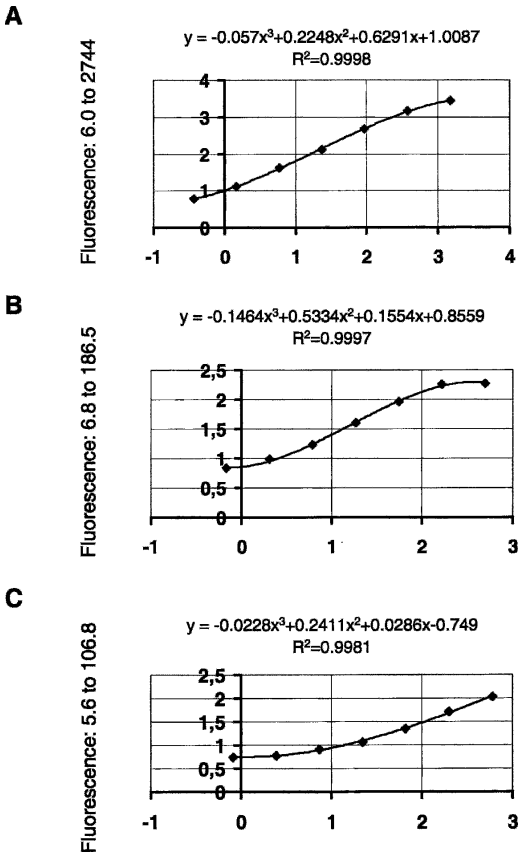

Figure 9. Typical standard curves for (*A*) NGF, (*B*) BDNF, and (*C*) NT-3 ELISAs. Fluorescence intensity is expressed in arbitrary units measured for each neurotrophin concentration tested: (*A*) 0.366 to 1500 pg/mL NGF (diluted 1:4 each), (*B*) 0.686 to 500 pg/mL BDNF (diluted 1:3 each), and (*C*) 0.823 to 600 pg/mL NT-3 (diluted 1:3 each). Fluorescence of blank values obtained for unspecific and specific binding was always below the lowest neurotrophin concentration tested.

Reagents

General lab chemicals of analytical grade were purchased from Merck. Specialty reagents were obtained from Sigma Chemie GmbH, if not stated otherwise. Anti-β NGF monoclonal antibodies (clone 27/21), partly conjugated with β-D-galactosidase, were purchased from Boehringer Mannheim. Anti-BDNF and NT-3 antibodies as well as anti-chicken-IgY-alkaline phosphatase conjugate were purchased from Promega Inc., USA. AttoPhos, namely, the free fluorogenic substrate for the BDNF-ELISA, was purchased from Boehringer Mannheim.

Statistics

Each neurotrophin experiment was conducted with eight tissue blocks from hippocampus, frontal cortex, and striatum from eight animals. Statistical testing was performed by the Mann-Whitney U-test and for multiple comparisons with the Newman-Kuels Analog Test. Statistical significance was accepted at $P < 0.05$.

Acknowledgments

This work was supported by grants from an intramural grant of the Charité University, Berlin (to R.H.), and a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (to M.W.R.). We thank H. Danker-Hopfe for statistical assistance.

Downloaded from www.learnmem.org on January 26, 2006

References

Adlard, P.A. and Cotman, C.W. 2004. Voluntary exercise protects against stress-induced decreases in brain-derived neurotrophic factor protein expression. *Neuroscience* **124:** 985–992.

Almli, C.R., Levy, T.J., Han, B.H., Shah, A.R., Gidday, J.M., and Holtzman, D.M. 2000. BDNF protects against spatial memory deficits following neonatal hypoxia-ischemia. *Exp. Neurol.* **166:** 99–114.

Alonso, M., Vianna, M.R., Depino, A.M., Mello e Souza, T., Pereira, P., Szapiro, G., Viola, H., Pitossi, F., Izquierdo, I., and Medina, J.H. 2002. BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus* **12:** 551–560.

Arendash, G.W., King, D.L., Gordon, M.N., Morgan, D., Hatcher, J.M., Hope, C.E., and Diamond, D.M. 2001. Progressive, age-related behavioral impairments in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes. *Brain Res.* **891:** 42–53.

Berger-Sweeney, J., McPhie, D.L., Arters, J.A., Greenan, J., Oster-Granite, M.L., and Neve, R.L. 1999. Impairments in learning and memory accompanied by neurodegeneration in mice transgenic for the carboxyl-terminus of the amyloid precursor protein. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **66:** 150–162.

Bimonte, H.A., Nelson, M.E., and Granholm, A.C. 2003. Age-related deficits as working memory load increases: Relationships with growth factors. *Neurobiol. Aging* **24:** 37–48.

Bimonte-Nelson, H.A., Hunter, C.L., Nelson, M.E., and Granholm, A.C. 2003. Frontal cortex BDNF levels correlate with working memory in an animal model of Down syndrome. *Behav. Brain Res.* **139:** 47–57.

Burbach, G.J., Hellweg, R., Haas, C.A., Del Turco, D., Deicke, U., Abramowski, D., Jucker, M., Staufenbiel, M., and Deller, T. 2004. Induction of brain-derived neurotrophic factor in plaque-associated glial cells of aged APP23 transgenic mice. *J. Neurosci.* **24:** 2421–2430.

Capsoni, S., Giannotta, S., and Cattaneo, A. 2002. β-Amyloid plaques in a model for sporadic Alzheimer's disease based on transgenic anti-nerve growth factor antibodies. *Mol. Cell Neurosci.* **21:** 15.

Chen, G., Chen, K.S., Knox, J., Inglis, J., Bernard, A., Martin, S.J., Justice, A., McConlogue, L., Games, D., Freedman, S.B., et al. 2000. A learning deficit related to age and β-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* **408:** 975–979.

Crutcher, K.A., Scott, S.A., Liang, S., Everson, W.V., and Weingartner, J. 1993. Detection of NGF-like activity in human brain tissue: Increased levels in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **13:** 2540–2550.

Dodart, J.C., Meziane, H., Mathis, C., Bales, K.R., Paul, S.M., and Ungerer, A. 1999. Behavioral disturbances in transgenic mice overexpressing the V717F β-amyloid precursor protein. *Behav. Neurosci.* **113:** 982–990.

Durany, N., Michel, T., Kurt, J., Cruz-Sanchez, F.F., Cervas-Navarro, J., and Riederer, P. 2000. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 levels in Alzheimer's disease brains. *Int. J. Dev. Neurosci.* **18:** 807–813.

Eriksdotter, J.M., Nordberg, A., Amberla, K., Backman, L., Ebendal, T., Meyerson, B., Olson, L., Seiger, A., Shigeta, M., Theodorsson, E., et al. 1998. Intracerebroventricular infusion of nerve growth factor in three patients with Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **9:** 246–257.

Fahnestock, M., Scott, S.A., Jette, N., Weingartner, J.A., and Crutcher, K.A. 1996. Nerve growth factor mRNA and protein levels measured in the same tissue from normal and Alzheimer's disease parietal cortex. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **42:** 175–178.

Fischer, W., Bjorklund, A., Chen, K., and Gage, F.H. 1991. NGF improves spatial memory in aged rodents as a function of age. *J. Neurosci.* **11:** 1889–1906.

Fischer, W., Chen, K.S., Gage, F.H., and Bjorklund, A. 1992. Progressive decline in spatial learning and integrity of forebrain cholinergic neurons in rats during aging. *Neurobiol. Aging* **13:** 9–23.

Frick, K.M., Price, D.L., Koliatsos, V.E., and Markowska, A.L. 1997. The effects of nerve growth factor on spatial recent memory in aged rats persist after discontinuation of treatment. *J. Neurosci.* **17:** 2543–2550.

Goldman-Rakic, P.S. 1995. Cellular basis of working memory. *Neuron* **14:** 477–485.

Gomez-Pinilla, F., So, V., and Kesslak, J.P. 2001. Spatial learning induces neurotrophin receptor and synapsin I in the hippocampus. *Brain Res.* **904:** 13–19.

Gordon, M.N., King, D.L., Diamond, D.M., Jantzen, P.T., Boyett, K.V., Hope, C.E., Hatcher, J.M., DiCarlo, G., Gottschall, W.P., Morgan, D., et al. 2001. Correlation between cognitive deficits and Aβ deposits in transgenic APP+PS1 mice. *Neurobiol. Aging* **22:** 377–385.

Gron, G., Wunderlich, A.P., Spitzer, M., Tomczak, R., and Riepe, M.W. 2000. Brain activation during human navigation: Gender-different neural networks as substrate of performance. *Nat. Neurosci.* **3:** 404–408.

Hellweg, R., Hock, C., and Hartung, H.D. 1989. An improved and rapid highly sensitive enzyme immunoassay for nerve growth factor. *J. Methods Cell Mol. Biol.* **1:** 43–48.

Hellweg, R., Gericke, C.A., Jendroska, K., Hartung, H.D., and Cervos-Navarro, J. 1998a. NGF content in the cerebral cortex of non-demented patients with amyloid-plaques and in symptomatic Alzheimer's disease. *Int. J. Dev. Neurosci.* **16:** 787–794.

Hellweg, R., von Richthofen, S., Anders, D., Baethge, C., Ropke, S., Hartung, H.D., and Gericke, C.A. 1998b. The time course of nerve growth factor content in different neuropsychiatric diseases—A unifying hypothesis. *J. Neural Transm.* **105:** 871–903.

Hellweg, R., von Arnim, C.A.F., Büchner, M., Huber, R., and Riepe, M.W. 2003. Neuroprotection and neuronal dysfunction upon repetitive inhibition of oxidative phosphorylation. *Exp. Neurol.* **183:** 346–354.

Hock, C., Heese, K., Hulette, C., Rosenberg, C., and Otten, U. 2000. Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: Decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Arch. Neurol.* **57:** 846–851.

Kelly, P.H., Bondolfi, L., Hunziker, D., Schlecht, H.P., Carver, K., Maguire, E., Abramowski, D., Wiederhold, K.H., Sturchler-Pierrat, C., Jucker, M., et al. 2003. Progressive age-related impairment of cognitive behavior in APP23 transgenic mice. *Neurobiol. Aging* **24:** 365–378.

Kesslak, J.P., So, V., Choi, J., Cotman, C.W., and Gomez-Pinilla, F. 1998. Learning upregulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid: A mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance? *Behav. Neurosci.* **112:** 1012–1019.

Koistinaho, M., Ort, M., Cimadevilla, J.M., Vondrous, R., Cordell, B., Koistinaho, J., Bures, J., and Higgins, L.S. 2001. Specific spatial learning deficits become severe with age in β-amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse β-amyloid deposits but do not form plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 14675–14680.

Lalonde, R., Dumont, M., Staufenbiel, M., Sturchler-Pierrat, C., and Strazielle, C. 2002. Spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination in female APP23 transgenic mice with the Swedish mutation. *Brain Res.* **956:** 36–44.

