

Aus dem Institut für Anatomie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

*Effekte einer transienten, früh postnatalen Hyperthyreose auf Verhalten und die  
Expression der Neurotrophine der NGF-Familie im medialen Septum und Broca Band der  
Ratte*

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
Dr. med.  
(doctor medicinae)  
an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Daniele Camboni  
aus Damme  
Magdeburg 2004

---

---

## **Dokumentationsblatt**

### **Bibliographische Beschreibung:**

Camboni, Daniele;

*Effekte einer transienten, früh postnatalen Hyperthyreose auf Verhalten und die Expression der Neurotrophine der NGF-Familie im medialen Septum und Broca Band der Ratte.*

Jahr 2004; 59 Blatt; 29 Abbildungen; 2 Tabellen

### **Kurzreferat:**

In der Entwicklung und Reifung des Nervensystems und insbesondere des septo-hippocampalen Systems spielen eine Vielzahl von Faktoren eine Rolle. In diesem Zusammenhang scheinen Schilddrüsenhormone von besonderer Bedeutung zu sein. Perinatale Hypothyreose und Hyperthyreose führen zu charakteristischen morphologischen Veränderungen im Nervensystem, mit besonderen Änderungen im septo-hippocampalen System. Diese sind begleitet von Verhaltensänderungen emotionaler und kognitiver Art. Die Mediatoren der Schilddrüsenhormoneeffekte im Nervensystem sind relativ unbekannt. Es gibt Hinweise dafür, dass Neurotrophine der NGF-Familie Mediatoren der Schilddrüsenhormone sein könnten. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden in dieser vorliegenden Arbeit Wistar-Ratten bis maximal zum 12. postnatalen Tag einer Thyroxinbehandlung unterzogen. Im Alter von 10 Tagen und im adulten Alter von 13 bis 15 Wochen wurden immunhistochemische Methoden angewandt, um die Anzahl der Neurotrophin immunpositiven Zellen im medialen Septum und Broca Band zu quantifizieren. Darüber hinaus wurde kognitives Verhalten in Form von räumlichen Lernvermögen durch ein Radiallabyrinth und emotionales Verhalten in Form von Angst durch ein *Elevated Plus Maze* getestet. Abschließend wurde mit statistischen Mitteln Zusammenhänge zwischen der Morphologie in Form der Neurotrophin-Expression im medialen Septum und Broca Band und kognitivem wie emotionalem Verhalten untersucht.

---

	Seite
<b>Teil 1 Inhaltsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>Teil 2 Einleitung</b>	
2.1 Einführung und allgemeine Bemerkungen	3
2.2 Wachstumsfaktoren der NGF-Familie	4
2.3 Schilddrüsenhormone	6
2.4 Wechselwirkungen zwischen Wachstumsfaktoren der NGF-Familie- und Schilddrüsenhormonen	8
2.5 Einfluss von Schilddrüsenhormonen und Neurotrophinen auf Verhalten	11
2.6 Die Region des Septums	12
2.7 Fragestellungen dieser Arbeit	14
<b>Teil 3 Material und Methoden</b>	
3.1 Tiere und Hormonbehandlung	15
3.2 Verhaltensexperimente	15
3.2.1 Radiallabyrinth	16
3.2.2 Elevated Plus Maze	17
3.3 Gewebeverarbeitung	18
3.4 Immunhistochemie	19
3.5 Auszählung der Schnitte	20
3.6 Statistik	21
<b>Teil 4 Ergebnisse</b>	
4.1 Generelle Beobachtungen	22
4.2 Radiallabyrinth	22
4.3 Elevated Plus Maze	24
4.4 NGF	25
4.5 BDNF	25
4.6 NT-3	26
4.7 NT-4/5	27
4.8 Größe des medialen Septums und Broca Bandes	28

<b>4.9 Korrelationsanalyse</b>	<b>28</b>
<b>4.9.1 Korrelationen zwischen den neurotrophen Faktoren</b>	<b>28</b>
<b>4.9.2 Korrelationen zwischen den neurotrophen Faktoren und Verhalten</b>	<b>29</b>
<b>Teil 5 Diskussion</b>	
<b>5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>31</b>
<b>5.2 Verhalten</b>	<b>32</b>
<b>5.3 Neurotrophinsystem</b>	<b>36</b>
<b>Teil 6 Zusammenfassung</b>	<b>39</b>
<b>Teil 7 Literaturverzeichnis</b>	<b>40</b>
<b>Teil 8 Anhang</b>	
<b>8.1 Herstellung der Thyroxin-Lösung bzw. der Kontrolllösung</b>	<b>50</b>
<b>8.2 Formel zur Ermittlung der Neuronenzahl</b>	<b>50</b>
<b>8.3 Korrelationstabelle der Neurotrophine und der einzelnen Verhaltensparameter</b>	<b>50</b>
<b>8.4 Abbildungen der Nissl- und Immunfärbungen</b>	<b>51</b>
<b>8.5 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>54</b>
<b>8.6 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen</b>	<b>56</b>
<b>8.7 Darstellung des Bildungsweges</b>	<b>57</b>
<b>8.8 Wissenschaftliche Vorleistungen</b>	<b>58</b>
<b>8.9 Danksagungen</b>	<b>59</b>

## 2 Einleitung

---

### 2 Einleitung

#### 2.1 Einführung und allgemeine Bemerkungen

Die Entwicklung und Reifung des zentralen Nervensystems (ZNS) ist ein komplexer, in vielen Fragen noch unverstandener Prozess. Er unterliegt zahlreichen endogenen wie exogenen Einflussfaktoren. Unter den endogenen Faktoren spielen Hormone wie z.B. die Schilddrüsenhormone L-Thyroxin (T4) und Trijodthyronin (T3) eine wichtige Rolle (Pasquini und Adamo, 1994). Die Relevanz der Schilddrüsenhormone für die Entwicklung des ZNS zeigt sich beispielsweise darin, dass ein kongenitaler Mangel an Schilddrüsenhormonen - z.B. bedingt durch eine mangelnde Jodaufnahme während der Schwangerschaft - noch in der letzten Dekade zur weltweit häufigsten, vermeidbaren mentalen Retardierung führte (Hetzel, 2000).

Es werden eine Reihe morphologischer Alterationen im ZNS durch einen Mangel an Schilddrüsenhormonen verursacht. So zeigte sich in hypothyreot entwickelten Hirnen eine gestörte Myelinisierung, die Proliferation und die Migration der Zellen waren beeinträchtigt, genauso wie die Bildung der Synapsen in verschiedenen Hirnregionen (Rami et al., 1986; Rami und Rabie, 1990).

Anders sehen die Effekte im ZNS durch einen Überschuss an Schilddrüsenhormonen aus. Frühe postnatale Hyperthyreose veränderte die Morphologie des besonders in kognitiven Funktionen involvierten Hippocampus. So resultierte eine transiente Hyperthyreose in der CA3-Region des Hippocampus in einer erhöhten Dichte und in einem größeren Terminationsgebiet der infrapyramidalen Moosfasern (Lauder und Mugnaini, 1977; Lipp et al., 1988). Weiterhin zeigte sich, dass eine frühe postnatale, transitorische Hyperthyreose die Anzahl an cholinergen Zellen im medialen Septum erhöhte und damit auch die cholinerge Innervation des Hippocampus (Oh et al., 1991; Schwegler, 1995).

Die Mechanismen der Schilddrüsenhormonwirkung auf die Morphologie des ZNS sind weitgehend unklar. Mögliche Kandidaten der Hormonmediation könnten Wachstumsfaktoren der *Nerve Growth Factor*-(NGF) Familie sein. Man versteht darunter die Neurotrophine *Nerve Growth Factor* (NGF), *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3), Neurotrophin-4/5 (NT-4/5), Neurotrophin-6 (NT-6) und Neurotrophin-7 (NT-7). Diese Arbeit fokussiert sich auf die ersten vier Mitglieder der NGF-Familie, da NT-6 und NT-7 bisher nur in Fischen gefunden wurden (Gotz et al., 1994; Lai et al., 1998).

Der folgende Abschnitt 2.2 offeriert einen Überblick über das Neurotrophin-System der NGF-Familie.

### 2.2 Wachstumsfaktoren der NGF-Familie

In den frühen fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts beobachteten R. Levi-Montalcini, S. Cohen und V. Hamburger, dass ein am Rückenmark implantiertes Maus-Sarkom im sich entwickelnden Hühnerembryo im Ei einen löslichen Faktor sezernierte, der ein Wachstum von sympathischen Ganglien induzierte (Levi-Montalcini, 1952; Cohen et al., 1954). Dieser Faktor wurde wenig später als ein niedermolekulares Protein identifiziert und zunächst als Nervenwachstums stimulierender Faktor betitelt („*Nerve-Growth-Stimulating-Factor*“, Cohen und Levi-Montalcini, 1956). Heute wird dieser Wachstumsfaktor kürzer *Nerve Growth Factor* (NGF) genannt. Für diese Arbeiten und für die Entdeckung vom *Epidermis Growth Factor* (EGF) erhielt R. Levi-Montalcini und S. Cohen im Jahre 1986 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin. 1982 isolierte Barde et al. (1982) den *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) aus Schweinehirnen. Seit dem wurden vier weitere Mitglieder der NGF-Familie identifiziert, Neurotrophin-3 (NT-3), Neurotrophin-4 bzw. 5 (NT-4/5), Neurotrophin-6 (NT-6) und Neurotrophin-7 (NT-7) (Gotz et al., 1994; Lai et al., 1998). NT-4 wurde aus Fischen extrahiert und ist identisch mit dem NT-5 aus Säugetieren (Lindsay, 1994), daher wird dieses Neurotrophin üblicherweise als NT-4/5 bezeichnet (Ebendal et al. 1992).

Neurotrophine der NGF-Familie sind lösliche, niedermolekulare, basische Proteine mit großen Homologien in der Aminosäuresequenz. Sie bestehen aus 118 (NGF) bis 252 (BDNF) Aminosäuren und entstehen nach Prozessierung aus Prä-Pro-Proteinen (McDonald und Chao, 1995). Ihre biologischen Effekte sind die Steuerung der Entwicklung, Differenzierung, Proliferation und des Überlebens im peripheren als auch im zentralen Nervensystem (Snider, 1994; Lewin und Barde, 1996; McAllister, 2002). Ferner übernehmen sie auch Aufgaben in der synaptischen Plastizität, z.B. in der Gedächtnisbildung (Thoenen, 1995; Schuman, 1999). Sie sind ferner in der Lage, eine Apoptose zu induzieren (Friedman, 2000). Nach der klassischen Theorie wirken Neurotrophine als „*target derived factors*“. Demnach werden Neurotrophine in Zielgeweben in limitierter Menge synthetisiert und freigesetzt. Sie binden an ihre jeweiligen Rezeptoren und werden von Nerventerminalen internalisiert und retrograd zum Perikaryon transportiert (Levi-Montalcini, 1987; Hendry und Crouch, 1991; Tonra, 1999), wo sie ihre Effekte wie z.B. Anschaltung von verschiedenen Genen leisten (Morgan und Curran, 1986; Chen, 1991). Nach dieser Theorie steuern sie besonders in der Ontogenese das Überleben und Absterben der verschiedenen Nervenzell-Populationen. Am Beispiel von BDNF wurde gezeigt, dass Neurotrophine nicht nur retrograd, sondern auch anterograd transportiert werden (Conner et al., 1997; Altar et al., 1997). Ferner wurden im Hippocampus Neurone gefunden, welche sowohl die mRNA von BDNF und NT-3

## 2 Einleitung

---

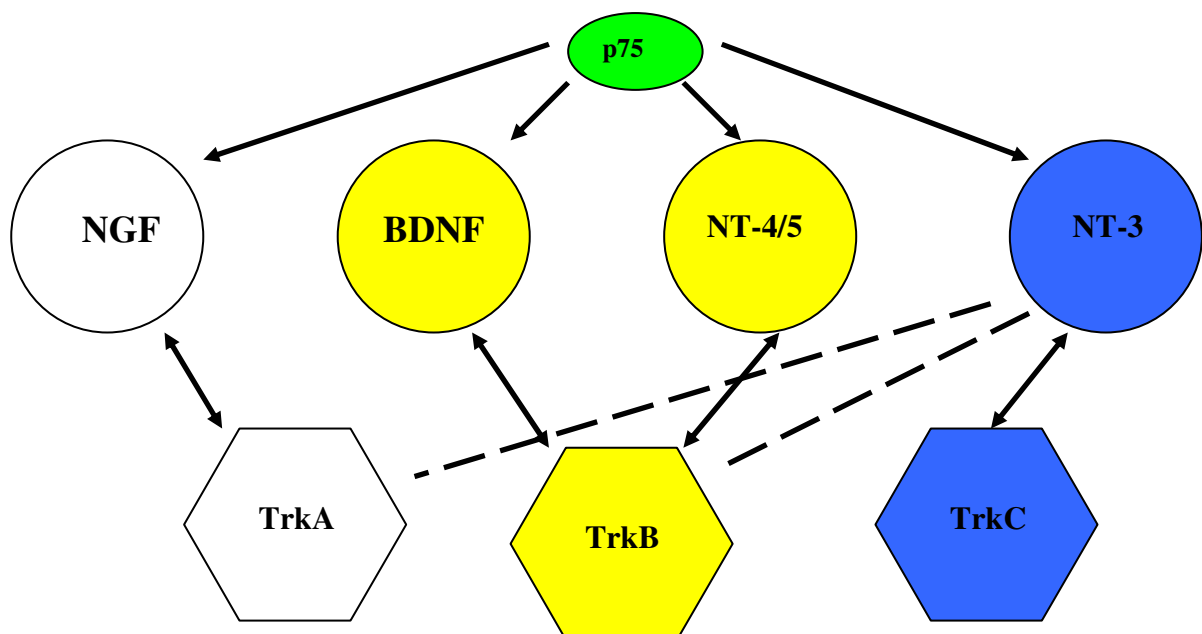
als auch die mRNA der zugehörigen Rezeptoren exprimieren, was eine autokrine und auch eine parakrine Wirkung impliziert (Phillips et al., 1990; Schecterson und Bothwell, 1992; Merlio et al., 1993; Acheson et al., 1995; Barbacid, 1995).

Die Neurotrophinrezeptoren werden in zwei Klassen differenziert. Diese zwei Klassen sind die hoch- und niedrigaffinen Rezeptoren.

Die hochaffinen Rezeptoren oder „*high affinity receptors*“ bestehen aus drei verwandten Transmembranrezeptoren, die jeweils über eine intrazelluläre Tyrosinkinase domäne verfügen. Diese Klasse trägt den Namen Tyrosin-Rezeptor-Kinase oder auch kurz Trk. Die Trk-Rezeptoren bilden eine Familie, welche aus drei Mitgliedern besteht: TrkA, TrkB und TrkC. Diese Trk-Rezeptoren zeigen eine deutliche Ligandenspezifität. So bindet NGF an TrkA, BDNF und NT-4/5 an TrkB und NT-3 an TrkC (Barbacid, 1994; Bothwell, 1995), wobei NT-3 neben TrkC auch die TrkA- und TrkB- Rezeptoren aktiviert (Eide et al., 1993; Ip et al., 1993; Thoenen, 1995) [siehe Abb. 2.2].

Neben diesen „*high affinity receptors*“ besteht ein „*low affinity receptor*“ p75, der über keine Kinasedomäne verfügt. Alle Neurotrophine der NGF-Familie binden mit gleich großer Affinität an p75. Er bewirkt die Internalisierung der Neurotrophine nach Bindung an die o.g. „*high affinity receptors*“. Weiterhin kommt es bei Koexpression von p75 und den Trk-Rezeptoren zu einer Affinitätssteigerung (Chao, 1994; Bothwell, 1995).

Die Bindung an den Trk-Rezeptor bewirkt eine schnelle Phosphorylierung des jeweiligen Rezeptors und von Signalmolekülen, wie Phospholipase C oder Phosphatidylinositol(PI)-3-Kinase, was zur Aktivierung von intrazellulären Signalmolekülen wie z.B. MAP-Kinasen führt (Huang und Reichardt, 2001).



## 2 Einleitung

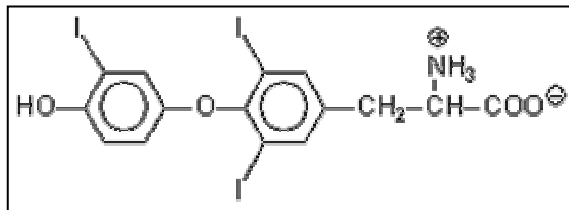
---

### Abb. 2.2 Neurotrophine der NGF-Familie und ihre Rezeptoren

Der „low affinity receptor“ p75 interagiert mit allen Neurotrophinen ( $\rightarrow$ ), die spezifischen Interaktionen der Neurotrophine mit ihren „high affinity receptors“ aus der Trk-Familie werden durch eine Linie mit Anzeigepfeilen auf beiden Seiten der Linie gekennzeichnet (z.B. interagiert NGF spezifisch mit dem TrkA-Rezeptor  $\leftrightarrow$ ). NT-3 interagiert mit TrkC spezifisch aber auch mit den anderen Mitgliedern der Trk-Familie (diskontinuierliche Linien  $- -$ ).

### 2.3 Schilddrüsenhormone

Die Schilddrüse produziert zwei Hormone, welche L-Thyroxin (T4) und zu einem niedrigeren Anteil Trijodthyronin (T3) sind. T4 und T3 bestehen aus zwei zusammengesetzten Tyrosin-Resten, die mit vier bzw. drei Jodmolekülen bestückt sind [siehe Abb. 2.3].



**Abb. 2.3** Biochemische Formel von 3'5'-Trijodthyronin (T3), aufgebaut aus den über eine Ätherbrücke verbundenen zwei Aminosäuren 3-Monojodtyrosin und 3,5-Dijodtyrosin.

Aus dem biologisch annähernd unwirksamen T4 wird durch Dejodasen T3 zu 80 % extrathyreoidal gebildet (Silva et al., 1984). T3 entfaltet seine Wirkung auf alle Körperzellen durch eine generelle Aktivierung des Stoffwechsels, was sich z.B. im Anstieg bzw. Abfall verschiedener Enzymaktivitäten der Proteinbiosynthese (Diez-Guerra et al., 1980; Rajan und Katyare, 1982; Ruiz-Marcos et al., 1983) oder in der Expression der mitochondrialen Atmungskettenenzyme äußert (Pillar und Seitz, 1997). Damit sind Schilddrüsenhormone wichtige Regulatoren der metabolischen Balance des Organismus (Utiger, 1991).

Ferner sind Schilddrüsenhormone wichtig für die Entwicklung und Reifung des gesamten Organismus (Delange, 1996), ganz besonders scheinen ihre Effekte aber im ZNS von Bedeutung zu sein. Ein kongenitaler Mangel an Schilddrüsenhormonen führt zum Krankheitsbild des Kretinismus (DeLong, 1996), welches mit mentaler Retardierung, Ataxie, Spastizität und Hördefiziten bzw. Taubheit einhergeht. Von besonderer Beachtung ist eine kritische Zeit von einigen Wochen unmittelbar postnatal. Beim Menschen sind dies einige Wochen postnatal (Klein et al., 1972; Klein et al., 2001) und bei der Ratte sind dies lediglich zwei Wochen (Cocks et al., 1969; Balazs et al., 1971), in der die Wirkung von Schilddrüsenhormonen essentiell für die Entwicklung des Organismus und ganz besonders für das ZNS ist. Aber auch der adulte Organismus und wiederum das ZNS ist vom



## 2 Einleitung

---

Vorhandensein und Wirkung der Schilddrüsenhormone abhängig. Ein Fehlen von Thyroxin und Trijodthyronin durch eine erworbene Unterfunktion der Schilddrüse, z.B. bedingt durch eine entzündliche Erkrankung der Schilddrüse mit autoaggressiven Antikörpern, kann unbehandelt zu charakteristischen psychiatrischen Phänomenen, wie Depression, kognitive Dysfunktion bis hin zur Demenz und in schweren Fällen zu psychotischen Symptomen führen (Treadway et al., 1967; Whybrow, 1994; Bauer und Whybrow, 2003).

T3 wird über einen aktiven Transport durch Zellmembranen transportiert (Chantoux et al., 1995; Oppenheimer und Schwartz, 1997), und es entfaltet seine Wirkung durch Bindung an spezifische nukleäre T3-Rezeptoren. Die T3-Rezeptoren haben strukturelle Verwandtschaft zum Vitamin D-, Prostaglandin- und Retinoid-Rezeptor und gehören der gleichen Superfamilie an (Evans, 1988; Ribeiro et al., 1995; Mangelsdorf und Evans, 1995).

