

“Differential metabolic recruitment of cognitive, emotional and modulatory brain regions in infant and adolescent rats undergoing two-way active avoidance training.”

„Differentielle metabolische Rekrutierung kognitiver, emotionaler und modulatorischer Hirngebiete in drei- und sechswöchigen Ratten während des aktiven Vermeidungslernens.“

Es ist bekannt, dass Ratten im Alter von drei Wochen nicht darauf trainiert werden können, einen bidirektionalen aktiven Vermeidungstest¹ erfolgreich zu durchlaufen. Trotz massiven Shuttle-Box-Trainings² von je 50 Durchläufen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen, können die Tiere den Fußschock³, der nach vorheriger Ankündigung mittels eines akustischen Signals⁴ über ein Bodengitter appliziert wird, nicht vermeiden. Die dreiwöchigen (,kindlichen') Ratten zeigen also eine sehr geringe Anzahl von Vermeidungsreaktionen⁵. Stattdessen fliehen sie, nachdem der aversive Stimulus appliziert wurde, in die benachbarte, die sichere Kammer⁶; d.h., sie zeigen größtenteils unkonditionierte Reaktionen.

Mit zunehmendem Alter verbessern sich die Ratten in dieser Aufgabe. So unterscheiden sich sechs Wochen alte (,adoleszente') Ratten in ihrer Verhaltensleistung bereits signifikant von den Dreiwöchigen; 12 Wochen alte (,erwachsene') Ratten lernen wiederum signifikant besser als Sechswöchige [1].

Warum sprechen wir nun bisher von „Verhaltensleistung“ und nicht von „Lernleistung“? Wenn die in der dritten Lebenswoche trainierten Tiere im Alter von 12 Wochen erneut im bidirektionalen aktiven Vermeidungstest trainiert werden, zeigen sie das geforderte Vermeidungsverhalten viel schneller als ihre nicht vortrainierten Wurfgeschwister. Sie scheinen also von während des frühen Trainings abgespeicherten Informationen zu profitieren. Demzufolge hatten sie als Dreiwöchige „etwas“ gelernt, was sie zwar damals noch nicht befähigte, ein entsprechendes Verhalten zu generieren, ihnen jedoch im Erwachsenenalter von Nutzen war [2].

Daraus ergibt sich nunmehr zwangsläufig die Frage, worin die hirnbioologischen Korrelate der unterschiedlichen Verhaltensleistung zwischen drei- und sechswöchigen Ratten bestehen.

¹ engl.: two-way active avoidance task

² Name der Versuchsanordnung

³ 600mA über eine max. Dauer von 15 sec; entspricht dem unkonditionierten Stimulus (unconditioned stimulus, US)

⁴ 2400 Hz, 80dB, setzt 5 secentspricht dem konditionierten Stimulus (conditioned stimulus, CS)

⁵ engl.: avoidance reactions; entspricht der konditionierten Reaktion (conditioned reaction, CR)

⁶ engl.: escape reactions; entspricht der unkonditionierten Reaktion (unconditioned reaction, UR)

Da man davon ausgeht, dass das Gehirn dreiwöchiger Ratten strukturell weitestgehend ausgereift ist, ergibt sich die Hypothese, dass Unterschiede in der funktionellen Rekrutierung verschiedener Hirngebiete und neuronaler Systeme für eine unterschiedliche Lern- und damit Verhaltensleistung verantwortlich zeichnen.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Studie die funktionelle Hirnaktivität zwischen dreiwöchigen und sechswöchigen Ratten verglichen. Dazu wurde ein bildgebendes Verfahren verwendet, das ausschließlich im Tierexperiment zur Anwendung kommt, die ^{14}C -2-Fluoro-Deoxyglukose⁷ (2-FDG)-Technik. Diese Methode erlaubt es, die Hirnaktivität im sich frei verhaltenden Tier zu untersuchen – eine Option, die am Menschen angewendete bildgebende Verfahren nicht bieten. Es kann mit der 2-FDG-Methode also genau ausgemacht werden, welche Hirngebiete *während* einer bestimmten, Lokomotion erfordernden Verhaltensaufgabe mehr oder weniger funktionell aktiv sind. Das gemessene Korrelat der funktionellen Aktivität ist die sogenannte metabolische Aktivität. 2-FDG verhält sich kompetitiv zur physiologisch im Gehirn vorkommenden Glukose und bindet daher ebenfalls an die entsprechenden zellulären Transporter und Enzyme. Das radioaktiv markierte Molekül bleibt jedoch nach der ersten Phosphorylierung durch das Enzym Hexokinase als ^{14}C -2-Fluoro-Deoxyglukose-6-Phosphat innerhalb der Zelle liegen und akkumuliert, da es – im Gegensatz zu physiologischer Glukose – nicht weiter verstoffwechselt werden kann. Das von der 2-FDG (und von 2-FDG-6-Phosphat) emittierte Signal ist β -Strahlung. Diese wird nach Beendigung des Verhaltensversuches in physikalischen, also „echten“ Hirnschnitten der Tiere densitometrisch gemessen und auf eine Referenzstruktur bezogen. Das resultierende Maß für die metabolische Hirnaktivität ist die relative optische Dichte (rOD). Diese rOD wird dann statistisch auf Vergleichsbedingungen (wie z.B. mehr oder weniger starkes bzw. kein Training) bezogen. Da das Gehirn eines jeden Tieres nur einmalig analysiert werden kann, müssen verschiedene Gruppen, sogenannte Verhaltensbedingungen, etabliert werden,