Lang, U.E., Jockers-Scherubl, M.C., and Hellweg, R. 2004. State of the art of the neurotrophin hypothesis in psychiatric disorders: Implications and limitations. *J. Neural Transm.* **111:** 387–411.

Lashley, K.S. and Franz, S.I. 1912. The effects of cerebral destruction upon habit-formation and retention in the albino rat. *Psychobiology* **1:** 71–139.

Linnarsson, S., Bjorklund, A., and Ernfors, P. 1997. Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* **9:** 2581–2587.

Markowska, A.L., Koliatsos, V.E., Breckler, S.J., Price, D.L., and Olton, D.S. 1994. Human nerve growth factor improves spatial memory in aged but not in young rats. *J. Neurosci.* **14:** 4815–4824.

Michalski, B. and Fahnestock, M. 2003. Pro-brain-derived neurotrophic factor is decreased in parietal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **111:** 148–154.

Milner, B. 1965. Visually-guided maze learning in man: Effects of bilateral hippocampal, bilateral frontal, and unilateral cerebral lesions. *Neuropsychologia* **3:** 317–338.

Mizuno, M., Yamada, K., Olariu, A., Nawa, H., and Nabeshima, T. 2000. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *J. Neurosci.* **20:** 7116–7121.

Mohammed, A.K., Winblad, B., Ebendal, T., and Larkfors, L. 1990. Environmental influence on behaviour and nerve growth factor in the brain. *Brain Res.* **528:** 62–72.

Mufson, E.J., Ginsberg, S.D., Ikonomovic, M.D., and DeKosky, S.T. 2003. Human cholinergic basal forebrain: Chemoanatomy and neurologic dysfunction. *J. Chem. Neuroanat.* **26:** 233–242.

Narisawa-Saito, M. and Nawa, H. 1996. Differential regulation of hippocampal neurotrophins during aging in rats. *J. Neurochem.* **67:** 1124–1131.

Nunn, J.A., Graydon, F.J., Polkey, C.E., and Morris, R.G. 1999. Differential spatial memory impairment after right temporal lobectomy demonstrated using temporal titration. *Brain* **122:** 47–59.

O'Keefe, J. and Nadel, L. 1978. *The hippocampus as a cognitive map*. Clarendon Press, Oxford, UK.

Peng, S., Wuu, J., Mufson, E.J., and Fahnestock, M. 2004. Increased proNGF levels in subjects with mild cognitive impairment and mild Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **63:** 641–649.

Pham, T.M., Soderstrom, S., Winblad, B., and Mohammed, A.H. 1999. Effects of environmental enrichment on cognitive function and hippocampal NGF in the non-handled rats. *Behav. Brain Res.* **103:** 63–70.

Pigott, S. and Milner, B. 1993. Memory for different aspects of complex visual scenes after unilateral temporal- or frontal-lobe resection.

Downloaded from www.learnmem.org on January 26, 2006

Neuropsychologia **31:** 1–15.
Salmon, E., Van der Linden, M., Collette, F., Delfiore, G., Maquet, P., Degueldre, C., Luxen, A., and Franck, G. 1996. Regional brain activity during working memory tasks. *Brain* **119:** 1617–1625.
Scaccianoce, S., Del Bianco, P., Caricasole, A., Nicoletti, F., and Catalani, A. 2003. Relationship between learning, stress and hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* **121:** 825–828.
Schaaf, M.J., Workel, J.O., Lesscher, H.M., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., and de Kloet, E.R. 2001. Correlation between hippocampal BDNF mRNA expression and memory performance in senescent rats. *Brain Res*. **915:** 227–233.
Schaub, R.T., Anders, D., Golz, G., Gohringer, K., and Hellweg, R. 2002. Serum nerve growth factor concentration and its role in the preclinical stage of dementia. *Am. J. Psychiatry* **159:** 1227–1229.
Scott, S.A., Mufson, E.J., Weingartner, J.A., Skau, K.A., and Crutcher, K.A. 1995. Nerve growth factor in Alzheimer's disease: Increased levels throughout the brain coupled with declines in nucleus basalis. *J. Neurosci.* **15:** 6213–6221.
Siegel, G.J. and Chauhan, N.B. 2000. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **33:** 199–227.
Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K.H., Mistl, C., Rothacher, S., Ledermann, B., Burki, K., Frey, P., Paganetti, P.A., et al. 1997. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94:** 13287–13292.
Sugaya, K., Greene, R., Personett, D., Robbins, M., Kent, C., Bryan, D., Skiba, E., Gallagher, M., and McKinney, M. 1998. Septo-hippocampal cholinergic and neurotrophin markers in age-induced cognitive decline. *Neurobiol. Aging* **19:** 351–361.
Tolman, E.C. 1948. Cognitive maps in rats and men. *Psychol. Rev.* **55:** 189–208.
Tuszynski, M.H., Thal, L., Pay, M., Salmon, D.P., U., H.S., Bakay, R., Patel, P., Blesch, A., Vahlsing, H.L., Ho, G., et al. 2005. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat. Med.* **11:** 551–555.
Ueyama, T., Kawai, Y., Nemoto, K., Sekimoto, M., Tone, S., and Senba, E. 1997. Immobilization stress reduced the expression of neurotrophins and their receptors in the rat brain. *Neurosci. Res.* **28:** 103–110.
Van Dam, D., D'Hooge, R., Staufenbiel, M., Van Ginneken, C., Van Meir, F., and De Deyn, P.P. 2003. Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition. *Eur. J. Neurosci.* **17:** 388–396.
von Richthofen, S., Lang, U.E., and Hellweg, R. 2003. Effects of different kinds of acute stress on nerve growth factor content in rat brain. *Brain Res.* **987:** 207–213.
Westerman, M.A., Cooper-Blacketer, D., Mariash, A., Kotilinek, L., Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Carlson, G.A., Younkin, S.G., and Ashe, K.H. 2002. The relationship between Aβ and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **22:** 1858–1867.
Wood, E.R., Dudchenko, P.A., and Eichenbaum, H. 1999. The global record of memory in hippocampal neuronal activity. *Nature* **397:** 613–616.

Received June 2, 2005; accepted in revised form November 3, 2005.

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
Experimental Neurology xx (2006) xxx–xxx
Experimental Neurology
www.elsevier.com/locate/yexnr

The stamp of ancestry: Roots of behavioral and neuronal impairment in adulthood

Peter Lohmann [a], Christian Lange-Asschenfeldt [b,1], Roman Huber [b,1], Matthias W. Riepe [a,*]

[a] Department of Psychiatry, Mental Health and Old Age Psychiatry, Charité Medical University, Eschenallee 3, D-14050 Berlin, Germany
[b] Department of Neurology, University of Ulm, Steinhövelstrasse 1, 89075 Ulm, Germany

Received 29 November 2005; revised 12 January 2006; accepted 20 January 2006

Abstract

Exposure of pregnant animals to noxious conditions affects neuronal function in the offspring. However, exposure or treatment of the maternal animal during pregnancy affects both ancestor and offspring. In the present study, female CD-1 mice were repetitively treated with 3-nitropropionate (3-np), a selective inhibitor of succinic dehydrogenase, exclusively prior to mating. Clinically, mice appeared normal during treatment. Five days after cessation of treatment animals were mated with control male animals. At 4 months of age spatial learning, LTP, NADH autofluorescence, and hypoxic tolerance were alike in controls and the offspring of treated female ancestors. However, an additional metabolic challenge in the offspring unmasks impairment of spatial learning, diminution of long-term potentiation (LTP), an altered protein microenvironment of mitochondrial enzymes, and reduced hypoxic tolerance. We conclude that the exposure of maternal ancestors to subclinical repetitive impairment of oxidative phosphorylation fosters impairment of behavior and neuronal function in the adult offspring, becoming apparent only on additional challenge. This finding may ultimately help to understand the causes of neuronal impairment or even neuropsychiatric disease in old age.
© 2006 Published by Elsevier Inc.

Keywords: Aging; Learning; Maze; Neurotoxicology; Energy metabolism; LTP; Autofluorescence; Imprinting; Hypoxic tolerance

UNCORRECTED PROOF

Introduction

Tumor incidence and immune function on noxious exposure are observable over several generations (Beach et al., 1982; Chandra, 1975; Gorczynski and Steele, 1981; Hemsworth, 1991; Lundin et al., 1999). Moreover, alterations of the endocrine system may bear consequences for the next generation (van Assche and Aerts, 1985). Diseases of the maternal animal during pregnancy may impact the energy metabolism of subsequent generations via metabolic imprinting (Hales and Barker, 1992; Lumey and Stein, 1997a,b). Behavioral impairment on prenatal intrauterine damage sometimes is observed only in adult but not in juvenile animals (Janicke and Coper, 1994; Nyakas et al., 1994). Regarding the central nervous system it has been shown that exposure of pregnant animals to noxious conditions affects neuronal function in the offspring (Levitt et al., 1998; Stanwood and Levitt, 2004). It is unknown, however, whether treatment confined to an ancestor and remaining subclinical in the ancestor may affect the central nervous offspring, also. Moreover, it is unknown whether neuronal function and behavior are affected on treatment of the ancestor alone.

While clinically inapparent, repetitive mild inhibition of oxidative metabolism may be neuroprotective or induce neuronal dysfunction depending on the time interval between applications (Hellweg et al., 2003). It was the goal of the present study to investigate whether treatment with repetitive mild chemical inhibition of oxidative metabolism confined to the maternal ancestor affects the next generation.

Maze learning has been used to assess learning in experimental animals since the turn of the last century (Lashley and Franz, 1912). Several neuronal structures serve visuospatial cognition required to escape from an unknown

* Corresponding author. Fax: +49 30 8445 8255.
E-mail address: matthias.riepe@charite.de (M.W. Riepe).
[1] Fax: +49 731 500 26745.

0014-4886/$ - see front matter © 2006 Published by Elsevier Inc.
doi:10.1016/j.expneurol.2006.01.019

ARTICLE IN PRESS

maze. Animal research as well as study of patients with brain lesions and normal subjects have demonstrated the crucial role of the hippocampus and the hippocampal formation for the representation of space and navigation therein (Gron et al., 2000; Milner, 1965; Nunn et al., 1999; Pigott and Milner, 1993; Wood et al., 1999). We thus chose spatial orientation in a complex maze previously published (Hellweg et al., in press) as a readout. We also assessed long-term potentiation (LTP) in animals that had learned this complex maze. In addition, mitochondrial function was assessed in hippocampal slices with time-gated fluorescence spectroscopy. The ability to withstand a hypoxic episode in vitro was used to assess hypoxic tolerance.