Es werden zwei unterschiedliche T3-Rezeptoren unterschieden. Es sind dies die T3-Rezeptoren Alpha und Beta., welche durch alternatives Splicing in mehrere Isoformen prozessiert werden (Lazar, 1993).

Die Hauptfunktion üben die T3-Rezeptoren in der Regulierung von Genen als Transkriptionsfaktoren aus. Sie binden durch ihren Liganden aktiviert mit Hilfe verschiedener Cofaktoren an spezifische Hormon-antwortende-Elemente („*hormone response elements*“; HRE) der DNA-Sequenz und regulieren die Transkription ihrer Zielgene (Naar et al., 1991; Umesono et al., 1991; Schmutzler et al., 2002).

So wurde z.B. eine Rolle in der Regulierung von Glucosetransporter der Blut-Hirn-Schranke aufgezeigt (Mooradian, 1990), von Genen, welche Myelin assoziierte Proteine kodieren, wie das Myelin basische Protein (MBP) oder das Myelin assoziierte Glycoprotein (MAG) (Farsetti et al., 1991; Tasic et al., 1992; Pombo et al., 1999) und auch von Wachstumsfaktoren der NGF-Familie (Giordano et al., 1992; Alvarez-Dolado et al., 1994).

Die unterschiedlichen T3-Rezeptoren Alpha und Beta folgen einem zeitlichen und örtlichen Gradienten in der Entwicklung des ZNS. Im Hippocampus kann der Alpha-Rezeptor ab dem embryonalen Tag 13,5 beobachtet werden, die Expression des Beta-Rezeptors folgt 2 Tage später (Bradley et al., 1992). Mit dem Erscheinen der Beta-Rezeptoren um den embryonalen Tag 15 werden die ersten hippocampalen Neurone postmitotisch (Bayer, 1980; Amaral und Kurz, 1985). Die Expression der Neurotrophine im ZNS verläuft parallel zur Entwicklung der Schilddrüsenhormonrezeptoren. Ab dem embryonalen Tag 17 werden NGF, BDNF, NT-3 im Hippocampus exprimiert (Maisonpierre et al., 1990), NT 4 sogar ab dem embryonalen Tag 13 (Timmusk et al., 1993). Diese Parallelität in der Genexpression der Neurotrophine der NGF-Familie und der T3-Rezeptoren in der Neurogenese, Proliferation und Differenzierung von

## 2 Einleitung

---

Nervenzellen ist ein weiterer Hinweis dafür, dass Neurotrophine die potentiellen Mediatoren der Schilddrüsenhormoneffekte im septo-hippocampalen System sein könnten.

Der folgende Abschnitt 2.4 gibt Auskunft über bisher bekannte Wechselwirkungen zwischen dem hormonalen System der Schilddrüse und dem Neurotrophinsystem.

### 2.4 Wechselwirkungen zwischen Wachstumsfaktoren der NGF-Familie und Schilddrüsenhormonen

Wirkungen verschiedener Hormone auf das Neurotrophinsystem der NGF-Familie im ZNS sind bekannt. So reguliert Corticosteron z.B. im Hippocampus und im Gyrus dentatus dosisabhängig die Expression von BDNF-mRNA herunter und gegenläufig die mRNA des BDNF-Rezeptors TrkB herauf. Die mRNA von NT-3 und dessen Rezeptor TrkC blieben unbeeinflusst (Schaaf et al., 1997). Weiterhin wurde mit Hilfe einer *in-situ-Hybridisierung* gezeigt, dass Glucorticoid- und auch Mineralcorticoid-Rezeptoren die Gene von BDNF und auch zu einem geringeren Umfang NT-3 im Hippocampus, Gyrus dentatus und Neocortex in spezifischer Art und Weise regulieren (Hansson et al., 2000). Auch verstärkten gonadale Hormone wie Östrogen und Progesteron die Expression von BDNF-mRNA und TrkA-mRNA im medialen Septum und Hippocampus (Gibbs, 1998).

Neben diesen gezeigten Effekten durch Steroid- und Sexualhormone auf die Neurotrophine der NGF-Familie wurden auch Effekte durch Schilddrüsenhormone nachgewiesen. So erhöhte eine Administration von Thyroxin den Gehalt an NGF im Cortex (Walker et al., 1981). Ein weiterer Hinweis für einen potentiellen Zusammenhang zwischen Schilddrüsenhormonen und Neurotrophinen bestätigte sich auch in einer verstärkten NGF- und NT-3-mRNA Expression in verschiedenen Hirnregionen nach Gaben von Thyroxin. Diese Beobachtungen ließen sich auch im Hippocampus und Septum feststellen (Giordano et al., 1992; Hashimoto et al., 1994). Im cholinergen septo-hippocampalen System führte eine transiente Hyperthyreose zu einer Zunahme des p75-Rezeptors (Oh et al., 1991). Dieser niedrig affine Neurotrophinrezeptor ist in der Lage, alle Mitglieder der NGF-Familie zu binden, und er kann damit auf Grund des allgemeinen Zusammenhanges Rezeptor–Ligand als ein Hinweis auf den Neurotrophingehalt gelten. Interessanter Weise fand man auch in adulten hypothyreoten Ratten eine Hochregulation der NGF- und p75-mRNA im basalen Vorderhirn (Alvarez-Dolado et al., 1994; Calza et al., 1997).

Neurotrophine der NGF-Familie kommen auch deshalb als mögliche Kandidaten der Schilddrüsenhormon-Mediation in Frage, da sie bedeutende Elemente der Steuerung in der

## 2 Einleitung

---

Entwicklung, Differenzierung, Reifung und Überleben des ZNS spielen (Lewin und Barde, 1996). Im septo-hippocampalen System übernehmen die Neurotrophine der NGF-Familie eine bedeutende Rolle. So wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen, dass Neurotrophine der NGF-Familie sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene im septo-hippocampalen System in großen Mengen exprimiert werden (Ceccatelli et al., 1991; Schmidt-Kastner et al., 1996; Friedman et al., 1998). Ähnliches gilt auch für ihre Rezeptoren aus der Trk-Familie. Alle drei Typen der Trk-Rezeptoren werden auf septalen Neuronen gefunden (Altar et al., 1994; Barbacid, 1994), wobei insbesondere der NGF bindende TrkA-Rezeptor auf cholinergen Zellen beobachtet wurde. Das Gleiche gilt für den p75-Rezeptor (Holtzman et al., 1995). Der Hauptproduktionsort von Neurotrophinen im septo-hippocampalen System ist der Hippocampus (Ernfors et al., 1990; Rocamora et al., 1996). Gliale Zellen scheinen ebenso wie Neurone an der Produktion von Neurotrophinen beteiligt zu sein (Moretto et al., 1994). Die im Hippocampus synthetisierten Neurotrophine werden dann über ihre Rezeptorsysteme internalisiert und axonal in verschiedene Hirnregionen transportiert. Insbesondere gelangen sie auch in das mediale Septum und in das Broca Band (Schwab et al., 1979; Kramer et al., 1999). Das mediale Septum und das Broca Band verfügen ferner über weitere Neurotrophinquellen, wie z.B. den Cortex und über eine Eigenproduktion von Neurotrophinen (Saporito und Carswell, 1995). Dieses zeigte sich ebenfalls am Überleben cholinergischer Neurone in septalen organotypischen Kulturen (Gähwiler et al., 1991; Heimrich und Frotscher, 1993) und auch in Einzelzellkulturen (Hartikka und Hefti, 1988). Trotzdem scheint die hippocampale Quelle von Neurotrophinen für das mediale Septum und das Broca Band, eine immense Bedeutung zu haben. Dieses spiegelt sich in hippocampalen Läsionsstudien wieder. Diese Studien haben gezeigt, dass eine Deprivation des Septums von seinem Zielgebiet durch eine Axotomie des Fimbria-Fornix Bündels, welches eine der Hauptbahnen zwischen Hippocampus und Septum darstellt, zu einer starken Schrumpfung und zu einer Einstellung der Cholinacetyltransferase-Produktion in cholinergen Neuronen im medialen Septum und Broca Band führt. Dieses zeigte sich anhand einer Abnahme der Markersubstanzen cholinergischer Zellen wie Cholinacetyltransferase (ChAT) und Acetylcholinesterase (AChE), beides wichtige Enzyme des Acetylcholin-Stoffwechsels (Montero und Hefti, 1988; O'Brien et al., 1990; Tuszynski et al., 1990a). Dabei ist zu beachten, dass ein Großteil der Neurone erhalten bleibt (Naumann et al., 1997). Injektionen von NGF und auch zu einem geringeren Umfang BDNF in die Hirnventrikel hemmten die Reduktion der Marker cholinergischer Zellen ChAT und AChE nach Hippocampusläsionen (Tuszynski et al., 1990b; Burke et al., 1994). Das Septum besteht neben cholinergen Zellen zu

## 2 Einleitung

---

einem geringeren Anteil aus GABAergen Zellen. Auch GABAerge Zellen scheinen eine Abhängigkeit vom Zielgebiet Hippocampus und damit unter anderem auch von der Versorgung von Neurotrophinen zu haben (Plaschke et al., 1997).

Ein weiterer Grund für die Annahme, dass Neurotrophine der NGF-Familie Mediatoren der Schilddrüsenhormone sein könnten, zeigten Studien auf mRNA-Ebene mit Hilfe der Reversen Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR). Eine frühe bis maximal zwölf-tägige postnatale Thyroxinbehandlung führte zu einer Hochregulation von BDNF- und auch NT-3-mRNA im Hippocampus sowie NT-3-mRNA im Septum über den gesamten Beobachtungszeitraum von postnatalem Tag 2 bis 21 betrachtet (Lüesse et al., 1998). Dabei zeigten sich ganz besonders deutliche Effekte an den postnatalen Tagen 9 bis 12. Die Effekte der transienten Thyroxinbehandlung waren weniger deutlich auf Rezeptor-Ebene zu verzeichnen. Hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Hormon- und den Kontrolltieren. Jedoch zeigten sich auch auf Rezeptor-Ebene Unterschiede zwischen den hormonbehandelten- und den Kontrolltieren in der TrkB und TrkC Expression im septo-hippocampalen System am postnatalen Tag 10 (Roskoden et al., 1999).

Eine Proteinbestimmung im medialen Septum und im Broca Band mit Hilfe der ELISA-Technik nach einer früh postnatalen Hyperthyreose ging mit der mRNA-Analyse teilweise konform. Eine bis maximal zwölf-tägige Thyroxinbehandlung zeigte über den gesamten Beobachtungszeitraum vom postnatalem Tag 2 bis 18 keine Unterschiede zwischen den Thyroxin- und den Kontrolltieren, jedoch wurden markante Unterschiede zwischen beiden Gruppen mit einer höheren Proteinmenge in der Thyroxingruppe um den 10. postnatalen Tag detektiert (bisher unveröffentlicht).

Diese Studien beleuchteten die ersten postnatalen Wochen der Ontogenese, welche einen wichtigen Zeitraum in der Entwicklung des septo-hippocampalen Systems darstellen. In dieser Zeit bilden die Projektionsbahnen, wie die hippocampalen Moosfasern oder die cholinergen septo-hippocampalen Fasern, ihre Vernetzungsmuster aus (Zimmer und Haug, 1978; Milner et al., 1983; Amaral und Kurz, 1985; Armstrong et al., 1987; Linke und Frotscher, 1993). Dieser Zeitraum scheint vulnerabel für Einflüsse wie Mangel oder Überschuss an Schilddrüsenhormonen zu sein. So äußern sich, wie oben im Detail geschildert, Einflüsse wie eine frühe postnatale Hyperthyreose in morphologischen Alterationen, z.B. im Anstieg der Anzahl an cholinergen Zellen im medialen Septum und Broca Band und damit der cholinergen Innervation des Hippocampus (Oh et al., 1991; Schwegler, 1995). Auf mRNA- und auch auf Protein-Ebene liegen Hinweise für eine Mediation der Thyroxineffekte im septo-hippocampalen System durch Neurotrophine der

## 2 Einleitung

---

NGF-Familie oder ihrer Rezeptoren vor. Unklar bleibt aber die Frage, ob die Thyroxin induzierte Verstärkung der mRNA- und Protein Expression verschiedener Neurotrophine im septo-hippocampalen System in einer veränderten Anzahl an Neurotrophin enthaltenen Neuronen resultiert.

### 2.5 Einfluss von Schilddrüsenhormonen und Neurotrophinen auf Verhalten

Die durch eine transiente Thyroxinbehandlung verursachten Alterationen der Morphologie im ZNS und ganz speziell im cholinergen septo-hippocampalen System sind interessanter Weise begleitet von charakteristischen kognitiven wie emotionalen Verhaltensänderungen. Das cholinerge septo-hippocampale System ist besonders in kognitiven Funktionen involviert (Zola-Morgan et al., 1995), was sich z.B. darin verdeutlicht, dass ein Mangel an cholinergem Innervation des Hippocampus und des Cortex eine potentielle pathophysiologische Erklärung der senilen Demenz vom Alzheimer-Typ darstellt (Coyle et al., 1983; Bartus, 2000).

Es gibt eine Reihe von Verhaltensexperimenten zur Testung von kognitiven Funktionen von Versuchstieren, wie z.B. das Radiallabyrinth oder das Shuttlebox-Lernen.

Das Radiallabyrinth ist eine Versuchsapparatur zur Testung von räumlichen Lernprozessen, welche allgemein als septo-hippocampal abhängiges Verhalten angesehen werden. Das Shuttle-Box-Lernen wird auch Zweiweg-Vermeidungslernen genannt. Mit diesem Verfahren wird ein komplexes Lernverhalten getestet, das neben kognitiven Fähigkeiten auch von emotionalen Faktoren und lokomotorischer Aktivität unter Stresssituation abhängig ist. Es werden Lernprozesse getestet, welche einerseits über eine septo-hippocampale Komponente und andererseits eine emotionale Komponente aus der Amygdala verfügen.

Eine frühe postnatale transiente Hyperthyreose führte bei Anwendung dieser beiden oben beschriebenen Verhaltenstests zu einer verbesserten Leistung des Arbeitsgedächtnisses im Radiallabyrinth (Schwegler et al., 1991), aber zu einem verschlechterten Vermeidungslernen im Shuttlebox-Lernen (Lipp et al., 1988).

Auch Neurotrophine der NGF-Familie scheinen einen Einfluss auf Verhalten zu haben, insbesondere auf kognitives Verhalten. So wiesen mutierte Mäuse mit nur einer Genanlage für BDNF (BDNF +/-) deutliche Defizite im Schwimmnavigations-Test (*Morris Water Maze*) auf, ein weiteres Verfahren neben dem Radiallabyrinth zur Testung räumlichen Lernens.

BDNF +/- Mäuse benötigten doppelt so viele Versuche im Vergleich zum Wildtyp mit zwei Genanlagen für BDNF (BDNF +/+), um die zu erfüllende Aufgabe im „*Morris Water Maze*“ in der gleichen Art und Weise, wie der Wildtyp zu absolvieren (Linnarsson et al., 1997).

## 2 Einleitung

---

Dass BDNF an der räumlichen Gedächtnisbildung beteiligt sein könnte, verdeutlichte auch eine BDNF-mRNA Analyse in Ratten nach Testung im „*Morris Water Maze*“. Eine verstärkte mRNA-Expression in der CA1 Region des Hippocampus demonstrierte eine Beteiligung von BDNF an der räumlichen Gedächtnisbildung (Schaaf et al., 2001).

Ein weiteres Anzeichen dafür, dass Neurotrophine der NGF-Familie an der Gedächtnisbildung beteiligt sein könnten, zeigten intrahippocampale Injektionen von NGF und BDNF in adulten Ratten fortgeschrittenen Alters mit kognitiven Defiziten. NGF Injektionen in die Hirnventrikel führten zu einer verbesserten räumlichen Lernleistung im Radiallabyrinth, wohingegen die BDNF Injektionen sich nicht in einer Verbesserung des räumlichen Lernens äußerten (Pelleymounter et al., 1996). Dass die Septumregion in Lernprozessen involviert ist, zeigten kleine wie auch größere elektrolytische Läsionen dieser Region, welche zu Verhaltensänderungen und kognitiven Defiziten, wie z.B. eine beeinträchtigte räumliche Lernleistung im Radiallabyrinth führt (Pallage et al., 1993).

NGF-Einzelinjektionen in den Hippocampus waren in der Lage, diese Defizite des räumlichen Lernens im Radiallabyrinth zu verringern, wobei größere Läsionen durch die NGF Injektionen unbeeinflusst blieben (Pallage et al., 1993).

### 2.6 Die Region des Septums

Die Region des Septums und das daran angeschlossene Kerngebiet des Broca Bandes gehören dem rostralen Teil des basalen Telencephalons oder Vorderhirns an (Mesulam et al., 1983; Saper, 1984; Alheid und Heimer, 1988). Andere Kerngebiete des an der Basis des Gehirns am Übergang zum Hypothalamus gelegenen basalen Vorderhirns sind z.B. der Nucleus basalis Meynert, der den gesamten Neocortex mit Acetylcholin versorgt, der Nucleus accumbens und der „*bed nucleus*“ der Stria terminalis. Die Septumregion mit dem Broca Band liegt bei der Ratte in der medialen Wand der telencephalen Hemisphäre rostral der Commissura anterior und reicht bis unter das vordere Balkenknie. Lateral wird die Septumregion durch die Seitenventrikel begrenzt. Caudal endet das Septum an der Commissura anterior und geht oberhalb des Foramen interventriculare (Monroi) in das Fimbria-Fornixbündel über, welches die Kerne des Septumkomplexes und des Broca Bandes mit dem Hippocampus in reziproker Art und Weise verbindet (Burns, 1982).

Anhand cytoarchitektonischer Kriterien wird der Septumkomplex zusammen mit dem Broca Band in vier Gruppen unterteilt (Stephan, 1975; Swanson und Cowan, 1979; Burns, 1982):

## 2 Einleitung

---

eine mediale, laterale, posteriore und eine ventrale Gruppe. Die Abbildung „A“ im Anhang liefert in Form eines nisslgefärbten koronaren Schnittes durch die Septumregion einen topographischen Überblick dieser Region. Diese Arbeit konzentriert sich auf die medialen Anteile, das mediale Septum und das Broca Band. Die mediale Gruppe projiziert aufsteigend über das Fimbria-Fornixbündel in den Hippocampus, das Subiculum und den entorhinalen Cortex (Swanson und Cowan, 1979). Etwa 2/3 aller Neurone im medialen Septum und Broca Band sind cholinerg (Mesulam et al., 1983; Kiss et al., 1990) und 1/3 GABAerg (Köhler et al., 1984; Kiss et al., 1990). Der Hippocampus erhält über die medialen Anteile nahezu seinen gesamten cholinergen Input (Storm-Mathisen, 1974).

Die laterale Kerngruppe projiziert hauptsächlich in das Broca Band, den anterioren und lateralen Hypothalamus sowie zu den lateralen Mammillarkörpern und der supramammillären Region (Staiger und Nürnberger, 1991). Die posteriore Gruppe projiziert über die Stria medullaris zu den Habenulakernen und weiter in die Interpedicularis-Region. Das Projektionsgebiet der ventralen Gruppe ist einerseits die Amygdala und andererseits über das mediale Vorderhirnbündel der Hypothalamus und der Hirnstamm.

Das mediale Septum mit dem Broca Band und der Hippocampus sind reziprok miteinander verknüpft. Neben dem Fimbria-Fornixbündel wurden noch weitere Verbindungen zwischen Septumregion und Hippocampus ausfindig gemacht. Es sind dies die supracallosale Stria und die ventro-caudale Bahn (Lewis und Shute, 1967; Milner und Amaral, 1984; Gaykema et al., 1990). Diese Verbindungen enden in unterschiedlichen Regionen entlang der rostro-caudalen Achse des Hippocampus, so dass eine topographische Verbindung mit beträchtlichem Überlappungsgrad zwischen den einzelnen Projektionssystemen besteht (Meibach und Siegel, 1977; Nyakas et al., 1987; Amaral und Witter, 1989; Yoshida und Oka, 1990; Davies et al., 1993).

Die Septumregion mit dem Broca Band ist als Teil des cholinergen basalen Telencephalons eine Kernregion des limbischen Systems (Nieuwenhuys et al., 1991). Schon in den letzten Jahrzehnten wurde aufgezeigt, dass das limbische System in eine Vielzahl von Verhaltensweisen eingebunden ist, wie allgemeine Homeostase, Aggression, Nahrungsaufnahme und Sexualverhalten (DeFrance, 1976). Insbesondere das cholinerge System des basalen Telencephalons mit seinen Projektionen zu allo- und neocortikalen Arealen ist von gesteigertem Interesse, da es in Verbindung mit kognitiven Funktionen wie Gedächtnis (Zola-Morgan und Squire, 1993) und Erkrankungen wie beispielsweise der senilen Demenz vom Alzheimer Typ gebracht wird (Bartus et al., 1982).