In der vorliegenden Arbeit wurden acht verschiedene Verhaltensbedingungen etabliert: (I) *infant acquisition*, (II) *infant novelty*, (III) *infant retrieval*, (IV) *infant familiarity*, (V) *adolescent acquisition*, (VI) *adolescent novelty*, (VII) *adolescent retrieval*, (VIII) *adolescent familiarity*. Die Bedingungen ergaben sich wie folgt: Die Ratten waren entweder drei Wochen (*infant*; P17-21)⁸ oder sechs Wochen alt (*adolescent*; P38-42) und wurden entweder einen Tag lang (*acquisition*) oder an fünf aufeinanderfolgenden Tagen (*retrieval*) trainiert. Die Anzahl der

⁷ radioaktiv markiertes Analogon der physiologischen Glukose

⁸ P = Postnataltag

Trainingsdurchläufe pro Tag betrug in jedem Fall 50. Des Weiteren wurden andere Tiere der Verhaltensapparatur zwar ausgesetzt, aber nicht im bidirektionalen aktiven Vermeidungstest trainiert. Das passierte – analog zu den Trainingszeiten – entweder an einem Tag für 40 min (*novelty*) oder an fünf aufeinander folgenden Tagen für jeweils 40 min (*familiarity*).

In insgesamt 67 von 72 Tieren, die auf die 2x4 Versuchsbedingungen verteilt waren (Wurfgeschwister immer in unterschiedlichen Gruppen), wurde die Hirnaktivität in jeweils 39 verschiedenen Hirnregionen gemessen werden. Diese Hirnregionen können entweder der limbischen Hirnrinde, der Hippokampusformation, der Amygdala, dem Striatum, dem Hypothalamus, dem Hirnstamm oder primären sensorischen/motorischen Gebieten zugeordnet werden. Die Gesamtzahl der in die statistische Auswertung eingeflossenen (von Hand durchgeführten) Messungen betrug 54820.

Hirnregionen, die in Assoziations-, Entscheidungs- und Belohnungsvorgänge, in die Verarbeitung von Emotionen sowie in die Generation von Verhalten involviert sind, sollten unterschiedliche funktionelle Aktivierungsmuster zwischen den Altersgruppen und Lernstadien zeigen. Im Gegensatz dazu sollten primär-sensorische und –motorische Gebiete sowie Hirnregionen, die in die Kodierung und Abspeicherung von Gedächtnisinhalten eingebunden sind, keine Aktivierungsunterschiede zeigen.

Zusammenfassend wurden folgende Ergebnisse gefunden: 1) Sechswöchige Ratten lernen signifikant besser als Dreiwöchige. 2) Einfache Gruppenvergleiche über alle acht Verhaltensbedingungen erbringen sehr ähnliche Muster bzgl. der Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der metabolischen Aktivität. D.h., dass die Hirnregionen in den dreiwöchigen Ratten generell – wenn auch nicht immer signifikant – niedriger aktiviert sind als die der Sechswöchigen. Nur wenige Regionen zeigen diesen Unterschied nicht (cingulärer Kortex, Nucleus accumbens, Nuclei dorsalis et medianus raphè). Die einzige Region in der das Gegenteil gefunden wurde ist die Area tegmentalis ventralis. Außer im Lateralen Septum [6] und im infralimbischen Kortex waren die metabolischen Aktivitäten während Akquisition und Retrieval fast immer identisch. 3) Im zweiten Schritt wurden alle erhobenen Meßdaten, i.e. rODs, gleichberechtigt betrachtet und als "Pool" einer Hauptkomponentenanalyse unterzogen. Es stellte sich heraus, dass insgesamt 27 Hirnregionen innerhalb drei verschiedener Hauptkomponenten (kognitiven/sensorisch-motorische, emotional-autonome und modulatorische Komponente) ca. 81% der Variabilität des Datenpools ausmachen. Die drei Hauptkomponenten wurden – entsprechend der gemeinsam „ladenden“ Regionen – als kognitiv/sensorisch-motorische, emotional-autonome