Methods

Animals and treatment

23 5 months old female CD-1 mice were treated with nine i.p. injections of 3-nitropropianate (3-np; 20 mg/kg body weight) every other day similar to a previous report (Hellweg et al., 2003). Five days after the last treatment, female mice were mated with control male CD-1. The female animals were not synchronized according to the stage of their estrus cycle. Five females became pregnant which is within the expected range given an average length of 4 days of the estrus cycle in mice. The offspring of treated females (n = 29 males and n = 34 females) was raised under standard conditions to 4 months of age. For further experiments, only the male offspring was used. As control groups, we used offspring of untreated animals of the same batch of animals. Animals were pair housed in a cage under conditions of constant temperature (22 ± 2°C) and humidity (55 ± 5%), and kept on a 12-h light/dark cycle with water ad libitum available. In part, offspring was treated with 3-np in the same way as the maternal animals. For ease of terminology: offspring of untreated ancestors are denoted as F0 animals, offspring from female ancestors treated in vivo with repetitive inhibition of oxidative metabolism prior to conception mated with control male ancestors are denoted as F1 animals. The group of animals under investigation and their treatment is detailed in Fig. 1.

Behavioral testing

Spatial learning in the Morris water maze may not reflect cognitive function per se but may be confounded by anxiety of mice towards swimming. To avoid this, we assessed the learning of a complex maze that has been shown previously to be very sensitive to hippocampal impairment (Hellweg et al., in press).

The maze was made of grey rigid PVC and surrounded by a grey curtain with optical cues in four cardinal points. Mice had to perform the maze five times a day for 8 days and had 300 s to reach the goal zone where they were rewarded with a food pellet. Behavioral testing took place between 10:00 AM and 2:00 PM. The time animals needed to reach the goal zone was recorded by a tracking system (Multitrack, Accuscan, USA) (Fig. 2).

CORRECTED PROOF

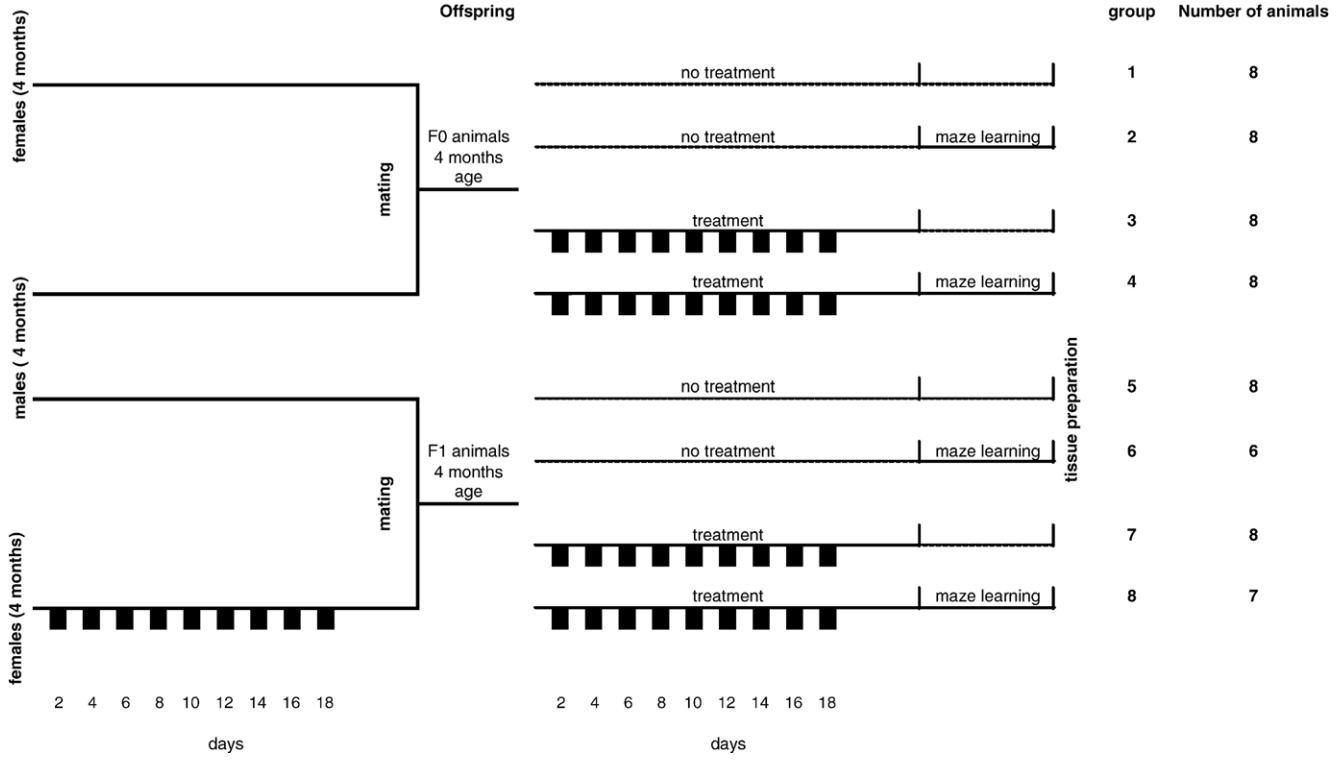

Fig. 1. Treatment for groups of animals investigated. F0 animals are the offspring of untreated control male and untreated control female animals. F1 animals are the offspring of untreated control male animals and female animals treated 9 times with 20 mg/kg body weight 3-nitropropionate (3-np) at 2 days interval prior to mating. F0 and F1 animals were investigated at 4 months of age. In part, F0 and F1 animals were additionally treated with 3-np as indicated.

ARTICLE IN PRESS

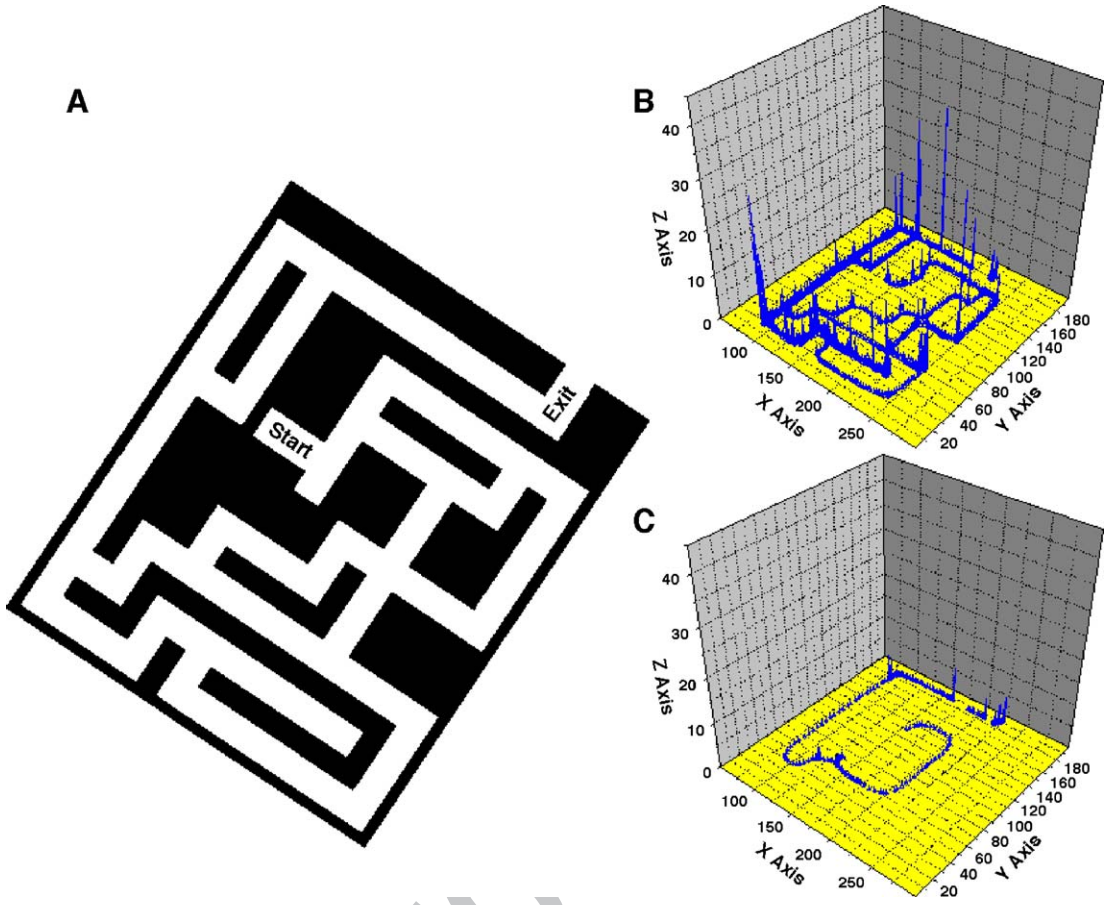

Fig. 2. The maze paradigm. (A) Aerial view on the maze. Animals were placed in the 'Start' position with a food reward deposited at the 'Exit' position. (B) Recording for a single animal at the first day of exposure to the maze. (C) Recording for a single animal at the last day of training demonstrating that a short way to the exit was learned. (*x* axis and *y* axis represent spatial coordinates, *z* axis represents number of observations).

UNCORRECTED

Slice preparation

Animals were killed by cervical dislocation similar to previous reports (Hellweg et al., 2003). The brains were rapidly removed and placed in ice cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mol/L) NaCl 126, KCl 5, KH_2PO_4 1.3, $MgSO_4$ 1.3, $CaCl_2$ 2.4, $NaHCO_3$ 26, and dextrose 10, bubbled with 95% O_2 and 5% CO_2. Hippocampal slices (300 μm thickness) were prepared along the long axis of the hippocampus using a Vibratome.

LTP

Slices were incubated in oxygenated ACSF at room temperature for at least 2 h for equilibration. Consecutively, they were transferred to a submerged recording chamber which was perfused with oxygenated ACSF at 6 mL/min through a peristaltic pump and maintained at 30 ± 1°C.

Recording microelectrodes (1–3 MΩ) electrodes were pulled from borosilicate glass using a Flaming/Brown electrode puller (Sutter Instruments, Novato, CA, USA), filled with (ACSF, see above) and placed in the stratum radiatum of the hippocampal region CA1. Extracellular recordings of field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were performed upon stimulation of the Schaffer collateral fiber pathway by a bipolar tungsten electrode located in the CA3 region (stimulus rate 0.05 Hz, duration 200 ìs; Grass S48 stimulator, Quincy, MA, USA). Signals were amplified, digitized (Digidata 1200, Axon Instruments, Union City, CA, USA) and visualized/stored using Axoscope 8.0 software (Axon Instruments). After stabilization of the fEPSP, the intensity of the standard test stimulus used throughout the whole experiment for a given slice was determined. An input/output (I/O) curve was generated by stimulating slices at a range of voltages starting at the threshold voltage (usually between 5 and 9 V in 0.5 V steps) until the voltage required to elicit the maximum response was reached. The standard test stimulus was adjusted so that approximately 50% of the maximum response was obtained (as determined by the initial downward slope of fEPSP). Following a baseline recording period of 10 min, LTP was induced by delivering a single train of high-frequency stimulation (HFS, 100 Hz, 1 s). fEPSPs were continuously evoked and recorded at 0.05 Hz for 60 min post-HFS. fEPSP slopes were measured offline as averages of five consecutive signals at 5 min (i.e., after effect stabilization), 30 min, and 60 min (end of recording) post-HFS, respectively. LTP was expressed as percentage of average baseline fEPSP slopes.