### 2.7 Fragestellungen dieser Arbeit

Nach den oben erläuterten Veränderungen der Morphologie und des Verhaltens durch eine frühe postnatale Hyperthyreose im septo-hippocampalen System bzw. in septo-hippocampal abhängigen Verhalten und den deutlich gezeigten Auswirkungen einer Thyroxinbehandlung auf die Expression von Neurotrophinen leistet diese Arbeit einen Beitrag zur Klärung der nachfolgenden Fragen :

1. Können die bei Mäusen aufgezeigten stabilen kognitiven Verhaltensänderungen im Radiallabyrinth durch eine frühe postnatale Hyperthyreose auch bei Wistar-Ratten festgestellt werden, und gibt es Auswirkungen auf emotionales Verhalten?
2. Führt die vermehrte Neurotrophin-mRNA- und -Protein-Expression durch eine frühe postnatale Hyperthyreose zu einer veränderten Anzahl an Neurotrophin-Protein exprimierenden Neuronen im medialen Septum und Broca Band?
3. Kommt es zu einer stabilen Veränderung der Neurotrophin exprimierenden Zellen im medialen Septum und Broca Band oder spielen nur transiente Phänomene eine Rolle?
4. Gibt es einen Zusammenhang zwischen Neurotrophin exprimierenden Zellen im medialen Septum und Broca Band und kognitivem oder emotionalem Verhalten?

Zur Bearbeitung dieser Fragen und zur Klärung der Rolle der Neurotrophine der NGF-Familie in der Mediation der Schilddrüsenhormoneffekte in der Entwicklung des septo-hippocampalen Systems wurde eine prospektive randomisierte Studie geplant, vorbereitet und durchgeführt. Wistar-Ratten wurden einer zehn- bis maximal zwölf-tägigen Thyroxinbehandlung unterzogen. Im adulten Alter von 13 bis 15 Wochen wurden die Ratten hinsichtlich ihrer kognitiven Fähigkeiten bezüglich der räumlichen Gedächtnisbildung im Radiallabyrinth geprüft. Das emotionale Verhalten wurde mit Hilfe des „*Elevated plus maze*“ gemessen. Dieses Angstmodell basiert auf der Angst vor erhobenen und offenen Orten (Rodgers und Dalvi, 1997).

Um eine potentielle Änderung der Neurotrophin (NGF, BDNF, NT-3, NT-4) exprimierenden Neuronenzahl im medialen Septum und Broca Band zu eruieren und um eventuell transiente von stabilen Phänomenen zu unterscheiden, wurden zu zwei Zeitpunkten – am postnatalen Tag zehn (P10) und im adultem Alter von 13 bis 15 Wochen (AD) - mit immunhistochemischen Methoden die Neuronenzahl durch randomisiert-systematische Zählung immunpositiver Zellen im medialen Septum und Broca Band quantifiziert und statistisch ausgewertet.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Tiere und Hormonbehandlung

Die Würfe von trächtigen Wistar Ratten wurden randomisiert einer Thyroxingruppe (T) oder einer Kontrollgruppe (K) zugeordnet (Harlan/Winkelmann; Deutschland, Borcheln). Die T-Gruppe (n = 31) erfuhr während der ersten zehn bis zwölf postnatalen Tage eine tägliche Behandlung mit 0,05ml einer L-Thyroxin-Lösung (= 7,5µg Na-L-Thyroxin in 50µl 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung (NaCl), pH = 9,0) (siehe Anhang). Die K-Gruppe (n = 27) erhielt im gleichen Zeitraum der ersten zehn bis zwölf postnatalen Tage täglich 0,05ml einer gepuffertern 0,9%igen NaCl (pH = 9,0). Das Geschlechtsverhältnis war mit 26 weiblichen (w) und 32 männlichen (m) Ratten ausgeglichen (T = 13w/18m; K = 13w/14m). Die Injektionen wurden jeweils im gleichen Zeitraum und von derselben Person zwischen 9.00–11.00 Uhr subcutan in eine Nackenfalte verabreicht.

Die zwei Gruppen (T, K) wurden nochmals in zwei Teilgruppen unterteilt. Die erste Teilgruppe (n = 29; T = 14; K = 15) wurde sofort nach der zehntägigen postnatalen Thyroxin- bzw. NaCl-Behandlung zur Gewebegewinnung genutzt. Die zweite Teilgruppe (n = 29; T = 17; K = 12) wurde nach der frühen postnatalen Behandlung bis zum adulten Alter von 100 bis 120 Tagen aufgezogen. Im Alter von vier Wochen wurden die Jungtiere von ihren Müttern getrennt und in eingeschlechtlichen Geschwistergruppen mit 3-5 Tieren pro Käfig bis zum Ende der Experimente gehalten. Es wurde ein Hell-/Dunkelzyklus von 9:15 Stunden eingehalten. Das Licht schaltete sich mithilfe einer automatischen Anlage um 7.00 Uhr morgens mit langsam zunehmender Lichtstärke ein und um 16 Uhr vice versa aus. Nahrung und Wasser wurden ad libitum zur Verfügung gestellt.

Die Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes wurden bei allen Versuchen respektiert und eingehalten.

#### 3.2 Verhaltensexperimente

Es kamen zwei Modelle zur Testung von Verhalten zur Anwendung. Zur Bestimmung räumlicher Lernprozesse wurden die adulten Ratten im Radiallabyrinth (RL) getestet. Des Weiteren wurde emotionales Verhalten mit dem „*Elevated Plus Maze*“ (EPM) bestimmt. Zwischen diesen beiden Verhaltenstests lag ein Zeitraum von 14 Tagen. Alle Verhaltensexperimente wurden zwischen 9.00-13.00 Uhr von derselben Person durchgeführt und protokolliert.

## 3 Material und Methoden

---

### 3.2.1 Radiallabyrinth

Im Alter von ca. 13 Wochen wurde das räumliche Lernvermögen der adulten Tiere im Radiallabyrinth getestet. Das Material des Labyrinths bestand aus weiß angestrichenem Holz. Es setzte sich zusammen, aus einer zentralen, achteckigen Plattform mit einem Durchmesser von 25cm, von der acht Arme à 67cm Länge und 10cm Breite ausgingen. An den Seiten der jeweiligen Arme waren Holzleisten von 1cm Höhe angebracht, die ein Herunterfallen der Tiere während des jeweiligen Experimentes verhindern sollten. Am Ende eines jeden Armes war eine Futtersenke eingebracht, so dass die Futterbelohnung für das jeweilige Tier von der zentralen Plattform aus nicht sichtbar war. Diese Apparatur stand 83cm über dem Boden [siehe Abb. 3.2 A].

In der Umgebung des Radiallabyrinths waren zur räumlichen Orientierung diverse Markierungen angebracht, welche über die gesamte Zeit des Experimentes unverändert blieben. Zudem wurde das Labyrinth einmal täglich in zufälliger Richtung gedreht, um etwaige innere Markierungen, wie z.B. Duftmarken, auszuschließen. Ferner wurde das Labyrinth nach jedem Versuchstier mit einem feuchten Tuch gereinigt und die Geschlechter in unterschiedlichen Versuchsserien getestet.

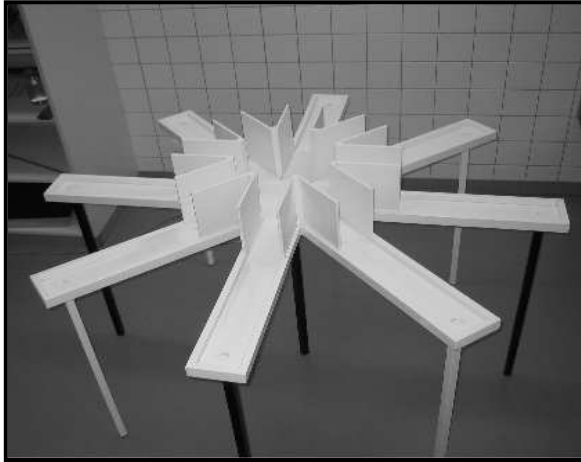
Da ein Appetenz- und exploratives Verhalten zur Absolvierung der Aufgabe im Radiallabyrinth unabdingbar ist, wurden die Tiere drei Tage vor Versuchsbeginn bis zu einer Körpergewichtsreduktion von 10% des Ausgangsgewichtes kontrolliert von der Nahrungszufuhr depriviert. Lediglich Flüssigkeit in Form von Wasser wurde ad libitum zur Verfügung gestellt. Zur Gewöhnung an die Testapparatur wurden die Tiere in zufällig ausgesuchter Reihenfolge für drei Tage jeweils für 15min habituiert, bis sie für zehn sukzessive Tage einmal täglich im Labyrinth in gleicher Reihenfolge getestet wurden.

Die zu erfüllende Aufgabe im Radiallabyrinth bestand darin, die mit jeweils einer Futterbelohnung bestückten acht Arme durch einmaliges Betreten des jeweiligen Armes aufzusammeln. Registriert wurden dabei drei Parameter. Erster Parameter war die totale Laufzeit, welche benötigt wurde, um alle acht Belohnungen zu sammeln. Der zweite Parameter waren Fehler, welche durch Betreten eines schon besuchten Armes auftraten. Dieser Parameter liefert einen Wert für die Leistung des Arbeitsgedächtnisses („*Working Memory Errors*“, WME). Der dritte registrierte Parameter war die Anzahl der neubesuchten Arme aus den ersten acht Armbesuchen. Das Maximum dieses Parameters von acht wurde erzielt, wenn das Versuchstier sämtliche Futterbelohnungen durch einmaliges Betreten der acht belohnten Arme aufsamelte. Der Versuch galt als beendet, wenn nach 15min nicht sämtliche Futterbelohnungen aufgesammelt wurden.

### 3 Material und Methoden

---

Die Anzahl der nicht gefundenen Belohnungen wurde als *Working Memory Error* gewertet. Die Helligkeit in der Testapparatur betrug ca. 125 Lux während der gesamten Versuchsreihe.



[Abb. 3.2 A]

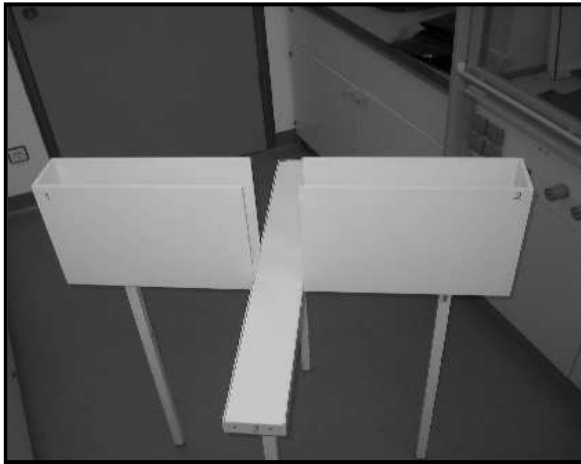
Abb. des Radiallabyrinths.

#### 3.2.2 Elevated-Plus-Maze

Zwei Wochen nach Testung des räumlichen Lernvermögens im Radiallabyrinth wurde emotionales Verhalten in Form von Angst im *Elevated Plus Maze* bestimmt. Diese Testapparatur bestand aus vier senkrecht zueinander stehenden Armen à 40 x 10cm mit einer 10 x 10cm messenden zentralen Plattform. Zwei diametrale Arme waren durch 40cm hohe seitliche Wände nach außen geschlossen (geschlossene Arme). Die weiteren zwei Arme waren ohne seitlich schützende Wände (offene Arme). Diese kreuzförmige Apparatur stand 83cm über dem Boden [siehe Abb. 3.2 B]. Als Schutz vor einem potenziellen Absturz der Versuchstiere wurden an den Seiten der offenen Arme 0,5cm hohe Leisten angebracht. Die Apparatur bestand aus weiß angestrichenem Holz. In allen Bereichen betrug die Helligkeit ca. 125 Lux. Die Versuchstiere wurden zu Beginn des Versuchs jeweils immer in gleicher Art und Weise auf die zentrale Plattform in Richtung eines geschlossenen Armes gesetzt. Die Ratten hatten die Möglichkeit, die Apparatur in einem Zeitraum von zehn Minuten zu explorieren. Der Experimentator registrierte in einem Abstand von 2,5m das Verhalten der Tiere. Protokolliert wurden die Anzahl der Betretungen und die Aufenthaltsdauer auf den einzelnen Armen. Ein Arm galt als Betreten, wenn alle vier Pfoten auf den jeweiligen Armen zu verzeichnen waren. Mit Hilfe eines Computerprogramms wurde anhand der genauen Zeitpunkte der Betretungen, die gesamte Zeitdauer pro Armbesuch während des gesamten Versuchsablaufs für jedes einzelne Tier berechnet.

### 3 Material und Methoden

---



[Abb. 3.2 B]

Abb. des *Elevated Plus Maze*

#### 3.3 Gewebeverarbeitung

Die Versuchstiere wurden mit 180mg/kg Pentobarbital (Merial GmbH, Halbergmoss) durch eine intraperitoneale Injektion tief narkotisiert. Nach Testung auf Schmerzfreiheit wurde über einen transabdominellen Zugang der Brustkorb eröffnet und das Perforationsgebiet der Bauchorta abgeklemmt. Danach wurde 0,1ml Liquemin (5000 I.E./ml; Roche, Whylen Grenzach) zur Gerinnungshemmung in den linken Ventrikel injiziert. Darauf folgte eine Punktion des linken Ventrikels mit Hilfe einer Perfusionskanüle bis zur Fixierung der Kanüle in der Aorta ascendens, um eine Perfusion mit ca. 150ml 0,9% NaCl (pH = 7,4) mit 0,1% Liquemin für 5min und anschließend ca. 250ml 0,1M Phosphatpuffer (PB; pH = 7,4) unter Zusatz von 4% Paraformaldehyd und 15% Pikrinsäure für 20min durchzuführen. Vor Beginn der Perfusion wurde das rechte Herzohr eröffnet. Nach Abschluss der Perfusion wurden die Gehirne umgehend und vorsichtig aus dem Kraniaum entnommen und für weitere 2 Stunden nachfixiert. Danach wurden die Hirne in eine 20%ige Saccharose-Lösung in 0,1M PB (pH = 7,4) für 24h zur Kryoprotektion gegeben. Bis zur weiteren Verarbeitung und zur Erhöhung der Gewebeporpermeabilität wurden die Hirne im 2-Methylbutan-Bad als Kühlmediator mit Hilfe von Flüssigstickstoff vorsichtig eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Im folgenden Schritt wurden die Hirne in einem Zeitraum von 10min auf -15°C gebracht, um am Kryotom 40µm dicke, koronare Schnitte herzustellen. Die angefertigten Hirnschnitte eines Tieres wurden in vier Serien aufgeteilt, indem sie getrennt in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH = 7,4) aufgefangen und gesammelt wurden. Eine Serie diente zur Anfertigung einer Nissl-Übersichtsfärbung, mit den übrigen 3 Serien eines Tieres wurden Immunfärbungen der neurotrophen Faktoren durchgeführt.

### 3 Material und Methoden

---

#### 3.4 Immunhistochemie

Die Immunfärbung wurde an frei flottierenden Schnitten durchgeführt, welche den wesentlichen Vorteil der beidseitigen Gewebepenetration durch die verwendeten Antikörper zur Visualisierung der neurotrophen Faktoren bietet. Um unspezifische Epitope im Gewebeschnitt zu besetzen, wurden die Hirnschnitte zunächst in einer Lösung aus 10%igem normalem Ziegen Serum und 10%igem bovinem Serum Albumin (BSA; Serva, Heidelberg) in 0,1M PBS (pH = 7,4) für 30min bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Entfernung dieser Blocklösung erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen primären, polyklonalen aus Kaninchen stammenden Antikörpern. (DPC Biermann, Bad Nauheim). Die primären Antikörper wurden in folgenden Konzentrationen genutzt:

NGF 1:1000; BDNF 1:200; NT3 1:750; NT4/5 1:250.

Die Kreuzreaktivität der verschiedenen Antikörper ist mit weniger als 0,1% angegeben (DPC Biermann, Bad Nauheim).

Die Inkubation mit den jeweiligen primären Antikörpern erfolgte in einer Lösung aus 0,1M PBS unter Zusatz von 1%igem Ziegen Serum und 0,3%igem Triton X-100 für 48h bei +4°C und bei langsamer Geschwindigkeit auf einem Schüttler. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Gewebeschnitte mit 0,1M PBS (pH = 7,4) drei mal zehn Minuten gespült und anschließend mit dem sekundären, biotinyliertem Antikaninchen-Antikörpern („bio-anti-rabbit“; Vector Laboratories, Wertheim Bettingen) in einer Verdünnung von 1:225 für zwei Stunden bei Raumtemperatur bei langsamer Geschwindigkeit auf einem Schüttler inkubiert. Die Restaktivität der im Gewebe vorhandenen endogenen Peroxidase wurde nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper und weiteren Spülungen (3 x 10min in PBS, pH = 7,4) durch ein zehnmütiges Behandeln mit 0,3% Wasserstoffperoxid und 5% Methanol in 0,1M PBS Lösung (pH = 7,4) minimiert. Nach erneuter Spülung (5 x 10min in PBS, pH = 7,4) folgte die Inkubation mit einem Avidin und biotinyliertem Peroxidase Komplex für eine Stunde (ABC Kit Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Die Immunfärbung wurde schließlich durch das Reaktionsprodukt von 3`5`-Diaminobenzidin (DAB, 1mg/1ml) und 0,0075%igem Wasserstoffperoxid in 0,1M PBS (pH = 7,4) durch Präzipitation visualisiert. Die Reaktion erfolgte unter Sichtkontrolle und dauerte zwischen 3-10min.

Alle Hirnschnitte wurden anschließend auf Objektträger gezogen, in einer aufsteigenden Reihe Alkohol dehydriert, in Xylene geklärt und mit Eukitt eingedeckt.

#### 3.5 Auszählung und Analyse der Schnitte

Zur Vermeidung subjektiver, fehlerhafter Einflüsse bei der Auszählung der immungefärbten Hirnschnitte wurden die auszuwertenden Objektträger von einer anderen Person kodiert (Verblindung).

Zur Analyse und Morphometrie wurde ein Bildanalyse-System verwendet, welches die Auswertung nach der optischen Dissektor-Methode („*systematic random sampling*“) ermöglichte (Zeiss Axioplan Mikroskop; AVT-HORN Videokamera mit Kontron electronic software Vidas 2.1) (Gundersen et al., 1988; Coggeshall und Lekan, 1996). Eine Voraussetzung zur Anwendung der optischen Dissektor Methode ist eine homogene Verteilung der zu quantifizierenden Zellen in der interessierenden Region. Daher wurde vor Zählung dieses Merkmal durch Beurteilung der Zellverteilung durch Betrachtung der Hirnschnitte im Mikroskop bei 2,5-facher Vergrößerung geprüft. Ferner wurden durch Zählung aller immunpositiven Zellen im medialen Septum und Broca Band in einem einzelnen Tier und anschließender Zählung des gleichen Tieres mit der optischen Dissektor-Methode und Hochrechnung (Formel im Anhang) annähernd gleiche Zellzahlen ermittelt. Die Dissektions-Quadrate hatten eine Kantenlänge von 100 x 100µm. Der vertikale wie auch der horizontale Abstand der Dissektions-Quadrate betrug ebenso 100µm. Die Grenzen des medialen Septums und Broca Bandes wurden mit Hilfe der zugehörigen Nissl-Färbung und gleichzeitiger Orientierung im Rattenhirn-Atlanten bestimmt (Swanson, 1992). Das auszuwertende Gebiet des medialen Septums und Broca Bandes wurde bei 2,5-facher Vergrößerung durch Umfahren mit Hilfe eines Grafiktablets bestimmt und gespeichert. Die Dissektions-Quadrate wurden automatisch und zufällig durch den Computer über die umfahrende Fläche gelegt. Gezählt wurden die immunpositiven Neurone in den nacheinander angesteuerten Dissektions-Quadraten bei 40-facher Vergrößerung. Dabei wurden ausschließlich Neurone gezählt, welche von anderen Zellarten wie Glia oder Endothelzellen durch die Parameter Zellkern, -größe und -form abgrenzbar waren. Um ein präzises Zählergebnis zu ermitteln, wurden immunpositive Neurone, welche auf der linken und unteren Begrenzungslinie der Dissektions-Quadrate lagen, von der Zählung ausgeschlossen. Die einzelnen Dissektions-Quadrate wurden automatisch durch den motorgetriebenen Objektisch angefahren.