und modulatorische Komponenten bezeichnet. 4) Im letzten Schritt wurden die metabolischen Aktivitäten dieser 27 Hirnregionen korreliert und die funktionellen Konnektivitäts-Muster zwischen den acht Verhaltensbedingungen verglichen. Es zeigte sich, dass in diesem Vergleich insbesondere die emotional-autonomen Hirnregionen Unterschiede in ihrer funktionellen Konnektivität aufweisen. 5) Die Verhaltensdaten zeigten klare Unterschiede bzgl. der Korrelation mit der metabolischen Aktivität einzelner Hirnregionen. Dreiwöchige Ratten wiesen während ihrer Akquisitionsphase nur vereinzelte, nicht-konsistente Korrelationen auf. Im Gegensatz dazu war während der Akquisition bei den sechswöchigen Ratten die metabolische Aktivität der emotional-autonomen Hirnregionen signifikant positiv mit der Shock-Expositionszeit und mit der Anzahl der Fehler korreliert. Während der Retrievalphase waren v.a. die metabolischen Aktivitäten der kognitiven, sensorischen und motorischen Hirnregionen mit der Verhaltensleistung korreliert: in den dreiwöchigen Ratten zeigte sich eine besonders konsistente negative Korrelation von Aktivität und Shock-Expositionszeit sowie Anzahl der Fehler; in den sechswöchigen Tieren zeigte sich eine relativ konsistente positive Korrelation von Aktivität und Anzahl der Vermeidungsreaktionen.

Die erhobenen Daten erbringen damit Belege dafür, dass die Unreife des dopaminergen, meso-limbischen Systems eine Ursache für die Unfähigkeit der dreiwöchigen Ratten, einen bidirektionalen aktiven Vermeidungstest erfolgreich zu erlernen, sein könnte. Außerdem zeigen sie, dass die funktionelle Aktivität in den sechswöchigen Tieren die Akquisitions- und Abrufstadien des Trainings differentiell widerspiegelt. Im Gegensatz dazu spiegelt die Hirnaktivität in dreiwöchigen Ratten die lediglich die Verarbeitung des Fußschocks wider.

Die erhobenen Aktivitätsdaten legen im Zusammenhang mit den Verhaltensdaten und neuesten Erkenntnissen aus anderen Arbeitsgruppen [7] die Vermutung nahe, dass dreiwöchige Ratten während des bidirektionalen aktiven Vermeidungstraining die Stimuli (Fußschock und Ton) lediglich „un-assoziiert“ im Gedächtnis ablegen und möglicherweise Furcht vor der Verhaltensapparatur (Kontext) und der Verhaltensaufgabe (saliente Stimuli) erlernen.

Zitate:

- [1] Gruss M, Abraham A, Schable S, Becker S, Braun K. 2010. Cognitive experience during infancy and adolescence facilitates adult associative learning: critical impact of age, stimulus contingency and training intensity. *Neurobiol Learn Mem* **94**: 329-340.
- [2] Schäble S, Poeggel G, Braun K, Gruss M. 2007. Long-term consequences of early experience on adult avoidance learning in female rats: role of the dopaminergic system. [4](#)

- Neurobiol of Learn Mem* **87**: 109-122.
- [3] Gray JA, McNaughton N. 1983. Comparison between the behavioural effects of septal and hippocampal lesions: a review. *Neurosci Biobehav Rev* **7**: 119-188.
- [4] Fritts ME, Asbury ET, Horton JE, Isaac WL. 1998. Medial prefrontal lesion deficits involving or sparing the prelimbic area in the rat. *Physiol Behav* **64**: 373-380.
- [5] Lukoyanov NV, Lukoyanova EA. 2006. Retrosplenial cortex lesions impair acquisition of active avoidance while sparing fear-based emotional memory. *Behav Brain Res* **173**: 229-236.
- [6] Riedel A, Gruss M, Bock J, Braun K. 2010. Impaired active avoidance learning in infant rats appears to be related to insufficient metabolic recruitment of the lateral septum. *Neurobiol Learn Mem* **93**: 275-282.
- [7] Pattwell SS, Bath KG, Casey BJ, Ninan I, Lee FS. 2011. Selective early-acquired fear memories undergo temporary suppression during adolescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 1182-1187.