ARTICLE IN PRESS

Electrophysiological recordings

Recording of population spike amplitude was performed as described previously (Riepe et al., 1996, 1997). In brief, slices were transferred to a recording chamber after preincubation. The recording chamber was perfused with Ringer solution at 6 mL/min through a peristaltic pump. Slices with population spike amplitude less than 2 mV were not included in the analysis. Upon stabilization of population spike amplitude, Ringer solution made hypoxic by bubbling with 95% N_2 and 5% CO_2 (pO_2 in the recording chamber was below 10 kPa after 5 min of perfusion with hypoxic Ringer-solution; for detailed time course of pO_2 in the recording chamber see (Kasischke et al., 1996)), superfused the slices for 15 min. After 15 min of hypoxia, slices were superfused with oxygenated Ringer solution until the end of the experiment. Schaffer collaterals were synaptically activated at 0.1 Hz by bipolar electrodes placed in hippocampal region CA3. Population spikes were recorded in hippocampal region CA1 and analysis performed as described previously (Riepe et al., 1996, 1997).

Fluorescence spectroscopy of NADH

The NADH spectrum was measured as reported previously (Huber et al., 2000). In brief a pulsed nitrogen laser (IOM, λ-LF302, Berlin, Germany) with excitation wavelength λ_{exc} = 337 nm and 0.35 ns pulse duration was used to excite the NADH. Before each slice was measured the fluorescence was normalized in Ringer solution. At each location a minimum of 5 measurements was taken. Analysis of the spectra was performed as described previously (Huber et al., 2000). In brief, a Gaussian function was fitted to the

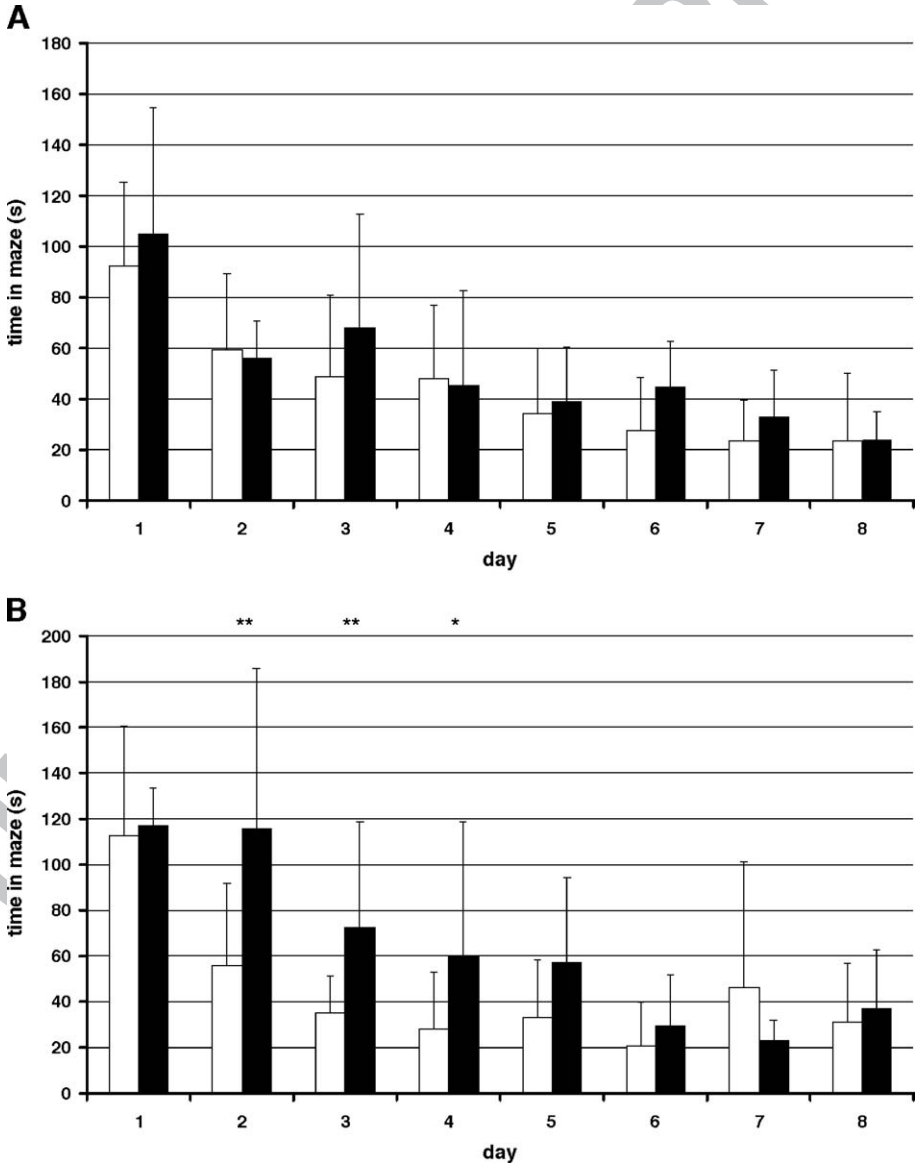

Fig. 3. Behavioral data. (A) Time to find the exit in the maze of Fig. 2 for F0 animals without further treatment (Fig. 1, group 2; white bars) and with treatment (Fig. 1, group 4; black bars). (B) Time to find the exit in the maze of Fig. 2 for F1 animals without further treatment (Fig. 1, group 6; white bars) and with treatment (Fig. 1, group 8; black bars). Values are given as mean ± standard deviation. For group codes see Fig. 1.

ARTICLE IN PRESS

experimental data. All results were expressed in arbitrary units (a.u.).

Statistical analysis

Group differences were assessed by ANOVA and Tukey post hoc comparisons. Values are given as means ± standard deviations. Statistical significance was accepted at $P < 0.05$.

Results

Spatial orientation

The time to escape from the maze decreases from 92.1 s ± 33.2 s (mean ± standard deviation) on the first day to 23.4 s ± 26.6 s on day 8 ($P < 0.003$) in untreated F0 animals (Fig. 1, group 1). On treatment of F0 animals with repetitive application of 3-NP (Fig. 1, group 3), the time to escape from the maze decreases from 112.9 s ± 47.9 s (n.s. to untreated F0 animals) to 31.1 s ± 25.6 s on day 8 ($P < 0.001$ to day 1; n.s. to day 8 of untreated F0 animals). At all days, average escape time is alike in untreated F0 animals and treated F0 animals (Fig. 3A). The time to escape from the maze decreases from 104.9 s ± 49.5 s on day 1 to 23.6 s ± 11.4 s on the eighths day ($P < 0.003$) in untreated F1 animals (Fig. 1, group 5; Fig. 3B) and is not different from untreated F0 animals at any day ($P > 0.05$). The time to escape from the maze in treated F1 animals (Fig. 1, group 7) decreased exponentially from 117.0 s ± 16.8 s on first day to 37.3 s ± 25.4 s on day 8 ($P < 0.001$; Fig. 3B). On the second day, treated F1 males need 115.6 s ± 70.3 s and treated F0 males need

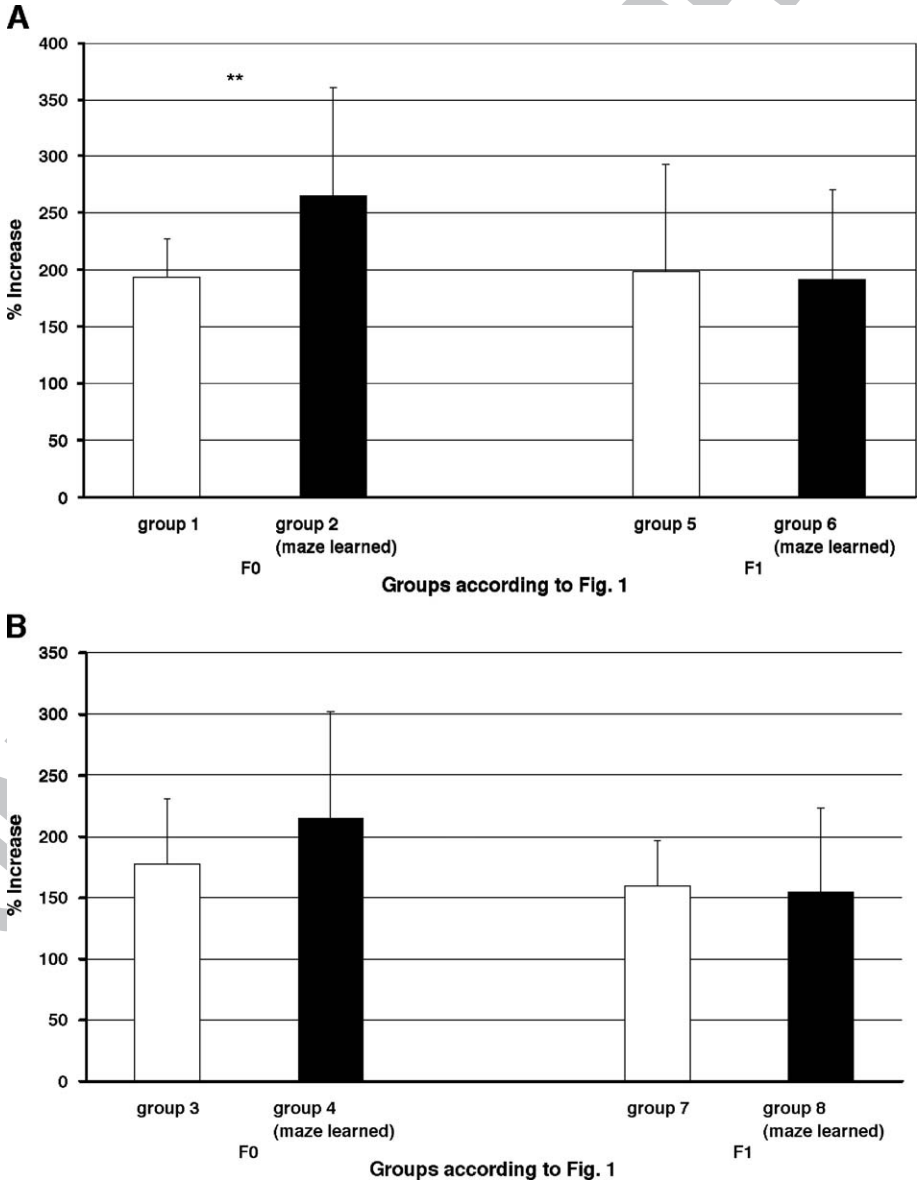

Fig. 4. LTP on maze learning. (A) LTP amplitude (as percent of onset) for untreated F0 animals (Fig. 1, groups 1 and 2) and untreated F1 animals (Fig. 1, groups 5 and 6). (B) LTP amplitude (as percent of onset) for treated F1 animals (Fig. 1, groups 3 and 4) and treated F1 animals (Fig. 1, groups 7 and 8). Values are given as mean ± standard deviation. For group codes see Fig. 1.