Das mediale Septum und das Broca Band erstreckten sich insgesamt über ca. 1200-1400 µm in sagittaler Richtung, was 10-11 koronaren Schnitten pro Tier entsprach. Davon wurden vier in der größten Ausdehnung liegende Gewebeschnitte pro Tier ausgezählt. Anfangspunkt der Zählung war eine Entfernung von 5 Hirnschnitten bei den P10 und 6 Hirnschnitten bei den

### **3 Material und Methoden**

---

adulten Tieren in rostraler Richtung des rostralen Endes der Commissura anterior einer jeweiligen Serie. Fokussiert wurde jeweils unter gleichen Bedingungen nur von oben. Anschließend wurden die mit der Dissektor-Methode ermittelten Zellzahlen auf die im gesamten medialen Septum und Broca Band vorhandenen Zellen hochgerechnet. Damit war eine genaue Abschätzung der Anzahl immunpositiver Neurone im gesamten ausgewerteten Region möglich. Die ermittelten Zellzahlen pro Schnitt wurden für jedes Versuchstier addiert und statistisch ausgewertet.

#### **3.6 Statistik**

Für die Statistik wurde der Student t-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  mit Hilfe der SPSS-Software (Version 8.0) angewandt. Eine wichtige Voraussetzung zur Anwendung des auch als robust bezeichneten Student t-Testes ist eine Normalverteilung (Weiß, 2001) Zur Testung dieser Eigenschaft wurden die in dieser Arbeit untersuchten Parameter mit dem Chi-Quadrat-Anpassungstest geprüft. Demnach sprach nichts gegen eine Normalverteilung. Weiterhin wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit den Faktoren Alter und Behandlung und deren Wechselwirkung durchgeführt. Korrelationen zwischen Verhaltensparametern und Anzahl immunpositiver Neurone wurden mit der Korrelationsanalyse nach Pearson errechnet.

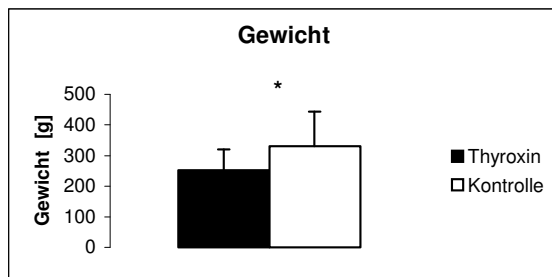
## 4 Ergebnisse

---

### 4 Ergebnisse

#### 4.1 Generelle Beobachtungen

Die frühe postnatale Thyroxinbehandlung (T) hatte verschiedene phänomenologisch beobachtbare Effekte. So führte die Hormonbehandlung im Vergleich zur Kontrollbehandlung (K) zu einer beschleunigten Entwicklung. Dies machte sich in einem früheren Augenöffnen und Fellwachstum bei den Thyroxin behandelten Tieren bemerkbar (Augenöffnung: T am 11/12 Tag; K am 15/16 Tag). Ferner fiel ein unterschiedlicher Habitus zwischen den Tieren beider Gruppen auf. Thyroxin behandelte Tiere blieben kleiner und behielten bis in das adulte Alter ein signifikant geringeres Körpergewicht als die gleichaltrigen Kontrolltiere (T:  $252 \pm 69$  g; K:  $330 \pm 114$  g;  $t = 2,175$ ,  $df = 25$ ,  $P < 0,05$ ) [siehe Abb. 4.1]. Auffallend war auch eine erhöhte Körpertemperatur der hormonbehandelten Tiere, welche sich nach Abschluß der postnatalen Behandlung wieder den Kontrolltieren angleich.



[Abb. 4.1]

**Abb. 4.1** stellt graphisch das mittlere Körpergewicht in Gramm (g) mit Standardabweichung der adulten Thyroxintiere (schwarzer Balken) und Kontrolltiere (weißer Balken) dar. \*  $P < 0,05$  (Student t-Test)

#### 4.2 Radiallabyrinth

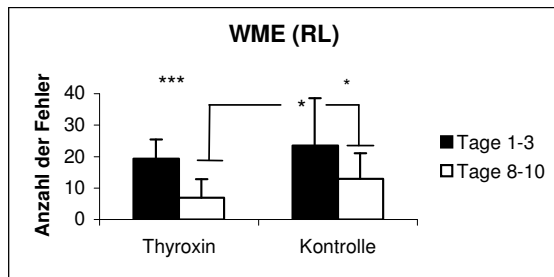
Im räumlichen Lernmodell des Radiallabyrinths wurden 15 (T) bzw. 12 (K) Tiere getestet. Zwei T-Tiere fielen aus der Wertung, da sie während der Versuchsreihe von der Apparatur stürzten. In beiden Gruppen (T, K) waren Lerneffekte durch Besserung verschiedener Lernparameter messbar. Es wurden die Fehler durch das Betreten eines schon besuchten Armes (*Working Memory Errors*; WME) an den ersten (1-3d) und letzten drei (8-10d) Testtagen addiert und statistisch berechnet und verglichen. Sowohl die Thyroxin behandelten Tiere als auch die Kontrolltiere reduzierten die Anzahl an WME im Verlauf des Versuchs signifikant (T:  $19,4 \pm 6$  WME an 1-3d /  $6,9 \pm 6$  WME an 8-10d;  $t = 5,652$ ,  $df = 28$ ,  $P < 0,001$ ; K:  $23,5 \pm 15$  WME an 1-3d /  $13,0 \pm 8$  WME an 8-10d;  $t = 2,074$ ,  $df = 22$ ,  $P < 0,05$ ) [siehe Abb. 4.2 A]. Hormonbehandelte Tiere zeigten jedoch eine bessere räumliche Lernleistung gegenüber der Kontrollgruppe, was sich in einer signifikant niedrigeren Anzahl an WME im Vergleich der letzten drei Versuchstage zwischen den beiden Gruppen (T, K) abzeichnete



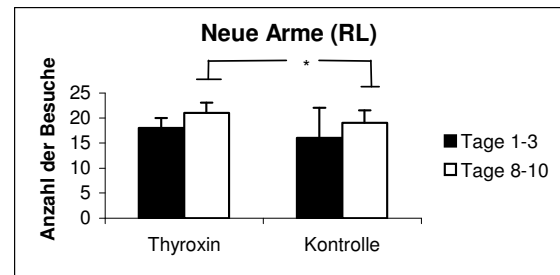
## 4 Ergebnisse

(WME an 8-10d, T/K;  $t = 2,1$ ,  $df = 25$ ,  $P < 0,05$ ).

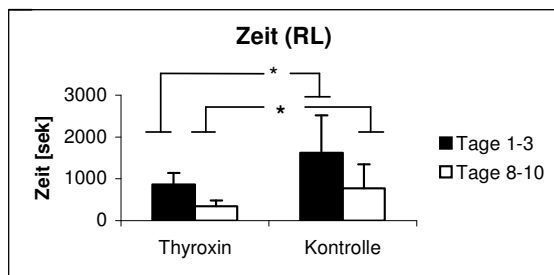
Ferner betraten hormonbehandelte Tiere an den Testtagen 8-10 mehr neue Arme aus den ersten 8 Armbesuchen als Kontrolltiere (Summe der Armbetretungen „Neue Arme aus 8“ an den Tagen 8-10; T:  $21 \pm 2$  mal; K:  $19 \pm 2$  mal;  $t = 1,986$ ,  $df = 25$ ,  $P = 0,06$ ) [siehe Abb. 4.2 B]. Thyroxin behandelte Tiere benötigten sowohl an den ersten drei als auch an den letzten drei Testtagen signifikant weniger Zeit in Sekunden (sek) im Vergleich zur Kontrollgruppe zur Erfüllung der Lernaufgabe im Radiallabyrinth (Zeit an 1-3d, T:  $859 \pm 275$ sek; K:  $1616 \pm 898$ sek;  $t = -2,820$ ,  $df = 12$ ,  $P < 0,05$ ; Zeit an 8-10 d, T:  $333 \pm 144$ sek; K:  $771 \pm 575$ sek;  $t = -2,570$ ,  $df = 12$ ,  $P < 0,05$ ) [siehe Abb. 4.2 C].



[Abb. 4.2 A]



[Abb. 4.2 B]



[Abb. 4.2 C]

Abb. 4.2 A bis 4.2 C stellen graphisch die Ergebnisse des Radiallabyrinths an den ersten drei (schwarze Balken) und letzten drei (weiße Balken) Testtagen zwischen den Thyroxintieren (links) und Kontrolltieren (rechts) dar.

\*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  (Student t-Test)

Abb. 4.2 A stellt die Mittelwerte mit Standardabweichung der *Working Memory Errors* (WME) an den ersten und letzten drei Testtagen dar.

Abb. 4.2 B stellt die Mittelwerte mit Standardabweichung der Summen der richtig besuchten neuen Arme aus den ersten 8 Armbesuchen an den ersten und letzten drei Testtagen dar.

Abb. 4.2 C stellt die Mittelwerte mit Standardabweichung der benötigten Zeit in Sekunden (sek) zur Sammlung aller Futterbelohnungen im Radiallabyrinth an den ersten und letzten drei Testtagen dar

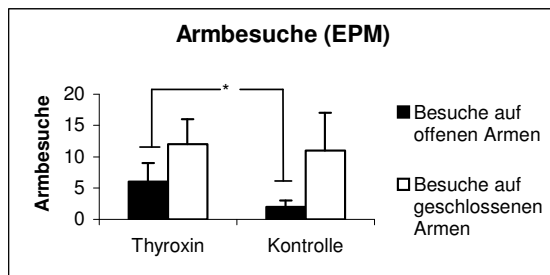
## 4 Ergebnisse

### 4.3 Elevated Plus Maze

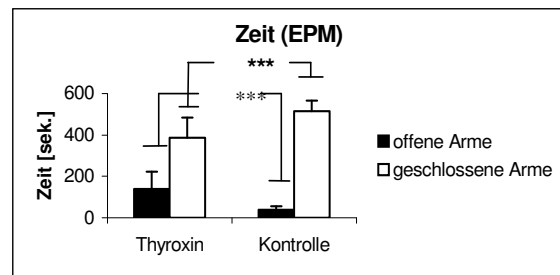
Es wurden 13 (T) bzw. 10 (K) Tiere in diesem Modell zur Messung emotionalen Verhaltens getestet. 4 (T) bzw. 2 (K) Tiere fielen aus der Wertung heraus, da sie während des Versuchs von der Apparatur stürzten. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in verschiedenen Parametern zwischen dem mit Thyroxin behandelten Tieren und den Kontrolltieren.

Hormonbehandelte Tiere betraten signifikant häufiger die offenen Arme als Kontrolltiere (Anzahl des Betretens offener Arme, T:  $6 \pm 3$  mal; K:  $2 \pm 1$  mal;  $t = -3,679$ ,  $df = 21$ ,  $P < 0,001$ ) [siehe Abb. 4.3 A].

Dabei waren keine Unterschiede in der Summe der Besuche auf den offenen und geschlossenen Armen zwischen beiden Gruppen zu verzeichnen (Summe aller Armbesuche, T:  $18 \pm 7$  mal; K:  $14 \pm 6$  mal;  $t = -1,886$ ,  $df = 21$ ,  $P = 0,73$ ). Die Anzahl der Besuche der geschlossenen Arme unterschied sich nicht zwischen den Gruppen (Anzahl der Armbesuche auf geschlossenen Armen, T:  $12 \pm 4$  mal; K:  $11 \pm 6$  mal;  $t = -0,522$ ,  $df = 21$ ,  $P = 0,6$ ). Ferner verbrachten Thyroxin behandelte Tiere signifikant längere Zeit auf den offenen und auch signifikant kürzere Zeit auf den geschlossenen Armen als Kontrolltiere (Zeit auf offenen Armen, T:  $140 \pm 84$ sek; K:  $38 \pm 17$ sek;  $t = -4,249$ ,  $df = 13,3$ ,  $P < 0,001$ ; Zeit auf geschlossenen Armen: T:  $387 \pm 96$ sek; K:  $514 \pm 50$ sek;  $t = 3,772$ ;  $df = 21$ ;  $P < 0,001$ ) [siehe Abb.4.3 B].



[Abb. 4.3 A]



[Abb. 4.3 B]

Abb. 4.3 A und 4.3 B stellen graphisch die Ergebnisse des *Elevated Plus Maze* der Thyroxintiere (links) und Kontrolltiere (rechts) dar. \*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  (Student t-Test)

Abb. 4.3 A stellt die Mittelwerte mit Standardabweichung der Besuche auf den offenen (schwarze Balken) und geschlossenen Arme (weiße Balken) dar.

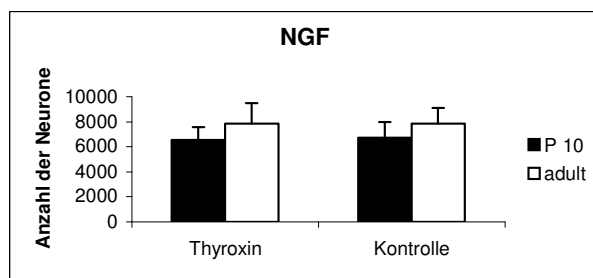
Abb. 4.3 B stellt die Mittelwerte mit Standardabweichung der auf den offenen und geschlossenen Armen verbrachten Zeit in Sekunden (sek) dar.

## 4 Ergebnisse

### 4.4 NGF

In der Altersstufe der 10 Tage alten Tiere (P10) wurden 6 (T) bzw. 8 (K) und in der adulten Altersstufe (AD) 7 (T) bzw. 8 (K) Tiere untersucht. Die Abbildungen „B“ und „C“ im Anhang stellen einen NGF immungefärbten koronaren Schnitt bei 2,5- und 40-facher Vergrößerung dar. Die Quantifizierung und statistische Auswertung der NGF immunpositiven Neurone (n) im medialen Septum und Broca Band zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Thyroxin behandelten und den Kontrolltieren in den zwei Altersstufen (P10, T:  $6554 \pm 1039n$ ; K:  $6732 \pm 1259n$ ;  $t = 0,282$ ,  $df = 12$ ,  $P = 0,78$ ; AD, T:  $7853 \pm 1633n$ ; K:  $7835 \pm 1292n$ ;  $t = -0,025$ ,  $df = 13$ ;  $P = 0,98$ ) [siehe Abb. 4.4]. Im Vergleich der Thyroxin behandelten Tiere und der Kontrolltiere zwischen den beiden Altersstufen ließ sich ebenfalls kein Unterschied in der Anzahl der immunpositiven Neurone feststellen (P10 T/AD T;  $t = -1,699$ ,  $df = 12$ ,  $P = 0,12$ ; P10 K/AD K:  $t = -1,67$ ,  $df = 13$ ,  $P = 0,12$ ).

Die Varianzanalyse deckte keinen Behandlungseffekt auf ( $F = 0,034$ ,  $P = 0,86$ ), jedoch einen positiven Alterseffekt ( $F = 5,829$ ,  $P < 0,05$ ). Die Wechselwirkung zwischen Thyroxinbehandlung und Alter zeigte keinen Effekt ( $F = 0,178$ ,  $P = 0,68$ ).



[Abb. 4.4]

Abb. 4.4 stellt graphisch die Mittelwerte mit Standardabweichung der Anzahl an NGF immunpositiven Neuronen im medialen Septum und Broca Band von Thyroxintieren (links) und Kontrolltieren (rechts) im Alter von zehn Tagen (schwarze Balken) und im adulten Alter (weiße Balken) dar.

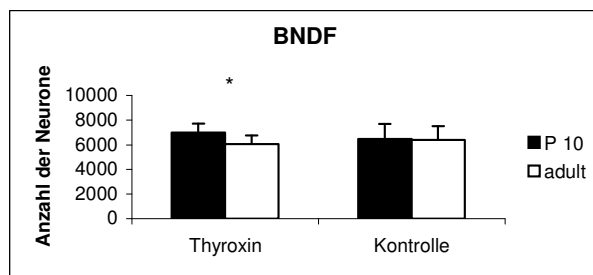
### 4.5 BDNF

In der P10 Altersstufe wurden 7 (T) bzw. 6 (K) und in der AD Altersstufe 7 (T) bzw. 11 (K) Tiere ausgewertet. Die Abbildungen „D“ und „E“ im Anhang stellen einen BDNF immungefärbten koronaren Schnitt von P10 bei 2,5- und 40x-facher Vergrößerung dar. Abbildungen „F“ und „G“ im Anhang stellen BDNF immungefärbte Schnitte von adulten Tieren dar. Die Quantifizierung und statistische Auswertung der BDNF immunpositiven Neurone im medialen Septum und Broca Band ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Thyroxin behandelten Tieren und den Kontrolltieren in beiden Altersstufen

## 4 Ergebnisse

(P10, T:  $6986 \pm 726n$ ; K:  $6487 \pm 1181n$ ;  $t = -0,896$ ,  $df = 11$ ,  $P = 0,39$ ; AD, T:  $6064 \pm 686n$ ; K:  $6396 \pm 1114n$ ;  $t = 0,789$ ,  $df = 16$ ,  $P = 0,44$ ) [siehe Abb. 4.5]. Jedoch zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl an BDNF immunpositiven Nervenzellen in der hormonbehandelten Gruppe der P10 Altersstufe im Vergleich zur äquivalenten Gruppe der AD Altersstufe ( $t = 2,596$ ,  $df = 15$ ,  $P < 0,05$ ). Keine unterschiedliche Neuronenzahlen ließen sich im Vergleich der entsprechenden Kontrollgruppen der beiden Altersstufen quantifizieren ( $t = 0,148$ ,  $df = 12$ ,  $P = 0,89$ ).

Die Auswertung der Varianzanalyse zeigte keinen Behandlungseffekt ( $F = 0,505$ ,  $P = 0,48$ ), keinen Alterseffekt ( $F = 2,516$ ,  $p = 0,12$ ) und keine Wechselwirkung zwischen Behandlung und Alter ( $F = 0,560$ ,  $P = 0,46$ ).



[Abb. 4.5]

Abb. 4.5 stellt graphisch die Mittelwerte mit Standardabweichung der Anzahl an BDNF immunpositiven Neuronen im medialen Septum und Broca Band von Thyroxintieren (links) und Kontrolltieren (rechts) im Alter von zehn Tagen (schwarze Balken) und im adulten Alter (weiße Balken) dar. \*  $P < 0,05$  (Student t-Test)

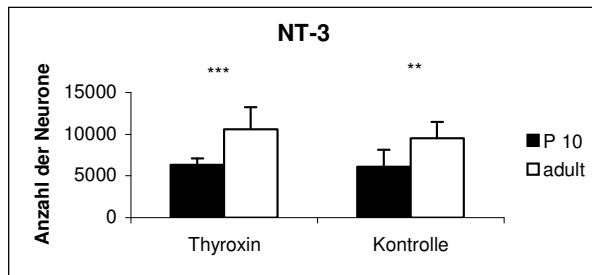
### 4.6 NT-3

In der P10 Altersstufe wurden 7 (T) bzw. 6 (K) und in der AD Altersstufe 7 (T) bzw. 7 (K) untersucht. Die Abbildungen „H“ und „I“ im Anhang stellen einen NT-3 immungefärbten koronaren Schnitt bei 2,5- und 40-facher Vergrößerung dar. Die Quantifizierung und statistische Auswertung der NT-3 immunpositiven Neurone im medialen Septum und Broca Band zeigte keinen Unterschied zwischen den Thyroxin behandelten Tieren und den Kontrolltieren der beiden Altersstufen (P10, T:  $6329 \pm 809n$ ; K:  $6110 \pm 2013n$ ;  $t = -0,266$ ,  $df = 11$ ,  $P = 0,78$ ; AD, T:  $10617 \pm 2620n$ ; K:  $9525 \pm 1955n$ ;  $t = -0,884$ ,  $df = 12$ ,  $P = 0,39$ ) [siehe Abb. 4.6]. Es stellte sich jedoch eine signifikant höhere Anzahl an NT-3 immunpositiven Neuronen in der adulten Altersstufe unabhängig von der Hormon- bzw. Kontrollbehandlung heraus (P10 T/AD T:  $t = -4,137$ ,  $df = 12$ ,  $P < 0,001$ ; P10 K/AD K:  $t = -3,098$ ,  $df = 11$ ,  $P < 0,01$ ).

Die Varianzanalyse ergab keinen Behandlungseffekt ( $F = 0,216$ ,  $P = 0,65$ ), jedoch einen positiven Alterseffekt ( $F = 27,278$ ,  $P < 0,01$ ), aber keine Wechselwirkung zwischen

## 4 Ergebnisse

Hormonbehandlung und Alter ( $F = 0,025$ ,  $P = 0,88$ ).



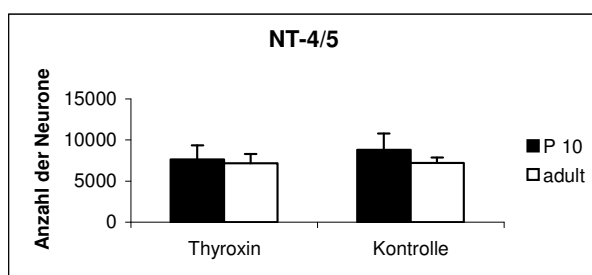
[Abb.4.6]

Abb. 4.6 stellt graphisch die Mittelwerte mit Standardabweichung der NT-3 immunpositiven Neurone im medialen Septum und Broca Band von Thyroxintieren (links) und Kontrolltieren (rechts) im Alter von zehn Tagen (schwarze Balken) und im adulten Alter (weiße Balken) dar. \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  (Student t-Test)

### 4.7 NT-4/5

In der P10 Altersstufe wurden 6 (T) bzw. 6 (K) und in der AD Altersstufe 11 (T) bzw. 8 (K) Tiere ausgewertet. Die Abbildungen „J“ und „K“ im Anhang stellen einen NT-4/5 immungefärbten koronaren Schnitt bei 2,5- und 40-facher Vergrößerung dar. Die Quantifizierung und statistische Auswertung der NT-4/5 immunpositiven Neurone im medialen Septum und Broca Band zeigte keinen Unterschied zwischen den Thyroxin behandelten Tieren und den Kontrolltieren der beiden Altersstufen (P10, T:  $7639 \pm 1721n$ ; K:  $8811 \pm 1999n$ ;  $t = 1,088$ ,  $df = 10$ ,  $P = 0,30$ ; AD, T:  $7179 \pm 1117n$ ; K:  $7195 \pm 699n$ ,  $t = 0,035$ ,  $df = 17$ ,  $P = 0,97$ ). Der Vergleich der hormonbehandelten Tiere und der Kontrolltiere zwischen den beiden Altersstufen ergab ebenfalls keinen Unterschied in der Anzahl an immunpositiven Neuronen (P10 T/AD T:  $t = 0,673$ ,  $df = 15$ ,  $P = 0,51$ ; P10 K/AD K:  $t = 1,896$ ,  $df = 5,924$ ,  $P = 0,10$ ).

Die Varianzanalyse zeigte keinen Behandlungseffekt ( $F = 0,908$ ,  $P = 0,35$ ), keinen Alterseffekt ( $F = 3,730$ ,  $P = 0,60$ ) und keine Wechselwirkung zwischen Thyroxinbehandlung und Alter ( $F = 1,889$ ,  $P = 0,18$ ) [siehe Abb. 4.7].



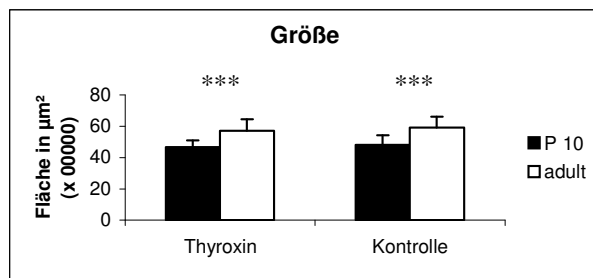
[Abb. 4.7]

Abb. 4.7 stellt graphisch die Mittelwerte mit Standardabweichung der NT-4/5 immunpositiven Neurone im medialen Septum von Thyroxintieren (links) und Kontrolltieren (rechts) im Alter von zehn Tagen (schwarze Balken) und im adulten Alter (weiße Balken) dar.

## 4 Ergebnisse

### 4.8 Größe des medialen Septums und Broca Bandes

Das angewandte Bildanalyzesystem [siehe Abschnitt 3.5] ermöglichte eine Größenbestimmung des medialen Septums und des Broca Bandes durch Berechnung und Angabe der Flächenmaße. Der statistische Vergleich der Flächen zeigte keine Größenunterschiede zwischen den hormonbehandelten und den Kontrolltieren in beiden Altersstufen (P10, T:  $4665165 \pm 431019\mu\text{m}^2$ ; K:  $4797815 \pm 631134\mu\text{m}^2$ ;  $t = 0,656$ ;  $df = 27$ ;  $P = 0,51$ ; AD, T:  $5720020 \pm 723999\mu\text{m}^2$ ; K:  $5928848 \pm 668831\mu\text{m}^2$ ;  $t = 0,789$ ;  $df = 27$ ;  $P = 0,44$ ) [siehe Abb. 4.8]. Jedoch wurde in der adulten Altersstufe unabhängig von der Hormon- bzw. Kontrollbehandlung eine signifikant größere Fläche des medialen Septums und Broca Bandes im Vergleich zu den P10-Tieren gemessen (P10/AD:  $t = -0,656$ ;  $df = 56$ ;  $P < 0,001$ ). Die Varianzanalyse deckte keinen Behandlungseffekt ( $F = 1,05$ ;  $P = 0,31$ ), einen positiven Alterseffekt ( $F = 43,25$ ;  $P < 0,001$ ) und keine Wechselwirkung zwischen Hormonbehandlung und Alter auf ( $F = 0,052$ ;  $P = 0,82$ ).



[Abb. 4.8]

**Abb. 4.8** stellt graphisch die Mittelwerte mit Standardabweichung der gemessenen Flächen des medialen Septums und Broca Bandes von Thyroxintieren (links) und Kontrolltieren (rechts) im Alter von zehn Tagen (schwarze Balken) und im adulten Alter (weiße Balken) dar. \*\*\*  $P < 0,001$  (Student t-Test)

### 4.9 Korrelationsanalysen

#### 4.9.1 Korrelationen zwischen den neurotrophen Faktoren

Die Analyse zeigte signifikante Zusammenhänge zwischen einzelnen Wachstumsfaktoren auf [siehe Tab. 4.9]. So korrelierte die Anzahl an BDNF immunpositiven Nervenzellen im medialen Septum und Broca Band positiv mit der Anzahl an NT-4/5 immunpositiven Nervenzellen (Pearsons Korrelationskoeffizient (PK) = 0,594,  $P < 0,01$ ). BDNF und auch NT-4/5 korrelierten mit keinem weiteren untersuchten Neurotrophin. Ferner deckte die Korrelationsanalyse einen ebenfalls signifikanten Zusammenhang zwischen NT-3 und NGF immunpositiven Nervenzellzahlen im medialen Septum und Broca Band auf (PK = 0,843,  $P < 0,01$ ). Auch hier bestand wie im Fall BDNF/NT-4/5 eine positive Korrelation, d.h. je größer die Anzahl an BDNF bzw. NT-3 immunpositiven Neuronen, desto größer die Anzahl an NT-

## 4 Ergebnisse

4/5 bzw. NGF immunpositiven Nervenzellen.

<b>Tab. 4.9.</b>		<b>NGF</b>	<b>BDNF</b>	<b>NT-3</b>	<b>NT-4/5</b>
<b>NGF</b>	PK		0,159	<b>0,843**</b>	0,001
	Signifikanz		0,64	<b>0,002</b>	0,997
	N		11	10	13
<b>BDNF</b>	PK	0,159		0,113	<b>0,594**</b>
	Signifikanz	0,64		0,713	<b>0,007</b>
	N	11		13	19
<b>NT-3</b>	PK	<b>0,843**</b>	0,113		0,199
	Signifikanz	<b>0,002</b>	0,713		0,536
	N	10	13		12
<b>NT-4/5</b>	PK	0,001	<b>0,594**</b>	0,199	
	Signifikanz	0,997	<b>0,007</b>	0,536	
	N	13	19	12	

\*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

**Tab. 4.9** stellt synoptisch die Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Pearson der immunpositiven Neurone im medialen Septum und Broca Band dar. PK = Pearsons Korrelationskoeffizient; N = Anzahl der Tiere

### 4.9.2 Korrelationen zwischen neurotrophen Faktoren und Verhalten

Die Analyse nach Pearson deckte korrelative Zusammenhänge zwischen neurotrophen Faktoren und Verhalten auf. Die Korrelationstabelle im Anhang stellt synoptisch die Ergebnisse der Korrelationen zwischen den neurotrophen Faktoren und kognitiven wie emotionalen Verhaltensparametern dar.

So errechnete die Analyse Korrelationen zwischen Neurotrophen im medialen Septum und dem Broca Band und räumlichen Lernverhalten im Radiallabyrinth. Die Analyse ergab eine negative Korrelation zwischen der NGF immunpositiven Nervenzellzahl und der benötigten Zeit im Radiallabyrinth an den letzten drei Versuchstagen (PK = - 0,561, P < 0,05) [siehe Abb.4.9 A].

Eine negative Korrelation stellte sich ebenfalls zwischen der Anzahl an BDNF immunpositiven Nervenzellen im medialen Septum und Broca Band und der benötigten Zeit, sowohl an den ersten als auch an den letzten drei Testtagen heraus (Tage 1-3: PK = -0,492, P < 0,05; Tage 8-10: PK = - 0,506, P < 0,05) [siehe Abb. 4.9 B].

Dieser Zusammenhang zwischen BDNF bzw. NGF immunpositiven Nervenzellzahlen im medialen Septum und Broca Band und der benötigten Zeit im Radiallabyrinth bedeutet, je größer die Zahl an immunpositiven Neuronen, desto weniger Zeit benötigten die Versuchstiere zur Absolvierung der Aufgabe im Radiallabyrinth.

Ferner fand sich eine positive Korrelation zwischen der Anzahl an NT-4/5 immunpositiven Nervenzellen und dem Lernparameter „Anzahl der Betretungen von neuen Armen aus 8“ im

## 4 Ergebnisse

Radiallabyrinth an den letzten drei Testtagen ( $PK = 0,475$ ,  $P < 0,05$ ) [siehe Abb. 4.9 C].

Zwischen der NT-3 immunpositiven Nervenzellzahl im medialen Septum und Broca Band und räumlichen Lernverhalten im Radiallabyrinth oder emotionalem Verhalten in Form von Angst im *Elevated Plus Maze* sind keine Zusammenhänge gefunden worden.

Ebenso stellten sich keine Zusammenhänge zwischen den weiteren Neurotrophinen neben NT-3 (NGF, BDNF, NT-4/5) im medialen Septum und dem Broca Band und emotionalem Verhalten in Form von Angst im *Elevated Plus Maze* heraus.

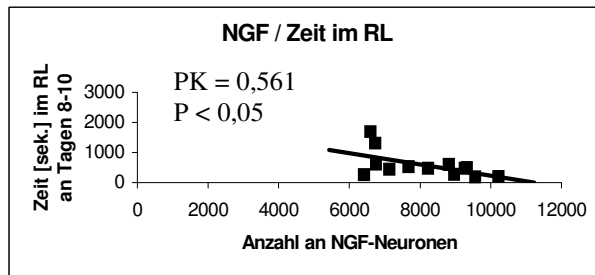


Abb. 4.9 A

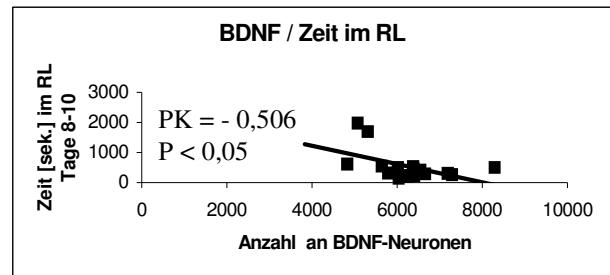


Abb. 4.9 B

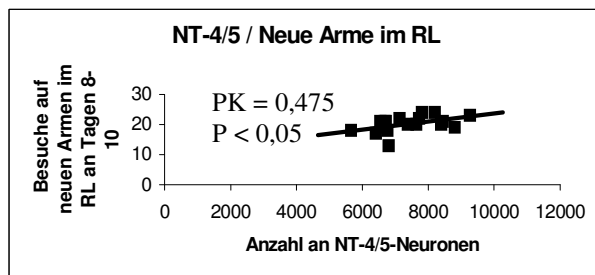


Abb. 4.9 C

Abb. 4.9 A bis 4.9 C stellen graphisch die Zusammenhänge der Anzahl an immunpositiven Neuronen im medialen Septum und Broca Band und Lernverhalten im Radiallabyrinth (RL) dar.

Abb. 4.9 A stellt graphisch mit Hilfe einer Regressionsgrade den korrelativen Zusammenhang zwischen der Anzahl an NGF immunpositiven Neuronen im medialen Septum und Broca Band und der benötigten Zeit im Radiallabyrinth dar.

Abb. 4.9 B stellt graphisch mit Hilfe einer Regressionsgrade den korrelativen Zusammenhang zwischen der Anzahl an BDNF immunpositiven Neuronen im medialen Septum und Broca Band und der benötigten Zeit im Radiallabyrinth dar.

Abb. 4.9 C stellt graphisch mit Hilfe einer Regressionsgrade den korrelativen Zusammenhang zwischen der Anzahl an NT-4/5 immunpositiven Neuronen im medialen Septum und Broca Band und den richtig besuchten neuen Armen aus den ersten 8 Armbesuchen im Radiallabyrinth dar.

PK = Pearson's Korrelationskoeffizient; P = Signifikanz



### 5 Diskussion

#### 5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen einen deutlichen Einfluss der frühen postnatalen Thyroxinbehandlung auf verschiedene untersuchte Parameter dar:

1. Die Thyroxinbehandlung beschleunigte die Entwicklung und Reifung der Tiere, was sich in einer früheren Öffnung der Augen, frühzeitigem Fellwachstum und in einer erhöhten Körpertemperatur der Thyroxintiere gegenüber den Kontrolltieren äußerte.
2. Das Körpergewicht der ausschließlich früh postnatal hormonbehandelten Tiere blieb bis in das adulte Alter unter dem der Kontrolltiere.
3. Die Thyroxinbehandlung verbesserte die räumliche Lernleistung im achttarmigen Radiallabyrinth. Adulte Thyroxintiere besuchten seltener bereits besuchte Arme als Kontrolltiere. Ferner benötigten Thyroxin behandelte Tiere weniger Zeit bis zur erfolgreichen Sammlung aller Futterbelohnungen im Radiallabyrinth.
4. Die Messung von emotionalem Verhalten im *Elevated Plus Maze* ergab bei den Thyroxin behandelten Tieren Anzeichen einer Anxiolyse, was sich am häufigeren Besuch und auch an den längeren Aufenthalten auf den offenen Armen abzeichnete.
5. Die Auswertung der Zahl der NGF, BDNF, NT-3 und NT-4/5 immunpositiven Neurone im medialen Septum und Broca Band deckte keine Unterschiede zwischen den hormonbehandelten Tieren und den Kontrolltieren auf.
6. Die Hormonbehandlung führte zu einer reduzierten Anzahl an BDNF immunpositiven Neuronen im medialen Septum und Broca Band der adulten Tiere im Vergleich zu den 10 Tage alten Tieren. Dieser Unterschied war im Vergleich der Kontrolltiere zu den zwei Zeitpunkten nicht signifikant.
7. Adulte Tiere hatten unabhängig von ihrer Zugehörigkeit zur Thyroxin- bzw. Kontrollgruppe eine größere Anzahl an NGF und NT-3 immunpositiven Neuronen im medialen Septum und Broca Band. Die Anzahl der BDNF und NT-4/5 immunpositiven Neurone in der ausgewerteten Region zeigte keinen Altersunterschied.
8. Die Korrelationsanalyse ergab eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der BDNF und NT-4/5 positiven Neurone im medialen Septum und Broca Band. Darüber hinaus wurde ein weiterer Zusammenhang zwischen der Anzahl an NGF und NT-3 immunpositiven Neuronen im medialen Septum und Broca Band gefunden.
9. Die Korrelationsanalyse zeigte weiterhin einen Zusammenhang zwischen räumlichen Lernverhalten im Radiallabyrinth und der Anzahl an BDNF, NGF und NT-4/5 immunpositiven Neuronen im medialen Septum und Broca Band.

10. Die im *Elevated Plus Maze* gemessenen Parameter des emotionalen Verhaltens in Form von Angst korrelierten mit keinem Neurotrophin bezüglich der immunpositiven Zellen im medialen Septum und Broca Band.

11. Adulte Tiere wiesen ein größeres Septum und Broca Band als 10 Tage alte Tiere auf.

### 5.2 Verhalten

Die generellen Beobachtungen einer beschleunigten Entwicklung der Thyroxin behandelten Tiere, wie früheres Augenöffnen, frühzeitiges Fellwachstum und erhöhte Körpertemperatur, weisen eine effektive subcutane Hormonapplikation nach. Diese Beobachtungen zeigen Merkmale einer frühen postnatalen Hyperthyreose und wurden in früheren Studien ebenfalls registriert (Roskoden et al., 1999). Damit ist eine Reliabilität und auch Validität der in dieser und auch früheren Arbeiten angewandten Methodik der Hormonapplikation mit wirksam erhöhten Hormonspiegeln nachgewiesen. Die Effektivität der Hormonapplikation spiegelte sich als Nebenbefund im unterschiedlichen Körpergewicht und Habitus wieder. Thyroxin behandelte Tiere blieben bis in das adulte Alter kleiner und behielten ein geringeres Körpergewicht als die gleichaltrigen Tiere der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis steht zunächst im Gegensatz zu einer anderen Entwicklungsstudie von Sala-Roca et al. (2002). Die Studie deckte keinen Unterschied im Körpergewicht zwischen Thyroxin behandelten Tieren und Kontrolltieren auf. Der Grund für diese Diskrepanz könnte in methodologischen Unterschieden gefunden werden. Zwar wurden die Versuche dieser Studie ebenso mit Hilfe von Wistar-Ratten absolviert, jedoch wurde Thyroxin enteral per os mit dem Trinkwasser verabreicht und nicht in definierten Mengen subcutan. Diese unterschiedlichen Hormon-Applikationswege könnten eine Erklärung für die Diskrepanz der Studienergebnisse liefern. Ferner verdeutlicht dieses, wie einflussreich die Methodik auf die erfassten Ergebnisse einer Studie ist.

Zur Testung von räumlichen Lernvermögen wurde das Radiallabyrinth gewählt. Dieses Verfahren wurde als adäquat empfunden, da es in den vergangenen Jahren ein etabliertes Mittel zur Testung von verschiedenen Aspekten von räumlichen Lernen und Gedächtnis darstellt (Olton und Papas, 1979; Bolhuis et al., 1986; Schwegler und Crusio, 1995). Räumliches Lernen und Gedächtnis sind von der Leistung und Intaktheit des septo-hippocampalen Systems abhängig. Dieses zeigte sich besonders in Läsionsstudien des Hippocampus und Septums (Walsh et al., 1996).

## 5 Diskussion

---

Eine früh postnatale Thyroxinbehandlung induziert morphologische Alterationen im septo-hippocampalen System, wie z.B. ein größeres Terminationsgebiet der infrapyramidalen Moosfasern in der CA3-Region (Lauder und Mugnaini, 1980). Bei Mäusen wurde gezeigt, dass diese morphologischen Alterationen durch eine transiente, früh postnatale Hyperthyreose, von einem verbesserten räumlichen Lernvermögen im Radiallabyrinth begleitet werden (Schwegler et al., 1991). Die vorliegende Arbeit hat dargestellt, dass auch die räumliche Lernleistung von Wistar-Ratten durch eine früh postnatale Hormonbehandlung gesteigert wird. Die Thyroxin behandelten Ratten verursachten weniger Fehler durch Betreten eines bereits besuchten Armes (WME) als die Kontrolltiere, und sie besuchten mehr neue Arme unter den ersten 8 Armbesuchen. Ähnliche Ergebnisse wurden in einer Studie von Smith et al. (2002) erzielt, jedoch wurden hier adulte Ratten mit Thyroxin behandelt, und es wurde ein Wasserlabyrinth angewandt.