ARTICLE IN PRESS

Table 1
NADH autofluorescence

F0-animals	Untreated (group 1)		Treated (group 3)	
	Mean	SD	Mean	SD
Wavelength at onset of experiment	457.7	1.6	450.7	1.7
Untreated vs. treated		$P < 0.01$		
F1-animals	**Untreated (group 5)**		**Treated (group 7)**	
	Mean	SD	Mean	SD
Wavelength at onset of experiment	461.4	1.3	461.5	1.7
Untreated vs. treated		n.s.		
F0 untreated vs. F1 untreated	$P < 0.05$			
F0 treated vs. F1 treated			$P < 0.01$	

Wavelength of maximal NADH autofluorescence (nm).
For group codes, see Fig. 1.

55.8 s ± 36.1 s (F1 vs. F0 animals: $P < 0.05$) to find the exit. The time treated F1 animals need to reach the goal zone on the third day is also significant different to treated F0 males (72.5 s ± 46.1 s vs. 35.4 s ± 15.7 s, respectively; $P < 0.05$). From day 4 to day 8 there are no significant differences between both groups. Thus, offspring of maternal animals treated with repetitive mild inhibition of oxidative metabolism prior to conception shows deficits of visuospatial learning in adulthood.

Long-term potentiation

To further investigate underlying mechanisms, we investigated LTP in these animals (Fig. 4). Corresponding to the behavioral observations, LTP in animals that had learned of the maze distinguishes F0 and F1 animals (Fig. 4). At rest LTP is alike in F0 and F1 animals (Fig. 1, groups 2 and 6). However, the increase on training in the complex maze is significantly lower in the treated F1 animals (Fig. 1, group 8) than treated F0 animals (Fig. 1, group 6). In untreated F0 animals (Fig. 1, group 2) an increase from 193 ± 34% (mean ± standard deviation) to 266 ± 95% ($P < 0.05$) is observed and in F1 animals (Fig. 1, group 6) LTP amplitude remains alike at 198 ± 94% and 191 ± 80% (n.s.; $P < 0.05$ between F0 and F1 animals). Similarly, LTP in the trained group is larger in 3-np treated F0 animals (Fig. 1, group 4; 215 ± 87%) than in F1 animals (Fig. 1, group 8; 155 ± 69%; $P < 0.05$).

NADH autofluorescence

The behavioral data corroborated by the LTP data thus suggest that animals with a maternal ancestor that was exposed to repetitive inhibition of oxidative metabolism are more vulnerable against repetitive inhibition of oxidative metabolism themselves. To further assess biochemical surrogates we investigated NADH autofluorescence in these animals. In previous work, we had shown that a blue shift of the NADH spectrum is associated with an improved posthypoxic recovery (Huber et al., 2000). In this study we show that the microenvironment of NADH is different in F1 than F0 animals (Table 1). In untreated F0 animals (Fig. 1, group 1), the maximum of the NADH spectrum is 457.7 ± 1.6 nm while it is 461.4 ± 1.3 ($P < 0.05$) in untreated F1 animals (Fig. 1, group 5). On recovery from a 15-min hypoxic episode in vitro wavelength remains at control level for slices from F0 animals

UNCORRECTED PROOF

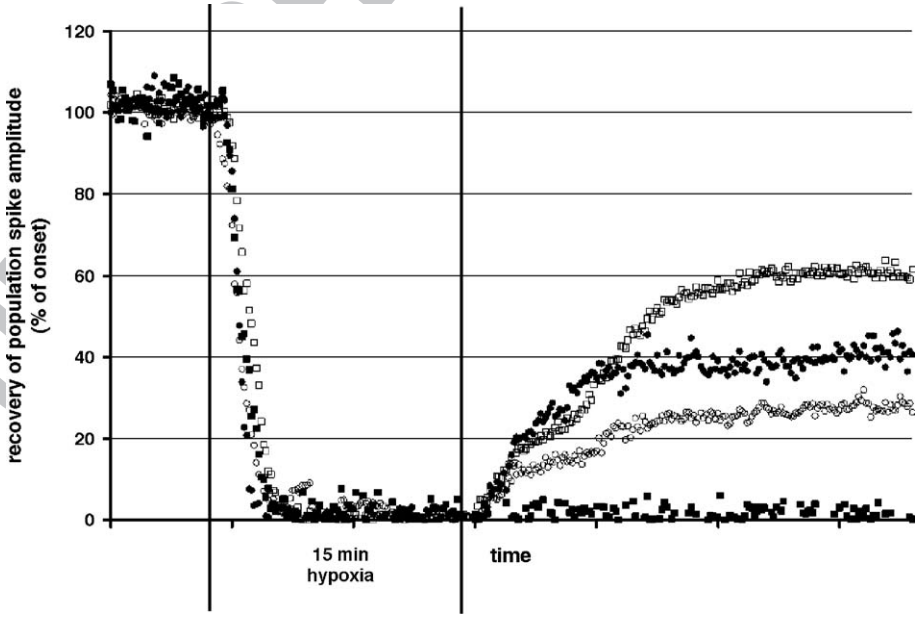

Fig. 5. Hypoxic tolerance assessed by population spike amplitude. Recovery of population spike amplitude (% of onset) in hippocampal region CA1 on stimulation of Schaffer collaterals in region CA3 on a 15-min hypoxic episode (Riepe et al., 1997). Slices from F0 animals (Fig. 1, group 1) without (empty circles) and with (empty squares) an additional single injection of 20 mg/kg body weight 1 h prior to slice preparation. Slices from F1 animals (Fig. 1, group 5) without (filled circles) and with (filled squares) an additional single injection of 20 mg/kg body weight 1 h prior to slice preparation. Values are given as means from 8 slices, standard deviations are given in the results section. For group codes see Fig. 1.

ARTICLE IN PRESS

(457.5 ± 1.8 nm) but is red-shifted 463.4 ± 1.3 nm ($P < 0.05$) in F1 animals. If F0 and F1 animals were additionally treated in vivo with 3-np a blue-shift was observed for slices from F0 animals (Fig. 1, group 3) but not for F1 animals (Fig. 1, group 7; $P < 0.01$; Table 1).

Hypoxic tolerance

We also analyzed the ability to withstand a 15-min hypoxic episode in vitro (Fig. 5). In F0 animals (Fig. 1, group 1), an increase or recovery of population spike amplitude was observed from 29 ± 36% to 60 ± 45% ($P < 0.05$). In F1 animals (Fig. 1, group 5) recovery decreased from 41 ± 49% to 1 ± 3% ($P < 0.05$).

Discussion

Taken together, repetitive inhibition of oxidative metabolism in maternal ancestors prior to conception results in changes in neuronal function and behavior in the adult offspring although treatment of the maternal ancestor cessated several days prior to mating with untreated male animals. Similar to a previous report (Hellweg et al., 2003) no abnormality was detected in the treated ancestors by clinical means.

Spatial orientation—behavior and electrophysiological correlates

F0 and F1 animals showed comparable task proficiency in a complex maze. However, an additional metabolic challenge caused an impairment of spatial orientation in F1 animals compared to F0 animals. This did not result from reduced activity in F1 animals on treatment as the initial exploration of the maze was alike in treated F0 and treated F1 animals. Nevertheless, the learning curve on subsequent days was significantly delayed for F1 animals.

As a correlate we found a diminution of LTP increase in animals that acquired the maze. Previous reports demonstrated that the behavioral performance in various kinds of mazes coincided with the LTP-amplitude (Kleschevnikov and Marchbanks, 1993; Richardson et al., 2002). Similarly, in the present study, the present impaired learning in F1 animals coincides with a reduced LTP-amplitude.

Hypoxic tolerance in offspring

NADH microenvironment and hypoxic tolerance were assessed in hippocampal slices, also. Similar to the behavioral results impairment in the group with treated ancestors became apparent only on additional metabolic challenge. The amplitude of the population spike reflecting posthypoxic integrity of the slice (Feig and Lipton, 1990) was alike in slices prepared from F0 and F1 animals. However, an additional mild hypoxic episode in vivo that induces preconditioning with increased hypoxic tolerance in controls (Riepe et al., 1997) fostered a significantly reduced hypoxic tolerance in slices prepared from F1 animals. The exact cellular mechanisms behind these changes need to further be scrutinized in the future. Several alternatives are possible. It has been shown that fingerprints of the microenvironment of enzymatic complexes persist even on change of the cellular environment (Lebreton and Gontero, 1999). One argument along these lines would be that the spectrum of NADH obtained by autofluorescence spectroscopy is different in the maternal and offspring generation in the present study. In accordance with previous studies where low recovery on in vitro hypoxia was associated with red-shifted maximum of the NADH autofluorescence and increase of hypoxic tolerance was associated with a blue shift of the NADH spectrum (Buchner et al., 2002; Huber et al., 2000) a similar pattern was found for NADH spectrum in slices from F1 animals (red-shifted, low hypoxic tolerance) compared to NADH spectrum in controls (blue-shifted, higher hypoxic tolerance).

At present, the molecular mechanisms remain cannot be answered on basis of the current experiments and need to be determined in future experiments. Speculatively, non-coding RNAs (Costa, 2005) or DNA methylation (Wilkins, 2005) contribute to the impairment of neuronal function and behavior observed in the offspring of treated maternal animals. Regardless of the mechanisms, the findings are relevant for the understanding of diseases still considered sporadic. Instead of assessing environmental factors at young or middle age of the affected subject, only, one also needs to deliberate exposure of the maternal generation to subclinical noxious conditions.

Summary

Subclinic hypoxic episodes in maternal ancestors prior to mating imprint neuronal function and behavior in the adult offspring. However, this impairment may only be observed on additional metabolic challenge of the offspring. In the future, this potentially may foster a better understanding of etiologies of neuronal impairment and disease in adulthood and age.

References

Beach, R.S., Gershwin, M.E., Hurley, L.S., 1982. Gestational zinc deprivation in mice: persistence of immunodeficiency for three generations. Science 218, 469–471.

Buchner, M., Huber, R., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Riepe, M., 2002. Impaired hypoxic tolerance and altered protein binding of NADH in presymptomatic APP23 transgenic mice. Neuroscience 114, 285–289.

Chandra, R.K., 1975. Antibody formation in first and second generation offspring of nutritionally deprived rats. Science 190, 289–290.

Costa, F.F., 2005. Non-coding RNAs: new players in eukaryotic biology. Gene 357, 83–94.