Ein methodisches Problem des Radiallabyrinths besteht darin, dass die Versuchstiere Lernstrategien aufbauen, um die Aufgabe des Labyrinths erfolgreich zu absolvieren. So entwickeln Versuchstiere eine Tendenz, den benachbarten Arm oder den nächsten Arm in einem bestimmten Winkel (z.B. 45 °; 90 °) zu besuchen. Es werden somit kinästhetische Strategien aufgebaut, womit die hippocampale Komponente im räumlichen Lernen nicht hinreichend sicher zu messen ist. Um solche Lernstrategien zu unterbinden, kann die Testapparatur des Radiallabyrinths durch Türen an den Eingängen der Labyrintharme modifiziert werden (Schwegler und Crusio, 1995). Diese Türen haben die Funktion, die Eingänge aller Arme nach jedem Armbesuch bei Erreichen der zentralen Plattform durch das Versuchstier für eine bestimmte Zeit im Sekundenbereich zu verschliessen. Diese Maßnahme hindert die Versuchstiere daran, kinästhetische Strategien aufzubauen. Jedoch zeigte Yoerg S.I. und Kamil A.C (1982) in Übereinstimmung mit früheren Studien von Olton (1977), dass räumliches Lernen und kinästhetische Strategien im Radiallabyrinth unabhängig voneinander sind. Darüber hinaus zeigten Studien unter Benutzung einer modifizierten Testapparatur mit Türen an den Eingängen der Arme, dass zwar die Versuchstiere seltener die direkt benachbarten Arme besuchten (Schwegler et al., 1990), jedoch wurden annähernd gleiche Ergebnisse mit Testapparaturen ohne Türen an den Eingängen der Arme erzielt (Crusio et al., 1987).

In dieser Arbeit wurde ein unmodifiziertes konventionelles Radiallabyrinth ohne Türen an den Eingängen der Arme benutzt. Da vereinzelt sowohl in der Thyroxingruppe als auch in der Kontrollgruppe kinästhetische Strategien an einzelnen Testtagen von unterschiedlichen Tieren benutzt wurden, wäre es interessant, das in dieser Arbeit erzielte Ergebnis der verbesserten

## 5 Diskussion

---

Lernleistung durch eine früh postnatale Thyroxinbehandlung in einer modifizierten Testapparatur zu reproduzieren.

Emotionalität hat einen nicht unbedeutenden Einfluss auf Lernen (Cahill und McGaugh, 1996; Richter-Levin und Akirav, 2000; McIntyre et al., 2003). Dieses zeigte sich beispielsweise an Ratten, welche Unterschiede in der Emotionalität in Form von Angst aufweisen. BDE-Ratten z.B. gelten als sehr emotional und DA-Ratten wiederum nicht (Pellow et al., 1985). BDE-Ratten verfallen häufiger während Verhaltenstests in völlige Regungslosigkeit (*freezing*) und besuchen seltener die offenen Arme eines *Elevated Plus Maze*, was durch einen hohen Grad an Emotionalität in Form von Angst erklärt werden kann. Bei DA-Ratten lässt sich ein gegensätzliches Verhalten beobachten. Im Radiallabyrinth weisen DA-Ratten ein besseres räumliches Lernvermögen auf (Prior et al., 1997).

Pharmakologisch erzeugte reduzierte Angst bei Ratten resultierte in ein verbessertes räumliches Lernvermögen im Radiallabyrinth (Marczynski und Urbancic, 1988), was die Bedeutung von Emotionalität in Form von Angst im räumlichen Lernen im Radiallabyrinth unterstreicht.

Um emotionales Verhalten zu quantifizieren, wurde in dieser Arbeit das *Elevated Plus Maze* appliziert. Die früh postnatal Thyroxin behandelten Tiere betraten häufiger und länger als Kontrolltiere die offenen Arme des *Elevated Plus Maze*. Das weniger ängstliche Verhalten der Thyroxintiere wird außerdem noch dadurch unterstrichen, dass die Summe aller Armbesuche, d.h. die Besuche der offenen und geschlossenen Arme, zwischen der Thyroxin- und der Kontrollgruppe nicht unterschiedlich war. Damit kann der häufigere Besuch der offenen Arme der Thyroxintiere nicht durch eine erhöhte motorische Aktivität begründet werden. Ferner absolvierten Thyroxintiere die Aufgabe im Radiallabyrinth besser als die Kontrolltiere. Daher sind die Thyroxin behandelten Tiere vergleichbar mit den als wenig emotional geltenden DA-Ratten. Vor diesem Hintergrund ist nicht auszuschließen, dass ein geringeres Angstniveau der Thyroxintiere die bessere Lernleistung mitbegründet.

Besonders interessant sind die in dieser Arbeit aufgezeigten Korrelationen zwischen räumlichen Lernverhalten und der Anzahl von Neurotrophin immunpositiven Neuronen im medialen Septum und Broca Band. Je größer die Anzahl an NGF und BDNF immunpositiven Neuronen in der untersuchten Region, desto schneller erfüllten die Ratten die Aufgabenstellung im Radiallabyrinth. NT-3 und NT-4/5 zeigten keinen korrelativen Zusammenhang mit der benötigten Zeit im Radiallabyrinth, was auf einen selektiven Zusammenhang zwischen NGF und BDNF im medialen Septum und Broca-Band bezüglich räumlichen Lernens hindeutet. Allerdings korrelierte die Anzahl an NT-4/5 mit der Anzahl an

## 5 Diskussion

---

neu besuchten Armen aus den ersten 8 Armbesuchen, womit NT-4/5 nicht ganz unbedeutend im räumlichen Lernen zu sein scheint. Ein Zusammenhang zwischen räumlichen Lernverhalten und dem Neurotrophinsystem der NGF-Familie wurde, wie in der Einleitung bereits beschrieben, schon in mehreren Studien nachgewiesen (Linnarson et al., 1997; Schaaf et al., 2001; Pelleymounteur et al., 1993; Pallage et al., 1993). Aus diesem Grunde sind die in dieser Arbeit aufgezeigten korrelativen Zusammenhänge nicht ganz überraschend. Unklar ist, welcher Mechanismus sich hinter diesem Zusammenhang zwischen den Neurotrophenen der NGF-Familie mit besonderer Bedeutung von NGF und BDNF und dem räumlichen Lernverhalten verbirgt. Sehr wahrscheinlich sind hippocampo-septale Transmittersysteme daran beteiligt. Die prominente Bedeutung vom cholinergen System im Lernverhalten deutet auf dieses System (Zola-Morgan et al., 1993). Ein Zusammenhang zwischen dem cholinergen System im medialen Septum und Broca Band und dem Neurotrophinsystem der NGF-Familie wurde bereits nachgewiesen. Insbesondere Läsionsstudien bewiesen die wichtige Rolle von Neurotrophenen der NGF-Familie für das cholinerge System im medialen Septum und Broca Band. So sind beispielsweise NGF und auch im geringeren Umfang BDNF Substitutionen in der Lage, den Rückgang an Markern des Acetylcholinstoffwechsels (ChAT; AChE) nach Läsion der Hauptbahn zwischen dem medialen Septum und Hippocampus der Fimbria-Fornix zu reduzieren oder sogar zu unterbinden (Burke et al., 1994).

Die Korrelationsanalyse zeigte keine Zusammenhänge zwischen emotionalem Verhalten in Form von Angst im *Elevated Plus Maze* und dem Neurotrophinsystem der NGF-Familie im medialen Septum und Broca Band. Der Grund für diesen fehlenden Zusammenhang könnte darin liegen, dass die untersuchte Region nur zu geringen Teilen in emotionalem Verhalten in Form von Angst involviert ist. In Angstverhalten ist die Amygdala in besonderer Art und Weise involviert (LeDoux, 2003; Amaral und Corbett, 2003). Die deutliche Anxiolyse durch die frühe postnatale Thyroxinbehandlung ist daher ein Hinweis darauf, dass morphologische Alterationen auch in der Amygdala ausgelöst werden. So sind peptiderge Neurone der Amygdala besonders in der Kontrolle von emotionalem Verhalten involviert. Unter den Neuropeptiden wird das Neuropeptid Y (NPY) mit anxiolytischem Verhalten in Verbindung gebracht (Heilig et al., 1989), *Corticotropin Releasing Factor* hingegen mit anxiogenem Verhalten (Smith et al., 1998, Stenzel-Poore et al., 1994). Eine frühe postnatale Hyperthyreose führte neben einem anxiolytischem Verhalten im *Elevated Plus Maze* zu einer größeren Anzahl an NPY immunpositiven Neuronen und zu einer reduzierten Anzahl an CRF immunpositiven Neuronen im zentralen und basolateralen Kern der Amygdala. (Yilmazer-Hanke et al., 2004).

## 5 Diskussion

---

Neurotrophine der NGF-Familie könnten auch in der Amygdala an der Mediation der morphologischen Alterationen durch Schilddrüsenhormone beteiligt sein. Weitere Untersuchungen wären nötig, um dieser Hypothese nachzugehen.

### 5.2 Neurotrophinsystem

Studien auf mRNA-Ebene während der ersten drei postnatalen Wochen deuteten auf eine durch Thyroxin induzierte Hochregulation der Neurotrophin-mRNA im Hippocampus und Septum hin (Lüsse et al., 1998). Besonders auffallende Unterschiede waren um den zehnten postnatalen Tag beobachtet worden. Diese waren begleitet von einer erhöhten Protein-Expression im septo-hippocampalen System (bisher unveröffentlicht).

Die Ergebnisse dieser Arbeit ergaben, dass die Hochregulation der mRNA- und Protein-Expression durch eine transiente, früh postnatale Hyperthyreose aller Neurotrophine der NGF-Familie (NGF, BDNF, NT-3; NT-4/5) weder bei den 10 Tage alten Tieren noch bei den adulten Tieren in einer erhöhten Anzahl an Neurotrophin immunpositiven Neuronen im medialen Septum und Broca Band resultierten.

Ein möglicher Grund für die mangelnde immunhistochemische Detektion einer erhöhten Anzahl an Neurotrophin immunpositiven Neuronen im medialen Septum und Broca Band nach einer transienten, postnatalen Hyperthyreose könnte ein fehlerhaftes Untersuchungsfenster sein.

Da auf mRNA- und Protein-Ebene bereits deutliche Effekte während der ersten 2 postnatalen Wochen um den 10. Tag beobachtet worden sind, scheint dieser Grund jedoch eher unwahrscheinlich zu sein.

Eine Studie von Roskoden et al. (2004) beleuchtete den Einfluss einer früh postnatalen Corticosteron-Administration auf die Neurotrophin mRNA- und Protein-Expression im septo-hippocampalen System von Ratten. Die Ergebnisse dieser Studie demonstrierten einen Einfluss von Corticosteron auf die Neurotrophin Expression im Hippocampus während der ersten 2 postnatalen Wochen mit deutlichen Auswirkungen in der 2. postnatalen Woche. Damit gehen die Resultate dieser Studie teilweise konform mit den Ergebnissen einer frühen postnatalen Thyroxin-Applikation. Aus diesem Grunde erscheint das gewählte Untersuchungsfenster dieser vorliegenden Arbeit, einen prominenten und für externe Einflüsse wie Hormonbehandlungen vulnerablen Abschnitt in der Entwicklung des septo-hippocampalen Systems abzubilden.

Ein weiterer möglicher Grund für die Diskrepanz zwischen der erhöhten mRNA- bzw. Protein-Expression und der unveränderten Anzahl an immunpositiven Neuronen im medialen

## 5 Diskussion

---

Septum und Broca Band könnte in der Physiologie des Neurotrophinsystems der NGF-Familie liegen. Diskrepanzen zwischen der mRNA-Expression und der Protein-Expression und damit der immunhistochemisch detektablen Anzahl an Neuronen sind bekannt und auch im Neurotrophinsystem der NGF-Familie beschrieben worden (Large et al., 1986). So fand man beispielsweise im visuellen Cortex von 13 Tage alten Ratten zwar in allen Schichten des visuellen Cortex BDNF-mRNA, diese war aber nicht begleitet von einem gleichzeitigem Vorhandensein von BDNF-Protein (Tropea et al., 2001). Der Unterschied zwischen mRNA- bzw. Protein-Expression und der immunhistochemischen Detektion von Neurotrophin positiven Neuronen ist ferner durch einen weiteren physiologischen Aspekt erklärbar. So werden Neurotrophine sowohl retrograd als auch anterograd transportiert und autokrine und parakrine Wirkungen sind beschrieben worden (Philips et al., 1990; Merlio et al., 1993; Barbacid et al., 1994; Schecterson, 1992; Acheston et al., 1992). Daher kann der Ort der mRNA Transkription und Protein-Expression auf Grund eines interzellulären Austausches und Transportes auch unterschiedlich von der Lokalisation und vom Wirkungsort des translatierten Proteins sein (Altar et al., 1997).

Ein methodisches Problem der Immunhistochemie besteht darin, dass der benutzte Antikörper auf Grund unzureichender Penetration nicht bis zum nachzuweisenden Protein gelangt. Um dieses Problem zu minimieren, wurde in dieser Arbeit eine frei flottierende Immunhistochemie angewandt. Diese ermöglicht die Antikörperpenetration von zwei Seiten. Darüber hinaus wurden die zu untersuchenden Hirne tiefgekühlt zwischengelagert, was eine Zerstörung der Zellmembranen bewirkt und damit die Penetration der Antikörper erhöht. Die Immunhistochemie ist eine sichere und etablierte Methode, um Proteine - wie die Neurotrophine der NGF-Familie - in Geweben zu detektieren und zu lokalisieren. Sie gibt aber keine sichere Auskunft darüber, in welchen Mengen das Protein exprimiert wird. Auf Grund der Hochregulation der Neurotrophine auf mRNA und Protein-Ebene lässt sich die Hypothese aufstellen, dass zwar die Thyroxinbehandlung die Anzahl der Neurotrophin bildenden Zellen im medialen Septum und Broca Band nicht beeinflusst, die Produktion der einzelnen Neurone könnte jedoch gesteigert sein. Zur Zeit existiert noch keine sichere Methode, Einzelzellproteinbestimmungen durchzuführen, daher lässt sich die gestellte Hypothese noch nicht hinreichend sicher verifizieren.

Unklar bleibt, warum in der adulten Thyroxingruppe eine Reduktion von BDNF-immunpositiven Zellen im medialen Septum und Broca Band verzeichnet worden ist. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die postnatale Thyroxinbehandlung ein Zellsterben induziert hat. Bei Vögeln wurde gezeigt, dass eine Hyperthyreose zu einem Absterben von Neuronen in

## 5 Diskussion

---

bestimmten Thyroxin-Rezeptor positiven Hirnregionen führt (Tekumalla et al., 2002). Auch könnten Neurotrophine an der Mediation dieser Thyroxin-Effekte beteiligt sein (Friedmann, 2000). Bekannt ist auch, dass der niedrig affine Neurotrophin Rezeptor p75 Neuronensterben in Form einer Apoptose induzieren kann (MacEwan, 1996).

Die Auszählung der Neurotrophin positiven Neurone im medialen Septum und Broca Band zeigte korrelative Zusammenhänge zwischen einzelnen Neurotrophinen. So korrelierte die Anzahl der BDNF immunpositiven Neurone mit der Anzahl von NT-4/5 positiven Neuronen. Dieses Ergebnis überrascht nicht, da BDNF und NT-4/5 über den gleichen Rezeptor TrkB ihre Wirkungen entfalten, was auf ein synergistisches Verhältnis dieser beiden Faktoren hindeutet (Barbacid, 1994; Bothwell, 1994). Da auch korrelative Zusammenhänge zwischen der Anzahl an NGF und NT-3 immunpositiven Neuronen im medialen Septum und Broca Band gefunden wurden und NGF wie auch NT-3 über den Neurotrophin-Rezeptor TrkA wirken, scheint auch hier ein synergistisches Verhältnis dieser beiden Neurotrophine im medialen Septum und Broca Band vorzuliegen.



### 6 Zusammenfassung

Die Entwicklung und Reifung des zentralen Nervensystems wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Schilddrüsenhormonen auf die Entwicklung und Reifung des septo-hippocampalen Systems untersucht. Morphologische und auch Verhaltensänderungen durch eine frühe postnatale Hyperthyreose sind bekannt. So führt eine frühe postnatale Thyroxinbehandlung beispielsweise zu einer Zunahme der besonders in kognitiven Funktionen involvierten cholinergen Neurone im medialen Septum. Bezüglich des Verhaltens wurde bisher nur bei Mäusen eine gesteigerte räumliche Lernleistung registriert.

Unter den möglichen Mediatoren der Schilddrüsenhormone im septo-hippocampalen System sind die Neurotrophine der NGF-Familie attraktive Kandidaten. Die Hauptproduktionsorte der Neurotrophine im zentralen Nervensystem sind hippocampale Neurone und auch Neurone im Gyrus dentatus. Von dort aus werden Neurotrophine der NGF-Familie nach Internalisierung axonal in verschiedene Hirnregionen und insbesondere auch in das mediale Septum und Broca Band transportiert. Eine frühe transiente postnatale Hyperthyreose ist in der Lage, dieses System hinsichtlich einer Hochregulation der mRNA und Protein-Expression der NGF-Familie zu modulieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben mit immunhistochemischen Methoden zur Visualisierung und Quantifizierung von Neuronen dargestellt, dass die Hochregulation der Neurotrophin mRNA und Protein-Expression im septo-hippocampalen Systems, nicht zu einer erhöhten Anzahl an Neurotrophin exprimierenden Neuronen im medialen Septum und Broca Band führt. Es wurde in diesem Kontext die Hypothese aufgestellt, dass der Proteingehalt pro exprimierendes Neuron vermehrt sein könnte. Diese Hypothese lässt sich jedoch zur Zeit nicht durch eine Einzelzellproteinbestimmung verifizieren.

Die transiente postnatale Hormonbehandlung führte zu einer verbesserten räumlichen Lernleistung im Radiallabyrinth. Im *Elevated Plus Maze* zeigten die hormonbehandelten Tiere ein anxiolytisches Verhalten. Damit wurde gezeigt, dass stabile Effekte hinsichtlich des Verhaltens bis in das adulte Alter nach einer transienten postnatalen Behandlung auftreten. Darüber hinaus wurden Zusammenhänge zwischen kognitivem Verhalten und dem Neurotrophinsystem im septo-hippocampalen System beobachtet. Zwischen dem Neurotrophinsystem der NGF-Familie im medialen Septum und Broca Band und emotionalem Verhalten in Form von Angst wurden keine Zusammenhänge nachgewiesen.

Abschliessend hat diese Arbeit die Hypothese untermauert, dass Neurotrophine der NGF-Familie bedeutende Mediatoren der Schilddrüsenhormone im septo-hippocampalen System sein könnten.

### 7 Literaturverzeichnis

1. Acheson, A., Conover, J.C., Fandl, J.P., DeChiara, T.M., Russell, M., Thadani, A., Squinto, S.P., Yancopoulos, G.D., and Lindsay, R.M. (1995). A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* 374, 450-453.
2. Alheid, G.F. and Heimer, L. (1988). New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: The striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience* 27, 1-39.
3. Altar, C.A., Cai, N., Bliven, T., Juhasz, M., Conner, J.M., Acheson, A.L., Lindsay, R.M., and Wiegand, S.J. (1997). Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* 389, 856-860.
4. Altar, C.A., Siuciak, J.A., Wright, P., Ip, N.Y., Lindsay, R.M., and Wiegand, S.J. (1994). In situ hybridization of trkB and trkC receptor mRNA in rat forebrain and association with high-affinity binding of [125I]BDNF, [125I]NT-4/5 and [125I]NT-3. *Eur J Neurosci* 6, 1389-1405.
5. Alvarez-Dolado, M., Iglesias, T., Rodriguez-Pena, A., Bernal, J., and Munoz, A. (1994). Expression of neurotrophins and the trk family of neurotrophin receptors in normal and hypothyroid rat brain. *Brain Res Mol. Brain Res.* 27, 249-257.
6. Amaral, D.G. and Corbett, B.A. (2003). The amygdala, autism and anxiety. *Novartis Found. Symp.* 251, 177-187.
7. Amaral, D.G. and Kurz, J. (1985). An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J. Comp Neurol.* 240, 37-59.
8. Amaral, D.G. and Witter, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571-591.
9. Armstrong, D.M., Bruce, G., Hersh, L.B., and Gage, F.H. (1987). Development of cholinergic neurons in the septal/diagonal band complex of the rat. *Brain Res.* 433, 249-256.
10. Balazs, R., Kovacs, S., Cocks, W.A., Johnson, A.L., and Eayrs, J.T. (1971). Effect of thyroid hormone on the biochemical maturation of rat brain: postnatal cell formation. *Brain Res.* 25, 555-570.
11. Barbacid, M. (1994). The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 25, 1386-1403.
12. Barbacid, M. (1995). Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol* 7, 148-155.
13. Barde, Y.A., Edgar, D., and Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1, 549-553.
14. Bartus, R.T. (2000). On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp. Neurol.* 163, 495-529.
15. Bartus, R.T., Dean, R.L., Beer, B., and Lippa, A.S. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217, 408-417.
16. Bauer, M. and Whybrow, P.C. (2003). Thyroid hormone and mood modulation: new insights from functional brain imaging techniques. *Curr. Psychiatry Rep.* 5, 163-165.
17. Bayer, S.A. (1980). Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J. Comp Neurol.* 190, 115-134.
18. Bolhuis, J.J., Bijlsma, S., and Ansmink, P. (1986). Exponential decay of spatial memory of rats in a radial maze. *Behav. Neural Biol.* 46, 115-122.

## 7 Literaturverzeichnis

---

19. Bothwell,M. (1995). Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci* 18, 223-253.
20. Bradley,D.J., Towle,H.C., and Young,W.S., III (1992). Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. *J.Neurosci.* 12, 2288-2302.
21. Burke,M.A., Mobley,W.C., Cho,J., Wiegand,S.J., Lindsay,R.M., Mufson,E.J., and Kordower,J.H. (1994). Loss of developing cholinergic basal forebrain neurons following excitotoxic lesions of the hippocampus: rescue by neurotrophins. *Exp Neurol* 130, 178-195.
22. Burns,S.M. (1982). Telencephalon of rodents. In *Comparative Correlative Neuroanatomy of the Vertebrate Telencephalon.*, E. C. Crosby and H. N. Schnitzlein, eds. (New York: MacMillan Publishing Co.), pp. 373-406.
23. Cahill,L. and McGaugh,J.L. (1996). Modulation of memory storage. *Curr.Opin.Neurobiol.* 6, 237-242.
24. Calza,L., Giardino,L., and Aloe,L. (1997). Thyroid hormone regulates NGF content and p75LNGFR expression in the basal forebrain of adult rats. *Exp Neurol* 143, 196-206.
25. Ceccatelli,S., Ernfors,P., Villar,M.J., Persson,H., and Hokfelt,T. (1991). Expanded distribution of mRNA for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the rat brain after colchicine treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10352-10356.
26. Chantoux,F., Blondeau,J.P., and Francon,J. (1995). Characterization of the thyroid hormone transport system of cerebrocortical rat neurons in primary culture. *J.Neurochem.* 65, 2549-2554.
27. Chao,M.V. (1994). The p75 neurotrophin receptor. *J Neurobiol* 25, 1373-1385.
28. Chen,J. (1991). [Gene regulation during NGF--induced differentiation of neuroblastoma cells]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 20, 7-10.
29. Cocks,J.A., Balazs,R., and Eayrs,J.T. (1969). The effect of thyroid hormones on the biochemical maturation of the rat brain. *Biochem.J.* 111, 18P.
30. Coggeshall,R.E. and Lekan,H.A. (1996). Methods for Determining Numbers of Cells and Synapses: A Case for More Uniform Standards of Review. *J.Comp.Neurol.* 364, 6-15.
31. Cohen,S. and Levi-Montalcini,R. . (1956). A nerve growth stimulating factor isolated from snake venom. *Proc Natl Acad Sci U S A* 42, 571-574 .
32. Cohen,S., Levi-Montalcini,R., and Hamburger,V (1954). A nerve growth stimulating factor isolated from sarcomas 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A* 40, 1014-1018.
33. Conner,J.M., Lauterborn,J.C., Yan,Q., Gall,C.M., and Varon,S. (1997). Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci* 17, 2295-2313.
34. Coyle,J.T., Price,D.L., and DeLong,M.R. (1983). Alzheimer's disease: A disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219, 1184-1190.
35. Crusio,W.E., Schwegler,H., and Lipp,H.P. (1987). Radial-maze performance and structural variation of the hippocampus in mice: a correlation with mossy fibre distribution. *Brain Res.* 425, 182-185.
36. Davies,S.J.A., Field,P.M., and Raisman,G. (1993). Long fibre growth by axons of embryonic mouse hippocampal neurons micro-transplanted into the adult rat fimbria. *Eur.J.Neurosci.* 5, 95-106.
37. DeFrance,J.F.ed. (1976). *The Septal Nuclei.* (New York, London: Plenum Press), pp. 1-539.
38. Delange,F. (1996). Administration of iodized oil during pregnancy: a summary of the published evidence. *Bull.World Health Organ* 74, 101-108.

## 7 Literaturverzeichnis

---

39. DeLong,G.R. (1996). Iodine and brain development. *Dev.Med.Child Neurol.* 38, 279-282.
40. Diez-Guerra,J., Aragon,M.C., Gimenez,C., and Valdivieso,F. (1980). Effect of thyroid hormones on the 3-oxo acid CoA-transferase activity in rat brain during development. *Enzyme* 25, 106-110.
41. Ebendal,T. (1992). Function and evolution in the NGF-family and its receptors. *J.Neurosc. Res.* 32, 461-470 .
42. Eide,F.F., Lowenstein,D.H., and Reichardt,L.F. (1993). Neurotrophins and their receptors--current concepts and implications for neurologic disease. *Exp Neurol* 121, 200-214.
43. Ernfors,P., Wetmore,C., Olson,L., and Persson,H. (1990). Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* 5, 511-526.
44. Evans,R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.
45. Farsetti,A., Mitsuhashi,T., Desvergne,B., Robbins,J., and Nikodem,V.M. (1991). Molecular basis of thyroid hormone regulation of myelin basic protein gene expression in rodent brain. *J.Biol.Chem.* 266, 23226-23232.
46. Friedman,W.J. (2000). Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J.Neurosci.* 20, 6340-6346.
47. Friedman,W.J., Black,I.B., and Kaplan,D.R. (1998). Distribution of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 in the postnatal rat brain: an immunocytochemical study. *Neuroscience* 84, 101-114.
48. Gahwiler,B.H., Rietschin,L., and Gerber,U. (1991). Cholinergic fiber growth in co-cultures of CNS tissue. *J Physiol (Paris)* 85, 154-157.
49. Gaykema,R.P.A., Luiten,P.G.M., Nyakas,C., and Traber,J. (1990). Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. *Journal of Comparative Neurology* 293, 103-124.
50. Gibbs,R.B. (1998). Levels of trkA and BDNF mRNA, but not NGF mRNA, fluctuate across the estrous cycle and increase in response to acute hormone replacement. *Brain Res* 787, 259-268.
51. Giordano,T., Pan,J.B., Casuto,D., Watanabe,S., and Arneric,S.P. (1992). Thyroid hormone regulation of NGF, NT-3 and BDNF RNA in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 16, 239-245.
52. Gotz,R., Koster,R., Winkler,C., Raulf,F., Lottspeich,F., Schartl,M., and Thoenen,H. (1994). Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* 372, 266-269.
53. Gundersen,H.J., Bagger,P., Bendtsen,T.F., Evans,S.M., Korbo,L., Marcussen,N., Moller,A., Nielsen,K., Nyengaard,J.R., Pakkenberg,B., and et al (1988). The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96, 857-881.
54. Hansson,A.C., Cintra,A., Belluardo,N., Sommer,W., Bhatnagar,M., Bader,M., Ganten,D., and Fuxe,K. (2000). Gluco- and mineralocorticoid receptor-mediated regulation of neurotrophic factor gene expression in the dorsal hippocampus and the neocortex of the rat. *Eur.J.Neurosci.*2000 Aug.;12.(8.):2918.-34. 12, 2918-2934.
55. Hartikka,J. and Hefti,F. (1988). Development of septal cholinergic neurons in culture: plating density and glial cells modulate effects of NGF on survival, fiber growth, and expression of transmitter-specific enzymes. *J.Neurosci.* 8, 2967-2985.

## 7 Literaturverzeichnis

---

56. Hashimoto, Y., Furukawa, S., Omae, F., Miyama, Y., and Hayashi, K. (1994). Correlative regulation of nerve growth factor level and choline acetyltransferase activity by thyroxine in particular regions of infant rat brain. *J Neurochem* 63, 326-332.
57. Heilig, M., Soderpalm, B., Engel, J.A., Widerlov, E. (1989). Centrally administered neuropeptide Y (NPY) produces anxiolytic-like effects in animal anxiety models. *Psychopharmacol (Berl.)* 98, 524-529.
58. Heimrich, B. and Frotscher, M. (1993). Formation of the septohippocampal projection in vitro: an electron microscopic immunocytochemical study of cholinergic synapses. *Neuroscience* 52, 815-827.
59. Hendry, I.A. and Crouch, M.F. (1991). Retrograde axonal transport of the GTP-binding protein Gi alpha: a potential neurotrophic intra-axonal messenger. *Neurosci Lett* 133, 29-32.
60. Hetzel, B.S. (2000). Iodine and neuropsychological development. *J.Nutr.* 130(2S.Suppl.), 493S-495S.
61. Holtzman, D.M., Kilbridge, J., Li, Y., Cunningham, E.T.J., Lenn, N.J., Clary, D.O., Reichardt, L.F., and Mobley, W.C. (1995). TrkA expression in the CNS: evidence for the existence of several novel NGF-responsive CNS neurons. *J Neurosci* 15, 1567-1576.
62. Huang, E.J. and Reichardt, L.F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24, 677-736.
63. Ip, N.Y., Stitt, T.N., Tapley, P., Klein, R., Glass, D.J., Fandl, J., Greene, L.A., Barbacid, M., and Yancopoulos, G.D. (1993). Similarities and differences in the way neurotrophins interact with the Trk receptors in neuronal and nonneuronal cells. *Neuron* 10, 137-149.
64. Kiss, J., Patel, A.J., and Freund, T.F. (1990). Distribution of septohippocampal neurons containing parvalbumin or choline acetyltransferase in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology* 298, 362-372.
65. Klein, A.H., Meltzer, S., and Kenny, F.M. (1972). Improved prognosis in congenital hypothyroidism treated before age three months. *J.Pediatr.* 81, 912-915.
66. Klein, R.Z., Sargent, J.D., Larsen, P.R., Waisbren, S.E., Haddow, J.E., and Mitchell, M.L. (2001). Relation of severity of maternal hypothyroidism to cognitive development of offspring. *J.Med.Screen.* 8, 18-20.
67. Köhler, C., Chan-Palay, V., and Wu, J.-Y. (1984). Septal neurons containing glutamic acid decarboxylase immunoreactivity project to the hippocampal region in the rat brain. *Anatomy and Embryology* 169, 41-44.
68. Kramer, B.M., Van der Zee, C.E., and Hagg, T. (1999). P75 nerve growth factor receptor is important for retrograde transport of neurotrophins in adult cholinergic basal forebrain neurons [In Process Citation]. *Neuroscience* 94, 1163-1172.
69. Lai, K.O., Fu, W.Y., Ip, F.C., and Ip, N.Y. (1998). Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. *Mol Cell Neurosci* 11, 64-76.
70. Large, T.H., Bodary, S.C., Clegg, D.O., Weskamp, G., Otten, U., and Reichardt, L.F. (1986). Nerve growth factor gene expression in the developing rat brain. *Science* 234, 352-355.
71. Lauder, J. and Mugnaini, E. (1977). Early hyperthyroidism alters the distribution of mossy fibres in the rat hippocampus. *Nature* 268, 335-337.
72. Lauder, J.M. and Mugnaini, E. (1980). Infrapyramidal Mossy Fibers in the Hippocampus of the Hyperthyroid Rat. *Dev.Neurosci* 3, 248-265.
73. Lazar, M.A. (1993). Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr.Rev.* 14, 184-193.
74. LeDoux, J. (2003). The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol.Neurobiol.* 23, 727-738.

## 7 Literaturverzeichnis

---

75. Levi-Montalcini,R. Effects of mouse tumor transplantation on the nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 55, 330-343. 1952.
76. Levi-Montalcini,R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237, 1154-1162.
77. Lewin,G.R. and Barde,Y.A. (1996). Physiology of the neurotrophins. *Annu.Rev.Neurosci.* 19, 289-317.
78. Lewis,P.R. and Shute,C.C.D. (1967). The cholinergic limbic system: projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subfornical organ and supra-optic crest. *Brain* 90, 521-540.
79. Lindsay,R.M. (1994). Neurotrophins and receptors. *Prog Brain Res* 103, 3-14.
80. Linke,R. and Frotscher,M. (1993). Development of the rat septohippocampal projection: Tracing with DiI and electron microscopy of identified growth cones. *Journal of Comparative Neurology* 332, 69-88.
81. Linnarsson,S., Bjorklund,A., and Ernfors,P. (1997). Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur J Neurosci* 9, 2581-2587.
82. Lipp,H.P., Schwegler,H., Heimrich,B., and Driscoll,P. (1988). Infrapyramidal mossy fibers and two-way avoidance learning: developmental modification of hippocampal circuitry and adult behavior of rats and mice. *J.Neurosci.* 8, 1905-1921.
83. Lüsse,H.G., Roskoden,T., Linke,R., Otten,U., Heese,K., and Schwegler,H. (1998). Modulation of mRNA expression of the neurotrophins of the nerve growth factor family and their receptors in the septum and hippocampus of rats after transient postnatal thyroxine treatment. I. Expression of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin 4 mRNA. *Exp.Brain Res.* 119, 1-8.
84. MacEwan,D.J. (1996). Elevated cPLA2 levels as a mechanism by which the p70 TNF and p75 NGF receptors enhance apoptosis. *FEBS Lett* 379, 77-81.
85. Maisonnier,P.C., Belluscio,L., Friedman,B., Alderson,R.F., Wiegand,S.J., Furth,M.E., Lindsay,R.M., and Yancopoulos,G.D. (1990). NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 5, 501-509.
86. Mangelsdorf,D.J. and Evans,R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850.
87. Marczyński,T.J. and Urbancic,M. (1988). Animal models of chronic anxiety and "fearlessness". *Brain Res.Bull.* 21, 483-490.
88. McAllister,A.K. (2002). Neurotrophins and cortical development. *Results Probl Cell Differ* 39, 89-112.
89. McDonald,N.Q. and Chao,M.V. (1995). Structural determinants of neurotrophin action. *J Biol Chem R* 270, 19669-19672.
90. McIntyre,C.K., Power,A.E., Roozendaal,B., and McGaugh,J.L. (2003). Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Ann.N Y.Acad.Sci.* 985, 273-293.
91. Meibach,R.C. and Siegel,A. (1977). Efferent connections of the septal area in the rat: an analysis utilizing retrograde and anterograde transport methods. *Brain Research* 119, 1-20.
92. Merlio,J.P., Ernfors,P., Kokaia,Z., Middlemas,D.S., Bengzon,J., Kokaia,M., Smith,M.L., Siesjo,B.K., Hunter,T., and Lindvall,O. (1993). Increased production of the TrkB protein tyrosine kinase receptor after brain insults. *Neuron* 10, 151-164.
93. Mesulam,M.-M., Mufson,E.J., Levey,A.I., and Wainer,B.H. (1983). Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: Cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *Journal of Comparative Neurology* 214, 170-197.

## 7 Literaturverzeichnis

---

94. Milner,T.A. and Amaral,D.G. (1984). Evidence for a ventral septal projection to the hippocampal formation in the rat. *Experimental Brain Research* 55, 579-585.
95. Milner,T.A., Loy,R., and Amaral,D.G. (1983). An anatomical study of the development of the septo-hippocampal projection in the rat. *Developmental Brain Research* 8, 343-371.
96. Montero,C.N. and Hefti,F. (1988). Rescue of lesioned septal cholinergic neurons by nerve growth factor: specificity and requirement for chronic treatment. *J.Neurosci.* 8, 2986-2999.
97. Mooradian,A.D. (1990). Blood-brain transport of triiodothyronine is reduced in aged rats. *Mech.Ageing Dev.* 52, 141-147.
98. Moretto,G., Xu,R.Y., Walker,D.G., and Kim,S.U. (1994). Co-expression of mRNA for neurotrophic factors in human neurons and glial cells in culture. *J Neuropathol Exp Neurol* 53, 78-85.
99. Morgan,J.I. and Curran,T. (1986). Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature* 322, 552-555.
100. Naar,A.M., Boutin,J.M., Lipkin,S.M., Yu,V.C., Holloway,J.M., Glass,C.K., and Rosenfeld,M.G. (1991). The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell* 65, 1267-1279.
101. Naumann,T., Straube,A., and Frotscher,M. (1997). Recovery of ChAT immunoreactivity in axotomized rat cholinergic septal neurons despite reduced NGF receptor expression. *Eur J Neurosci* 9, 1340-1349.
102. Nieuwenhuys,R., Voogd,J., and van Huijzen,C. (1991). *Das Zentralnervensystem des Menschen.* (Berlin: Springer), pp. 1-461.
103. Nyakas,C., Luiten,P.G.M., Spencer,D.G., and Traber,J. (1987). Detailed projection patterns of septal and diagonal band efferents to the hippocampus in the rat with emphasis on the innervation of CA1 and dentate gyrus. *Brain Research Bulletin* 18, 533-545.
104. Oh,J.D., Butcher,L.L., and Woolf,N.J. (1991). Thyroid hormone modulates the development of cholinergic terminal fields in the rat forebrain: relation to nerve growth factor receptor. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 59, 133-142.
105. Olton,D.S. (1977). The function of septo-hippocampal connections in spatially organized behaviour. *Ciba Found.Symp.* 327-349.
106. Olton,D.S. and Papas,B.C. (1979). Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia* 17, 669-682.
107. Oppenheimer,J.H. and Schwartz,H.L. (1997). Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. *Endocr.Rev.* 18, 462-475.
108. O'Brien,T.S., Svendsen,C.N., Isacson,O., and Sofroniew,M.V. (1990). Loss of True Blue labelling from the medial septum following transection of the fimbria-fornix: Evidence for the death of cholinergic and non-cholinergic neurons. *Brain Research* 508, 249-256.
109. Pallage,V., Knusel,B., Hefti,F., and Will,B. (1993). Functional consequences of a single nerve growth factor administration following septal damage in rats. *Eur J Neurosci* 5, 669-679.
110. Pasquini,J.M. and Adamo,A.M. (1994). Thyroid hormones and the central nervous system. *Dev.Neurosci.* 16, 1-8.
111. Pellemounter,M.A., Cullen,M.J., Baker,M.B., Gollub,M., and Wellman,C. (1996). The effects of intrahippocampal BDNF and NGF on spatial learning in aged Long Evans rats. *Mol Chem Neuropathol* 29, 211-226.
112. Pellow,S., Chopin,P., File,S.E., and Briley,M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J.Neurosci.Methods* 14, 149-167.

## 7 Literaturverzeichnis

---

113. Phillips,H.S., Hains,J.M., Laramee,G.R., Rosenthal,A., and Winslow,J.W. (1990). Widespread expression of BDNF but not NT3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons. *Science* 250, 290-294.
114. Pillar,T.M. and Seitz,H.J. (1997). Thyroid hormone and gene expression in the regulation of mitochondrial respiratory function. *Eur.J.Endocrinol.* 136, 231-239.
115. Plaschke,M., Naumann,T., Kasper,E., Bender,R., and Frotscher,M. (1997). Development of cholinergic and GABAergic neurons in the rat medial septum: effect of target removal in early postnatal development. *J.Comp.Neurol.* 379, 467-481.
116. Pombo,P.M., Baretino,D., Ibarrola,N., Vega,S., and Rodriguez-Pena,A. (1999). Stimulation of the myelin basic protein gene expression by 9-cis-retinoic acid and thyroid hormone: activation in the context of its native promoter. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 64, 92-100.
117. Prior,H., Schwegler,H., and Ducker,G. (1997). Dissociation of spatial reference memory, spatial working memory, and hippocampal mossy fiber distribution in two rat strains differing in emotionality. *Behav.Brain Res.* 87, 183-194.
118. Rajan,R.R. and Katyare,S.S. (1982). Effect of 3,5,3'-tri-iodothyronine on cellular growth and oxygen consumption in neonatal rat brain. *Experientia* 38, 1110-1114.
119. Rami,A., Patel,A.J., and Rabie,A. (1986). Thyroid hormone and development of the rat hippocampus: morphological alterations in granule and pyramidal cells. *Neuroscience* 19, 1217-1226.
120. Rami,A. and Rabie,A. (1990). Delayed synaptogenesis in the dentate gyrus of the thyroid- deficient developing rat. *Dev.Neurosci.* 12, 398-405.
121. Ribeiro,R.C., Apreletti,J.W., West,B.L., Wagner,R.L., Fletterick,R.J., Schaufele,F., and Baxter,J.D. (1995). The molecular biology of thyroid hormone action. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 758, 366-389.
122. Richter-Levin,G. and Akirav,I. (2000). Amygdala-hippocampus dynamic interaction in relation to memory. *Mol.Neurobiol.* 22, 11-20.
123. Rocamora,N., Pascual,M., Acsady,L., de Lecea,L., Freund,T.F., and Soriano,E. (1996). Expression of NGF and NT3 mRNAs in hippocampal interneurons innervated by the GABAergic septohippocampal pathway. *J.Neurosci.* 16, 3991-4004.
124. Rodgers,R.J. and Dalvi,A. (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 21, 801-810.
125. Roskoden,T., Heese,K., Otten,U., and Schwegler,H. (1999). Modulation of mRNA expression of the neurotrophins of the nerve-growth-factor family and their receptors in the septum and hippocampus of rats after transient postnatal thyroxine treatment. II. Effects on p75 and trk receptor expression. *Exp Brain Res* 127, 307-313.
126. Roskoden,T., Otten, U., Schwegler, H. (2004). Early postnatal corticosterone administration regulates neurotrophins and their receptors in septum and hippocampus of the rat. *Exp Brain Res.* 154(2),183-91
127. Ruiz-Marcos,A., Salas,J., Sanchez-Toscano,F., Escobar,d.R., and Morreale,d.E. (1983). Effect of neonatal and adult-onset hypothyroidism on pyramidal cells of the rat auditory cortex. *Brain Res.* 285, 205-213.
128. Sala-Roca,J., Marti-Carbonell,M.A., Garau,A., Darbra,S., and Balada,F. (2002). Effects of dysthyroidism in plus maze and social interaction tests. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 72, 643-650.
129. Saper,C.B. (1984). Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. Magnocellular basal nucleus. *Journal of Comparative Neurology* 222, 313-342.
130. Saporito,M.S. and Carswell,S. (1995). High levels of synthesis and local effects of nerve growth factor in the septal region of the adult rat brain. *J.Neurosci.* 15, 2280-2286.