Feig, S., Lipton, P., 1990. *N*-methyl-D-aspartate receptor activation and Ca2+ account for poor pyramidal cell structure in hippocampal slices. J. Neurochem. 55, 473–483.

Gorczynski, R.M., Steele, E.J., 1981. Simultaneous yet independent inheritance of somatically acquired tolerance to two distinct H-2 antigenic haplotype determinants in mice. Nature 289, 678–681.

Gron, G., Wunderlich, A.P., Spitzer, M., Tomczak, R., Riepe, M.W., 2000. Brain activation during human navigation: gender-different neural networks as substrate of performance. Nat. Neurosci. 3, 404–408.

Hales, C.N., Barker, D.J., 1992. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Diabetologia 35, 595–601.

Hellweg, R., von Arnim, C.A.F., Büchner, M., Huber, R., Riepe, M.W., 2003.

UNCORRECTED PROOF

ARTICLE IN PRESS

Neuroprotection and neuronal dysfunction upon repetitive inhibition of oxidative phosphorylation. Exp. Neurol. 183, 346–354.

Hellweg, R., Lohmann, P., Huber, R., Kühl, A., Riepe, M.W., in press. Spatial navigation in complex and radial mazes in APP23 animals and neurotrophin signaling as a biological marker of early impairment. Learn. Mem.

Hemsworth, B.N., 1991. Embryopathic action of N-nitrosomethylurea in the pregnant mouse manifest for three generations. In Vivo 5, 407–411.

Huber, R., Buchner, M., Li, H., Schlieter, M., Speerfeld, A.D., Riepe, M.W., 2000. Protein binding of NADH on chemical preconditioning. J. Neurochem. 75, 329–335.

Janicke, B., Coper, H., 1994. The effects of prenatal exposure to hypoxia on the behavior of rats during their life span. Pharmacol. Biochem. Behav. 48, 863–873.

Kasischke, K., Ludolph, A.C., Riepe, M.W., 1996. NMDA-antagonists reverse increased hypoxic tolerance by preceding chemical hypoxia. Neurosci. Lett. 214, 175–178.

Kleschevnikov, A.M., Marchbanks, R.M., 1993. Behavioral parameters of the spatial memory correlate with the potentiation of the population spike, but not with the population excitatory postsynaptic potential, of the CA1 region in rat hippocampal slices. Neurosci. Lett. 152, 125–128.

Lashley, K.S., Franz, S.I., 1912. The effects of cerebral destruction upon habit-formation and retention in the albino rat. Psychobiology 1, 71–139.

Lebreton, S., Gontero, B., 1999. Memory and imprinting in multienzyme complexes. Evidence for information transfer from glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to phosphoribulokinase under reduced state in *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Biol. Chem. 274, 20879–20884.

Levitt, P., Reinoso, B., Jones, L., 1998. The critical impact of early cellular environment on neuronal development. Prev. Med. 27, 180–183.

Lumey, L.H., Stein, A.D., 1997a. In utero exposure to famine and subsequent fertility: The Dutch Famine Birth Cohort Study. Am. J. Public Health 87, 1962–1966.

Lumey, L.H., Stein, A.D., 1997b. Offspring birth weights after maternal intrauterine undernutrition: a comparison within sibships. Am. J. Epidemiol. 146, 810–819.

Lundin, B.S., Dahlman-Hoglund, A., Pettersson, I., Dahlgren, U.I., Hanson, L.A., Telemo, E., 1999. Antibodies given orally in the neonatal period can affect the immune response for two generations: evidence for active maternal influence on the newborn's immune system. Scand. J. Immunol. 50, 651–656.

Milner, B., 1965. Visually-guided maze learning in man: effects of bilateral hippocampal, bilateral frontal, and unilateral cerebral lesions. Neuropsychologia 3, 317–338.

Nunn, J.A., Graydon, F.J., Polkey, C.E., Morris, R.G., 1999. Differential spatial memory impairment after right temporal lobectomy demonstrated using temporal titration. Brain 122, 47–59.

Nyakas, C., Buwalda, B., Markel, E., Korte, S.M., Luiten, P.G., 1994. Life-spanning behavioural and adrenal dysfunction induced by prenatal hypoxia in the rat is prevented by the calcium antagonist nimodipine. Eur. J. Neurosci. 6.

Pigott, S., Milner, B., 1993. Memory for different aspects of complex visual scenes after unilateral temporal- or frontal-lobe resection. Neuropsychologia 31, 1–15.

Richardson, D.P., Byrnes, M.L., Brien, J.F., Reynolds, J.N., Dringenberg, H.C., 2002. Impaired acquisition in the water maze and hippocampal long-term potentiation after chronic prenatal ethanol exposure in the guinea-pig. Eur. J. Neurosci. 16, 1593–1598.

Riepe, M.W., Kasischke, K., Gericke, C.A., Lowe, A., Hellweg, R., 1996. Increase of hypoxic tolerance in rat hippocampal slices following 3-nitropropionic acid is not mediated by endogenous nerve growth factor. Neurosci. Lett. 211, 9–12.

Riepe, M.W., Esclaire, F., Kasischke, K., Schreiber, S., Nakase, H., Kempski, O., Ludolph, A.C., Dirnagl, U., Hugon, J., 1997. Increased hypoxic tolerance by chemical inhibition of oxidative phosphorylation: "chemical preconditioning". J. Cereb. Blood Flow Metab. 17, 257–264.

Stanwood, G.D., Levitt, P., 2004. Drug exposure early in life: functional repercussions of changing neuropharmacology during sensitive periods of brain development. Curr. Opin. Pharmacol. 4, 65–71.

van Assche, F.A., Aerts, L., 1985. Long-term effect of diabetes and pregnancy in the rat. Diabetes 34 (Suppl. 2), 116–118.

UNCORRECTED PROOF

* Manuscript

Spatial learning in a complex maze is accompanied by hippocampal synaptic depression

Christian Lange-Asschenfeldt[1]*, Peter Lohmann[2]*, Matthias W. Riepe[2]

[1]Department of Psychiatry and Psychotherapy, University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

[2]Department of Psychiatry and Psychotherapy, Charité Medical University, Berlin, Germany

* *contributed equally to the study*

Article Type: Brief Report

Corresponding author:
Prof. Matthias W. Riepe, MD
Department of Psychiatry, Mental Health and Old Age Psychiatry
Charité Medical University
Eschenallee 3
D-14050 Berlin
Germany
Phone: +49 30 8445 8253
Fax: +49 30 8445 8255
email: matthias.riepe@charite.de

Acknowledgement:
This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (M. W. R.).

ABSTRACT

Activity-dependent alteration in synaptic efficacy is referred to as synaptic plasticity and is the believed hallmark of any learning process. Here we employed a recently validated complex maze for spatial training and investigated the impact of repeated task exposure on basal synaptic transmission of the hippocampal Schaffer collateral-CA1 synaptic connection *in vitro*. In the present experiments, male CD-1 mice were trained in a complex maze for eight consecutive days five times a day. Subsequently, field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) recorded in the CA1 area following stimulation of the Schaffer collateral-commissural fiber pathway were analyzed in acute hippocampal slices. We found a marked decrease of the fEPSP response in trained compared to untrained animals. The findings provide evidence for a direct implication of homosynaptic hippocampal long-term depression in a spatial learning paradigm.

Keywords: Hippocampal slice; Synaptic plasticity; Maze training

It is generally accepted that activity-dependent changes of synaptic strength underpin learning and memory. Although no direct evidence exists to date, the ubiquitous phenomena of long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) remain the most extensively discussed models of this form of synaptic plasticity (Malenka & Bear, 2004; Lynch, 2004; Braunewell & Manahan-Vaughan, 2001). If electrically induced LTP and/or LTD emulate a physiological process during memory formation, a persistent enhancement or depression of basal transmission following a specific learning task could be predicted at corresponding synaptic sites, respectively. Previous *in vivo* and *in vitro* studies employing monosynaptic learning models such as fear conditioning in the rat amygdala (Rogan, Stäubli, & LeDoux, 1997; McKernan & Shinnick-Gallagher, 1997) and skill learning in the motor cortex (Hodgson, Standish, Boyd-Hodson, Henderson, & Racine, 2005; Rioult-Pedotti, Friedman, & Donoghue, 2000), among others, have shown learning-associated enhancement of basal synaptic transmission. A recent *in vivo* study investigating the effect of enriched environment exposure on CA1 synaptic transmission demonstrated a response potentiation at high stimulus intensities and a reduction at low stimulus intensities (Irvine & Abraham, 2005). Such functional alterations may be accompanied by morphological and biochemical changes (Kozorovitskiy, Gross, Kopil, Battaglia, McBreen, Stranahan, & Gould, 2005). Since numerous studies link the Schaffer collateral-CA1 (SC) synapse to spatial memory (e.g., Lee, Jerman, & Kesner, 2005) the goal of the present study was to determine whether extensive spatial training mediates persistent alteration of its basal synaptic transmission. For behavioral studies we employed our recently validated complex maze paradigm which we have shown to strongly require hippocampal integrity in mice (Hellweg, Lohmann, Huber, Kühl, & Riepe, 2006). We demonstrated in a previous fMRI study that a virtual maze with similar topology represented a predominantly hippocampal task also in humans (Grön, Wunderlich, Spitzer, Tomczak, & Riepe, 2000).

All procedures were conducted in accord with the German Law on the Protection of Animals, and were approved by the State Authority. Adult male CD-1 mice (aged 4 months) weighing 30–40 g were used. Animals were pair-housed in cages under controlled conditions of temperature (22 ± 2°C) and humidity (55 ± 5%), and were kept on a 12 h light/dark cycle, with water and food available *ad libitum*. Three days before testing animals of either group were food deprived to 90-85 % of their initial body weight.

A complex maze was designed and constructed of gray rigid PVC with a red route and was surrounded by a gray curtain with optical cues at four cardinal points. The maze contained a starting point, crossings, t-junctions, blind alleys, and a goal zone (Fig. 1A). Between experiments, the maze was cleaned to avoid odor cues. A subject was released from the start area and had a maximum of 300 s to reach the goal zone where it was rewarded with a food pellet. Time needed for completion and distance animals covered in the maze were recorded by a video tracking system (Multitrack, Accuscan, USA). Testing took place between 01:00 PM and 05:00 PM to minimize circadian influences. Control animals received comparable handling and non-effective pseudo-training to minimize exogenous confounding factors.

In vitro electrophysiology studies were conducted one day after the training schedule was completed to rule out effects that might just persist immediately after training. Animals were killed by cervical dislocation, and the brains were rapidly removed and placed in ice cold 95% O_2 and 5% CO_2 saturated artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (millimolar): NaCl 126, KCl 5, KH_2PO_4 1.3, $MgSO_4$ 1.3, $CaCl_2$ 2.4, $NaHCO_3$ 26, and dextrose 10. Brain slices (400 µm thickness) were prepared along the long axis of the hippocampus using a motorized Vibratome (Campden Instruments, Lafayette, IN, USA) and the hippocampus was dissected out. Hippocampal slices were incubated in oxygenated ACSF at room temperature for at least 2 h for equilibration. They were then transferred to a submerged recording

chamber which was continously perfused with oxygenated ACSF at 6 mL/min through a peristaltic pump and kept at 30 ± 1°C. Recording microelectrodes (1-3 MΩ) were pulled from borosilicate glass using a Flaming/Brown electrode puller (Sutter Instruments, Novato, CA, USA), filled with ACSF and placed in the stratum radiatum of the hippocampal region CA1. Extracellular recordings (Fig. 2A) of field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were performed upon stimulation of the Schaffer collateral-commissural fiber pathway by a bipolar tungsten electrode located in the CA3 region (stimulus rate 0.05 Hz, duration 0.2 s; Grass S48 stimulator, Quincy, MA, USA). Signals were amplified (DataQ Bioamplifier, Akron, OH, USA), digitized (Digidata 1200, Axon Instruments) and visualized/stored using Axoscope 8.0 software (Molecular Devices / Axon Instruments). After stabilisation of the fEPSP (and at least 20 min of recording), the intensity of the standard test stimulus used throughout the whole experiment for a given slice was determined. Input/output (I/O) curves were generated by stimulating slices at a range of currents starting at threshold until the stimulus intensity required to evoke the maximum response (as determined by the maximum downward fEPSP slope) was reached. The standard test stimulus was adjusted to elicit approximately 50% of the maximum response. Field EPSPs were evoked and recorded continously at 0.05 Hz for 10 minutes and averaged during off-line analysis. Slices with unstable baseline or fEPSP amplitudes < 0.5 mV were discarded. The experimenter was blind to the group assignment of the respective animal.

Slope averages in the analyzed slices of animals that underwent the complete training were compared to those of the control group using t-test after verification of a normal distribution and equality of variances of the data. Within the training group, the relationship between average distance the animal covered during maze testing and the time the respective animals spent in the maze was determined using Pearson's correlation coefficient. The level of significance was set at $p < 0.05$. Data are presented as mean ± SEM throughout the text and figures. SPSS 12.0 package for Windows was used for statistical analysis.

In line with our previous study (Hellweg et al., 2006), performance of animals markedly improved upon training in our novel complex maze paradigm. Repeated task exposure resulted in a significant decrease of the distance animals covered in order to complete the maze ("test distance") when observed over eight consecutive days (Fig. 1B). The learning curve demonstrates a 54 % overall decrease of the test distance after eight days of training with five training sessions a day. Absolute values were 1788.7 ± 103.7 cm at day 1 and 820.3 ± 49.3 cm at day 8 ($p < 0.0001$, $n = 6$; paired t-test). Test distances and times the respective animals needed for task completion (i.e., maze escape latency) showed a highly significant linear correlation ($r^2 = 0.95$, $p < 0.0001$, $n = 6$; Fig. 1C).

To examine whether extensive spatial training has a sustained effect on basal synaptic transmission at the hippocampal SC synapse we compared fEPSP slopes in slices of animals that underwent complete training in our model to those of untrained but otherwise equally handled animals. Mean fEPSP slopes were 0.26 ± 0.04 mV/ms (n = 6 animals, m = 13 slices) in the training group versus 0.44 ± 0.05mV/ms (n = 10 animals, m = 13 slices) in the control group ($p < 0.0001$; Fig 2B). Since recordings took place at least 24 h after completion, our results demonstrate that learning and practicing spatial performance in this maze is accompanied by a marked and persistent reduction of evoked potential size in region CA1 in the hippocampus of experimental animals.

Previous *in vitro* studies employing monosynaptic learning models have shown learning-associated enhancement of basal synaptic transmission, often referred to as behavioral LTP: For example, Rioult-Pedotti et al. (2000) found larger evoked potentials within horizontal intracortical connections of layers II/III of the contralateral relative to the ipsilateral motor cortex when rats received repeated forelimb skill training over several days. Hodgson et al. (2005) were able to reproduce this finding and extended it to the *in vivo* level in both acute and chronic preparations. McKernan and Shinnick-Gallagher (1997) reported a

long-lasting facilitation of excitatory postsynaptic currents in the amygdala in a rat model of fear conditioning. Other studies include comparable findings in the piriform cortex associated with olfactory learning (Lebel, Grossman, & Barkai, 2001) and in the lateral septum with contextual and auditory fear conditioning (Garcia & Jaffard, 1996). However, our finding suggests an LTD-like mechanism rather than increased synaptic strength induced in the hippocampal SC-CA1 connection as a result of spatial memory acquisition. LTD has long been viewed as the mere reversal of LTP and linked to the extinction or suppression of memory. Observations of Manahan-Vaughan and Braunewell (1999) of homosynaptic depression ensuing after intense novelty exposure in rats raised the possibility that LTD itself may function as a memory mechanism in certain systems (Bear, 1999). Likewise, our results offer a strong link between a learning phenomenon and hippocampal LTD. But how can LTD as a putative learning mechanism be reconciled with the classical view that memory formation is dependent upon the strengthening of key synaptic connections? By now, this can only be speculated. An explanation could be that LTD as a prerequisite of information storage may prime a given synapse in readiness for the expression of LTP, i.e. through lowering the threshold of and broadening the range for LTP-induced synaptic enhancement. It has to be considered, though, that our spatial task may trigger a complex functional reorganization of hippocampal and putatively extrahippocampal circuits. Simultaneous synaptic depression and facilitation may occur at different points of the specific neural circuitry involved. Thus, a shift of synaptic weights may emerge - with or without a net change of the entire circuit – which appears as mere synaptic depression through the keyhole of our SC synapse observation.

Taken together, we provide first evidence for a behavioral synaptic depression following extensive spatial training for which we employed a novel complex maze. The exact mechanisms of this learning-induced LTD remain to be determined. We will need to examine additional time points or training stages and the interplay of behavioral LTD and LTP in our learning paradigm.

References

Bear MF. (1999). Homosynaptic long-term depression: a mechanism for memory? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, *96*, 9457-9458.

Braunewell, K.H. & Manahan-Vaughan, D. (2001). Long-term depression: a cellular basis for learning? *Reviews in the Neurosciences*, *12*, 121-140.

Garcia, R. & Jaffard, R. (1996). Changes in synaptic excitability in the lateral septum associated with contextual and auditory fear conditioning in mice. *European Journal of Neuroscience*, *8*, 809-815.

Grön, G., Wunderlich, A.P., Spitzer, M., Tomczak, R., & Riepe, M.W. (2000). Brain activation during human navigation: gender-different neural networks as substrate of performance. *Nature Neuroscience*, *34*, 404-408.

Hellweg, R., Lohmann, P., Huber, R., Kühl, A., & Riepe, M.W. (2006). Spatial navigation in complex and radial mazes in APP23 animals and neurotrophin signaling as a biological marker of early impairment. *Learning and Memory*, in press.

Hodgson, R.A., Ji, Z., Standish, S., Boyd-Hodgson, T.E., Henderson, A.K., & Racine, R.J. (2005). Training-induced and electrically induced potentiation in the neocortex. *Neurobiology of Learning and Memory*, *83*, 22-32.

Irvine, G.I. & Abraham, W.C. (2005). Enriched environment exposure alters the input-output dynamics of synaptic transmission in area CA1 of freely moving rats. *Neuroscience Letters*, *391*, 32-7.

Kozorovitskiy, Y., Gross, C.G., Kopil, C., Battaglia, L., McBreen, M., Stranahan, A.M., & Gould, E. (2005). Experience induces structural and biochemical changes in the adult primate brain. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, *102*, 17478-17482.

Lebel, D., Grossman, Y., & Barkai, E. (2001). Olfactory learning modifies predisposition for long-term potentiation and long-term depression induction in the rat piriform (olfactory) cortex. *Cerebral Cortex*, *11*, 485-489.

Lee, I., Jerman, & T.S., Kesner, R.P. (2005). Disruption of delayed memory for a sequence of spatial locations following CA1- or CA3-lesions of the dorsal hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, *84*, 138-147.

Lynch, M.A. (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiology Reviews*, *84*, 87-136.

Manahan-Vaughan, D. & Braunewell, K.H. (1999). Novelty acquisition is associated with induction of hippocampal long-term depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, *96*, 8739-8744.

Malenka, R.C. & Bear, M.F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, *44*, 5-21.

McKernan, M.G. & Shinnick-Gallagher P. (1997). Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature*, *390*, 607-611.

Rioult-Pedotti, M.S., Friedman, D., & Donoghue, J.P. (2000). Learning-induced LTP in neocortex. *Science*, *290*, 533-536.

Rogan, M.T., Stäubli, U.V., & LeDoux, J.E. (1997). Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature*, *390*, 604-607.

Figure legends

Fig. 1. (A) Aerial view of the complex maze; * start area, # goal zone. (B) Learning curve showing increasing task proficiency as training progresses. Error bars indicate SEM. (C) Correlation of the distance mice covered in the maze until task completion at the last day of training (test distance) and time the respective animals needed to complete the task (test time).

Fig. 2. (A) Acute hippocampal slice and arrangement of stimulus and recording electrodes. Inset show a typical fEPSP. DG dentate gyrus, EC entorhinal cortex, ff fornix, mf mossy fibers, pp perforant path. (B) Field EPSP slope averages of untrained control (n = 10 animals, m = 13 slices) and trained group after day 8 (n = 6 animals, m = 13 slices). Error bars indicate SEM.

Figure
Click here to download high resolution image

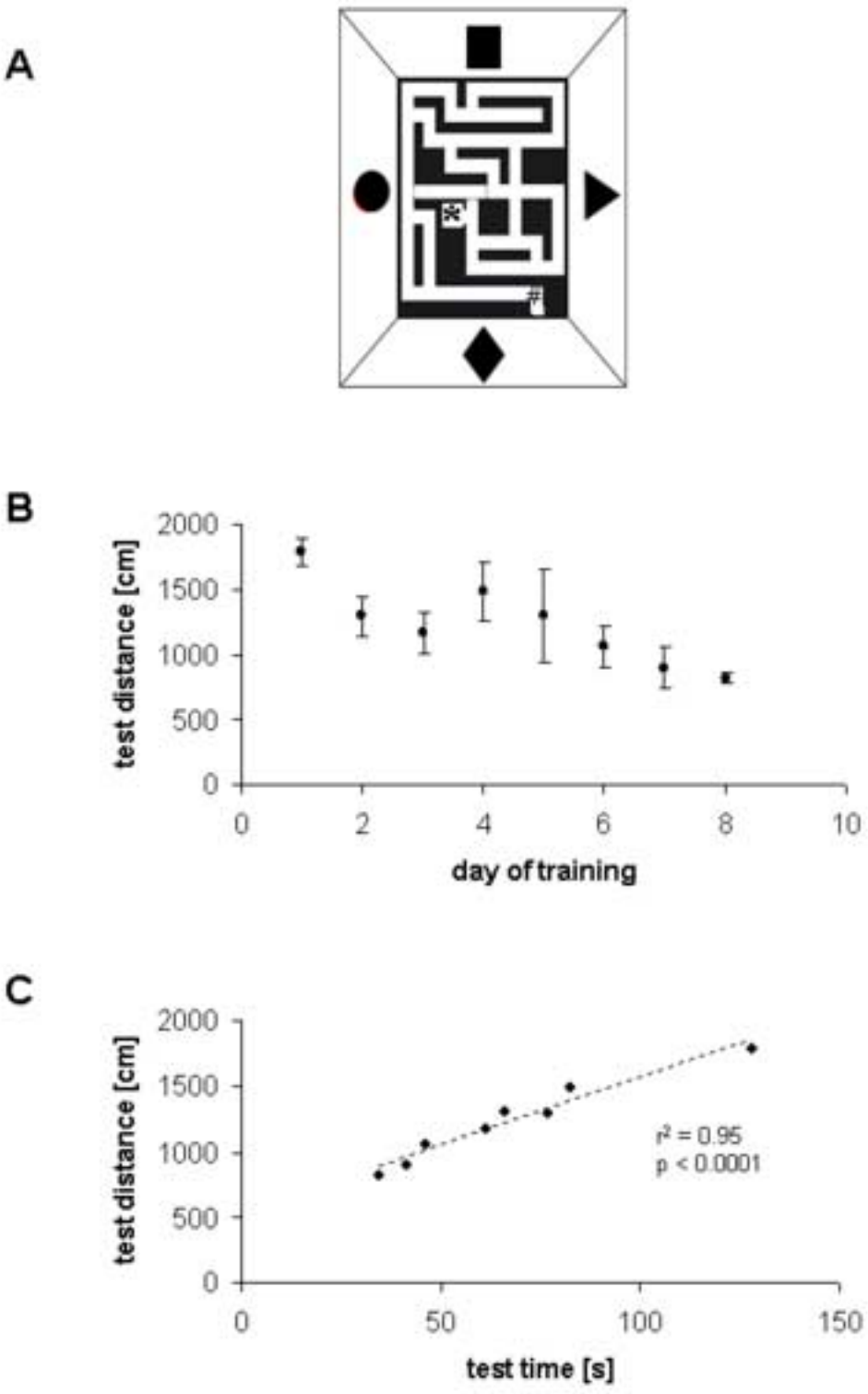

Fig. 1

Figure
Click here to download high resolution image

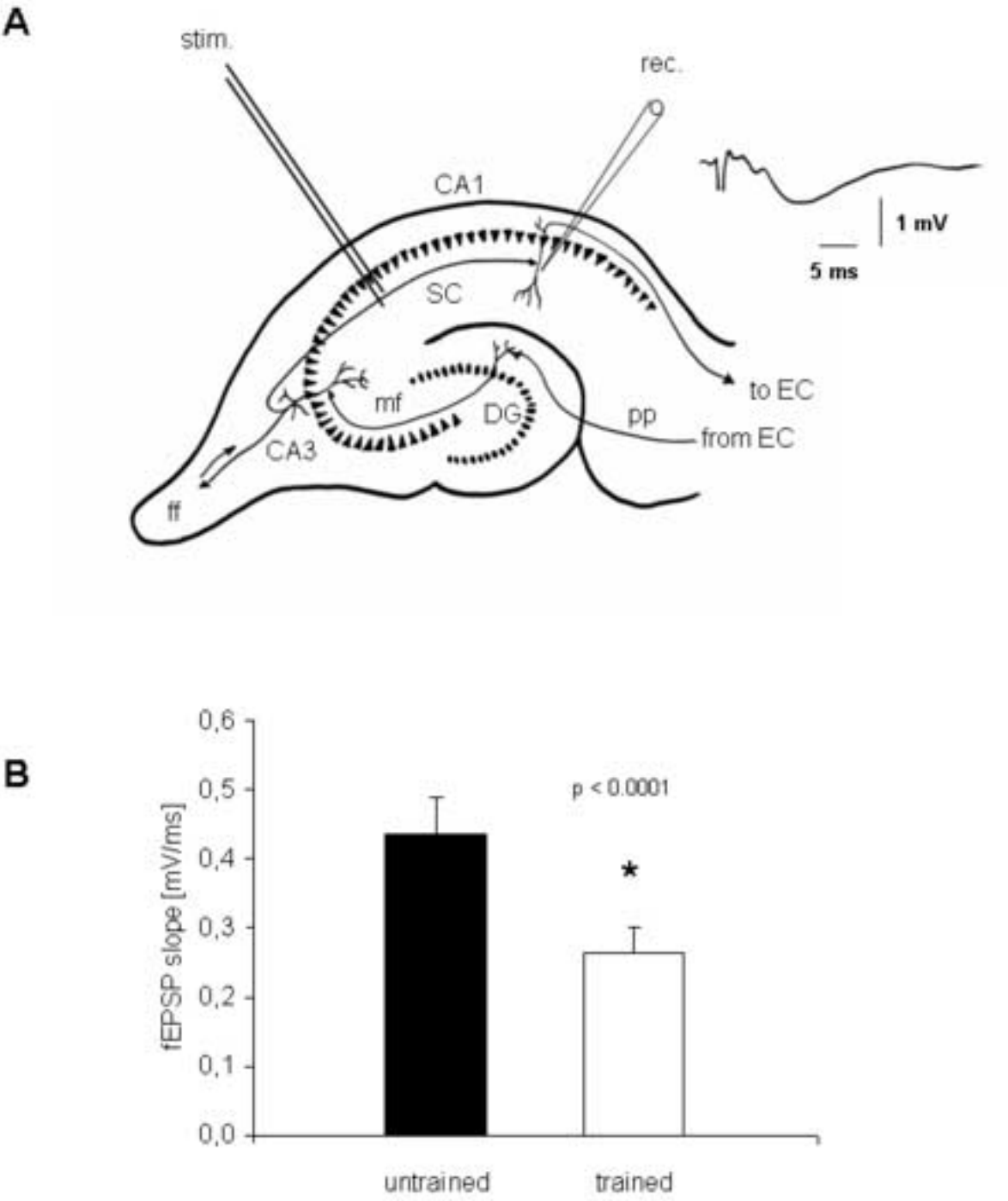

Fig. 2

Manuskriptstatus

Die eigenen Anteile und Anteile der Mitautoren aus den Kapiteln 3 bis 5 werden nachfolgend ausgewiesen.

Kapitel 3:

Hellweg, R. & Lohmann, P. et al. (2006) Spatial navigation in complex and radial mazes in APP23 animals and neurotrophin signaling as a biological marker of early impairment.
Learn. Mem. **13**: 63-71

Alle Labyrinthexperimente wurden von mir geplant, durchgeführt und ausgewertet. Ebenso habe ich die Korrelationsanalyse der Neurotrophine und Laufzeiten vorgenommen. Darüber hinaus habe ich das Manuskript zusammen mit Matthias Riepe, der die Idee zu dieser Arbeit hatte, verfasst. Die Arbeitsgruppe um Rainer Hellweg und Alexander Kühl der Abteilung Psychiatrie der Charité Berlin führten die gesamten ELISA-Untersuchungen der Neurotrophine durch und stellten diese in Tabellenform für die Korrelationsanalyse zur Verfügung. Rainer Hellweg verfasste zudem die Durchführung der ELISA-Untersuchungen im Kapitel Material und Methoden und war bei der Einleitung und Diskussion beteiligt. Roman Huber hat die Präparation der Gehirnareale der Mäuse durchgeführt.

Kapitel 4:

Lohmann, P. et al. (2006) The stamp of ancestry: Roots of behavioral and neuronal impairment in adulthood.
Exp. Neurol. 2006 in press.

In dieser Arbeit habe ich die gesamte Planung der Einzelexperimente, sämtliche Labyrinthversuche, große Teile der LTP-Experimente sowie alle Auswertungen durchgeführt. Darüber hinaus habe ich das Manuskript selbständig verfasst. Matthias Riepe leistete dabei unterstützende Hilfe und hatte die Idee für dieses Versuchsvorhaben. Christian Lange-Asschenfeldt hat einige LTP-Versuche übernommen. Roman Huber war für die Hypoxie- und Autofluoreszenz-Experimente verantwortlich.

Kapitel 5:

Lange-Asschenfeldt, C., Lohmann, P. & Riepe M.W. Spatial learning in a complex maze is accompanied by hippocampal synaptic depression.
Eingereicht am 05.01.2006 bei *Neurobiol. Learn. Mem.*

Bei dieser Arbeit war ich an der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente maßgeblich beteiligt. Die gesamten Labrinthversuche sowie Teile der LTP-Experimente wurden von mir durchgeführt. Christian Lange-Asschenfeldt hat den überwiegenden Anteil der elektrophysiologischen Arbeiten in dieser Studie durchgeführt. Gemeinsam mit ihm habe ich dieses Manuskript verfasst. Matthias Riepe hatte die Idee für dieses Versuchsvorhaben.

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Matthias W. Riepe, der diese Dissertation ins Leben gerufen und mir große wissenschaftliche Freiheiten bei der Durchführung der Arbeit gelassen hat.
Ein großer Dank geht an Prof. Dr. Günter Ehret für die Übernahme der Funktion als Erstgutachter. Er war mir eine sehr große Hilfe bei der Ausarbeitung dieser Dissertation.
Herrn PD. Dr. Wolfgang Weidemann danke ich für die Erstellung des zweiten Gutachtens.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Exp. Neurologie der Universität Ulm für die schöne Zeit am Eselsberg.

Ebenso geht ein herzliches Dankeschön an meine Freundin Daniela für ihr Korrekturlesen und dafür, daß sie das alles mitgemacht hat.

Ein letzter, sehr großer Dank gebührt meinen Eltern, die mir das Biologiestudium überhaupt ermöglicht und mich mein ganzes Leben lang unterstützt haben.

Lebenslauf

Name:	Peter Lohmann
Wohnort:	Berlin
Geburtstag:	22. April 1973
Geburtsort:	Gelsenkirchen
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Ausbildung:	1979 – 1983	Grundschule Gelsenkirchen-Horst
	1983 – 1985	Max-Planck Gymnasium Gelsenkirchen-Buer
	1985 – 1992	Salvatorkolleg Bad Wurzach
	1994 – 2001	Studium der Biologie, Universität Ulm
		Abschluss: Diplom
Promotion:	seit Mai 2002	Abteilung Exp. Neurologie, Universität Ulm
	Abschluss Sommer 2006	

Erklärung

Ich versichere hiermit, daß ich diese Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Berlin, den 10. April 2006