## 7 Literaturverzeichnis

---

131. Schaaf,M.J., Hoetelmans,R.W., de Kloet,E.R., and Vreugdenhil,E. (1997). Corticosterone regulates expression of BDNF and trkB but not NT-3 and trkC mRNA in the rat hippocampus. *J Neurosci Res* 48, 334-341.
132. 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.
133. Schecterson,L.C. and Bothwell,M. (1992). Novel roles for neurotrophins are suggested by BDNF and NT-3 mRNA expression in developing neurons. *Neuron* 9, 449-463.
134. Schmidt-Kastner,R., Humpel,C., Wetmore,C., and Olson,L. (1996). Cellular hybridization for BDNF, trkB, and NGF mRNAs and BDNF-immunoreactivity in rat forebrain after pilocarpine-induced status epilepticus. *Exp Brain Res* 107, 331-347.
135. Schmutzler,C., Schmitt,T.L., Glaser,F., Loos,U., and Kohrle,J. (2002). The promoter of the human sodium/iodide-symporter gene responds to retinoic acid. *Mol.Cell Endocrinol.* 189, 145-155.
136. Schuman,E.M. (1999). Neurotrophin regulation of synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol* 9, 105-109.
137. Schwab,M.E., Otten,U., Agid,Y., and Thoenen,H. (1979). Nerve growth factor (NGF) in the rat CNS: absence of specific retrograde axonal transport and tyrosine hydroxylase induction in locus coeruleus and substantia nigra. *Brain Res* 168, 473-483.
138. Schwegler,H. (1995). Transient postnatal thyroxine treatment leads to an increased number of cholinergic neurons in the medial septum and to a higher density of cholinergic fibers in hippocampal CA3 in rats. *Neurosci.Lett.* 198, 197-200.
139. Schwegler,H. and Crusio,W.E. (1995). Correlations between radial-maze learning and structural variations of septum and hippocampus in rodents. *Behav.Brain Res.* 67, 29-41.
140. Schwegler,H., Crusio,W.E., and Brust,I. (1990). Hippocampal mossy fibers and radial-maze learning in the mouse: a correlation with spatial working memory but not with non-spatial reference memory. *Neuroscience* 34, 293-298.
141. Schwegler,H., Crusio,W.E., Lipp,H.-P., Brust,I., and Mueller,G.G. (1991). Early postnatal hyperthyroidism alters hippocampal circuitry and improves radial maze learning in adult mice. *J.Neurosci.* 11, 2102-2106.
142. Silva,J.E., Gordon,M.B., Crantz,F.R., Leonard,J.L., and Larsen,P.R. (1984). Qualitative and quantitative differences in the pathways of extrathyroidal triiodothyronine generation between euthyroid and hypothyroid rats. *J.Clin.Invest* 73, 898-907.
143. Smith,J.W., Evans,A.T., Costall,B., and Smythe,J.W. (2002). Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 26, 45-60.
144. Smith,G.W., Aubry,J.M., Dellu,F., Contarino,A., Bilezikjian,L.M., Gold,L.H., Chen,R., Marchuk Y, Hauser,C., Bentley,C.A., Sawchenko,P.E.,Koob,G.F.,Vale,W., Lee,K.F. (1998). Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response,and aberrant neuroendocrine development. *Neuron* 20, 1093-1102.
145. Snider,W.D. (1994). Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 77, 627-638.
146. Staiger,J.F. and Nürnbergger,F. (1991). The efferent connections of the lateral septal nucleus in the guinea pig: projections to the diencephalon and brainstem. *Cell and Tissue Research* 264, 391-413.

## 7 Literaturverzeichnis

---

147. Stephan,H. (1975). Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen IV/9. Allocortex. (Berlin, Heidelberg, New York: Springer), pp. 1-998.
148. Stenzel-Poore,M.P., Heinrichs,S.C., Rivest,S., Koob,G.F., Vale,W.W. (1994). Overproduction of corticotropin-releasing factor in transgenic mice: a genetic model of anxiogenic behavior. *J Neuroscience* 14, 2579-2584.
149. Storm-Mathisen,J. (1974). Choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in fascia dentata following lesions of the entorhinal afferent. *Journal of Brain Research* 80, 119-181.
150. Swanson,L.W. (1992). *Brain Maps. Structure of the Rat Brain.* (Amsterdam: Elsevier), pp. 1-240.
151. Swanson,L.W. and Cowan,W.M. (1979). The connections of the septal region in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 186, 621-656.
152. Tekumalla,P.K., Tontonoz,M., Helsa,M.A., Kirn,J.R. (2002). Effects of excess thyroid hormone on cell death, cell proliferation, and new neuron incorporation in the adult zebra finch telencephalon. *J Neurobiol.* 51(4),323-41.
153. Thoenen,H. (1995). Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270, 593-598.
154. Timmusk,T., Belluardo,N., Metsis,M., and Persson,H. (1993). Widespread and developmentally regulated expression of neurotrophin-4 mRNA in rat brain and peripheral tissues. *Eur J Neurosci* 5, 605-613.
155. Tonra,J.R. (1999). Classical and novel directions in neurotrophin transport and research: anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor by sensory neurons. *Microsc Res Tech* 45, 225-232.
156. Tomic,M., Torch,S., Comte,V., Dolivo,M., Honegger,P., and Matthieu,J.M. (1992). Triiodothyronine has diverse and multiple stimulating effects on expression of the major myelin protein genes. *J.Neurochem.* 59, 1770-1777.
157. Treadway,C.R., Prange,A.J., Jr., Doehne,E.F., Edens,C.J., and Whybrow,P.C. (1967). Myxedema psychosis: clinical and biochemical changes during recovery. *J.Psychiatr.Res.* 5, 289-296.
158. Tropea,D., Capsoni,S., Tongiorgi,E., Giannotta,S., Cattaneo,A., and Domenici,L. (2001). Mismatch between BDNF mRNA and protein expression in the developing visual cortex: the role of visual experience. *Eur.J.Neurosci.* 13, 709-721.
159. Tuszynski,M.H., Armstrong,D.M., and Gage,F.H. (1990a). Basal forebrain cell loss following fimbria/fornix transection. *Brain Research* 508, 241-248.
160. Tuszynski,M.H., U.H.S., Amaral,D.G., and Gage,F.H. (1990b). Nerve growth factor infusion in the primate brain reduces lesion-induced cholinergic neuronal degeneration. *J.Neurosci.* 10, 3604-3614.
161. Umesono,K., Murakami,K.K., Thompson,C.C., and Evans,R.M. (1991). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 65, 1255-1266.
162. Utiger,R.D. (1991). Recognition of thyroid disease in the fetus. *N.Engl.J.Med.* 324, 559-561.
163. Walker,P., Weil,M.L., Weichsel,M.E.J., and Fisher,D.A. (1981). Effect of thyroxine on nerve growth factor concentration in neonatal mouse brain. *Life Sci* 28, 1777-1787.
164. Walsh,T.J., Gandhi,C., Stackman,R.W., and Wiley,R.G. (1996). Injection of IgG 192-saporin into the medial septum produces cholinergic hypofunction and dose-dependent working memory deficits. *Brain Res.* 726, 69-79.
165. Weiß,C. (2001). *Basiswissen Medizinische Statistik.* - 300 Seiten - Springer Verlag  
Erscheinungsdatum: September 2001 Auflage: 2., überarb. u. erw. Aufl. 2001 ISBN 3540420231).

## 7 Literaturverzeichnis

---

166. Whybrow,P.C. (1994). The therapeutic use of triiodothyronine and high dose thyroxine in psychiatric disorder. *Acta Med.Austriaca* 21, 47-52.
167. Yilmazer-Hanke,D.M.,Hantsch,M., Hanke,J., Schulz,C., Faber-Zuschratter,H.,Schwegler,H. (2004). Neonatal thyroxine treatment: changes in the number of corticotropin-releasing-factor (CRF) and neuropeptide Y (NPY) containing neurons and density of tyrosine hydroxylase positive fibers (TH) in the amygdala correlate with anxiety-related behavior of wistar rats. *Neuroscience* 124, 283-97.
168. Yoerg S.I. and Kamil A.C (1982). Response Strategies in the radial arm maze: running around in circles. *Animal Learning and Behaviour* 10, 530-534.
169. Yoshida,K. and Oka,H. (1990). Topographical distribution of septohippocampal projections demonstrated by the PHA-L immunohistochemical method in rats. *Neuroscience Letters* 113, 247-252.
170. Zimmer,J. and Haug,F.M. (1978). Laminar differentiation of the hippocampus, fascia dentata and subiculum in developing rats, observed with the Timm sulphide silver method. *J.Comp.Neur.* 179, 581-618.
171. Zola-Morgan,S., Squire,L., and Ramus,S. (1995). The role of the hippocampus in declarative memory: a reply to Nadel. *Hippocampus* 5, 235-239.
172. Zola-Morgan,S. and Squire,L.R. (1993). Neuroanatomy of memory. *Annu.Rev.Neurosci.* 16, 547-563.

### 8.1 Herstellung der Thyroxin-Lösung bzw. der Kontrolllösung

Zur Herstellung der L-Thyroxin-Lösung wurde 7,5 mg pulverisiertes Thyroxin in 50 ml 0,9%iger NaCl-Lösung bei 40°C gelöst. Anschließend wurde ein pH-Wert von 9,0 mit 0,1 M NaOH-Lösung eingestellt. Zur Herstellung der Kontrolllösung wurde 50 ml 0,9 %ige NaCl mit 0,1 M NaOH auf einen pH-Wert von 9 eingestellt.

### 8.2 Formel zur Ermittlung der Neuronenzahl

(absolut gezählte Neuronenzahl /((Fensterfläche % von der Gesamtfläche des medialen Septums und des Broca Bandes x Gesamtfläche des medialen Septums und Broca Bandes)/100) – Differenzfläche) x 100/Objektfläche))x100) = Neuronenzahl pro Gewebeschnitt)

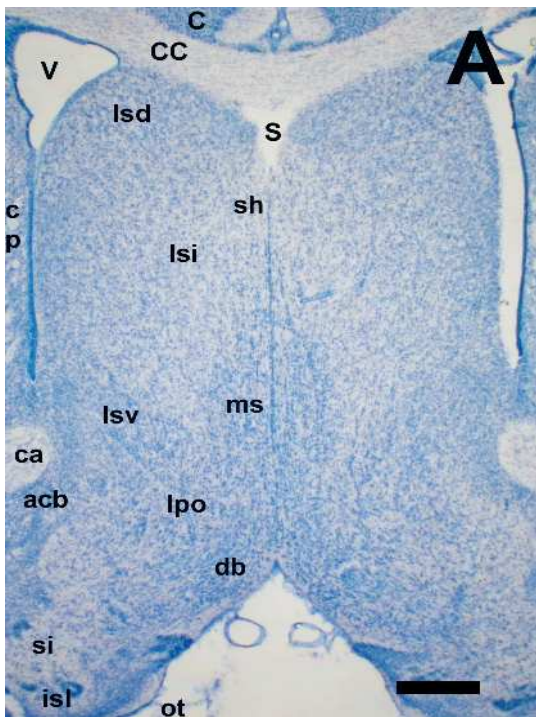
### 8.3 Korrelationstabelle der Neurotrophine und der einzelnen Verhaltensparameter

Tab. 8.3		BDNF	NT 3	NT 4	NGF
<b>geschlossene</b>	PK	0,252	-0,023	-0,287	0,254
<b>Arme</b>	Signifikanz	0,38	0,94	0,31	0,45
	N	14	11	14	11
<b>offene</b>	PK	-0,267	0,011	0,137	-0,196
<b>Arme</b>	Signifikanz	0,36	0,98	0,64	0,56
	N	14	11	14	11
<b>Summe</b>	PK	-0,045	0,286	0,373	-0,133
<b>an</b>	Signifikanz	0,88	0,39	0,19	0,70
<b>Armbesuchen</b>	N	14	11	14	11
<b>Neu aus 8, 1-3 d</b>	PK	0,472	-0,174	0,077	-0,091
	Signifikanz	0,06	0,57	0,76	0,77
	N	17	13	18	13
<b>Neu aus 8, 8-10 d</b>	PK	0,331	-0,009	<b>0,475</b>	0,606
	Signifikanz	0,19	0,98	<b>0,04*</b>	0,03
	N	17	13	18	13
<b>Zeit an 1-3 d</b>	PK	<b>-0,492</b>	-0,145	-0,353	-0,163
	Signifikanz	<b>0,04*</b>	0,64	0,15	0,59
	N	17	13	18	13
<b>Zeit an 8-10 d</b>	PK	<b>-0,506</b>	-0,412	-0,442	<b>-0,561</b>
	Signifikanz	<b>0,03*</b>	0,16	0,07	<b>0,05*</b>
	N	17	13	18	<b>13</b>
<b>WME an 1 - 3 d</b>	PK	0,224	-0,370	0,058	-0,371
	Signifikanz	0,39	0,21	0,82	0,21
	N	17	13	18	13
<b>WME an 8-10 d</b>	PK	-0,091	0,039	0,078	0,109
	Signifikanz	0,73	0,90	0,76	0,72
	N	17	13	18	13

\*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

8.4 Abbildungen der Nissl- und Immunfärbungen



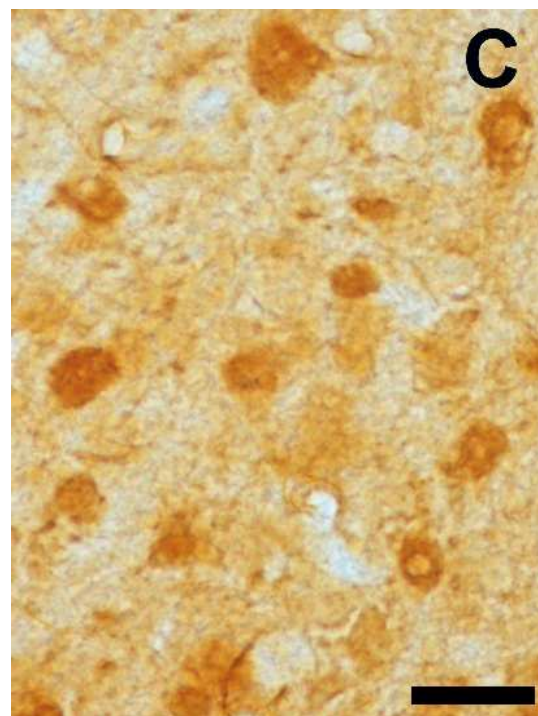
Eläuterung:

- acb = Nucleus accumbens
- c = Cortex
- ca = Commissura anterior
- cc = Corpus callosum
- cp = Striatum
- db = Broca Band
- isl = Callejaschen Inseln
- lpo = lat. präoptisches Areal
- lsd = lat. Septum
- lsi = intermediärer Teil des lat. Septums
- lsv = ventraler Teil des lat. Septums
- ms = mediales Septum
- ot = Tuberculum olfactorium
- s = Septum pellucidum
- sh = Nucleus septohippocampalis
- si = Substantia innominata
- v = Ventrikel

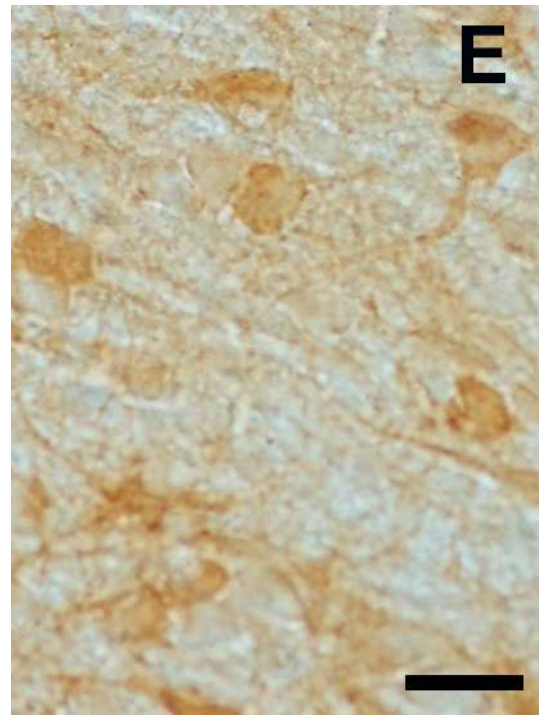
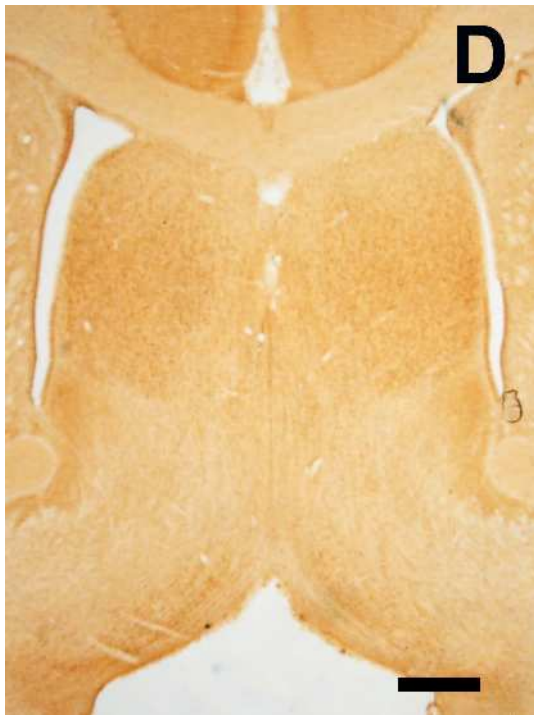
[Abb. A] Nissl-Übersichtsfärbung bei 2,5 x Vergrößerung

■ = 300 µm bei 2,5x Vergrößerung

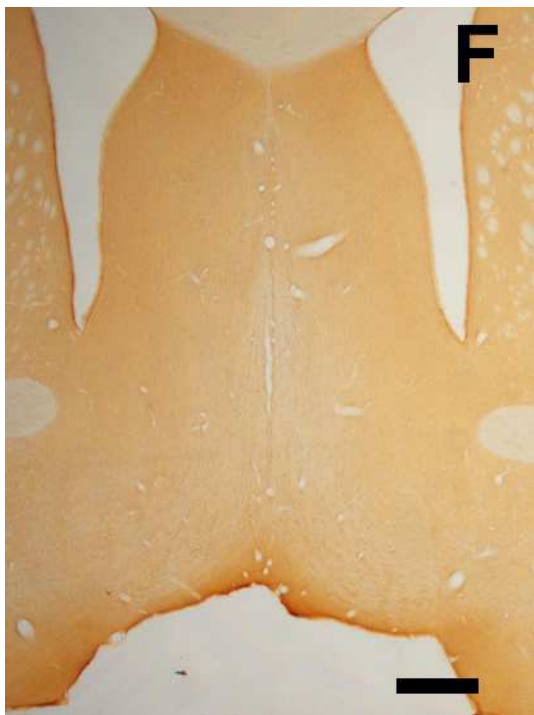
■ = 25 µm bei 40x Vergrößerung



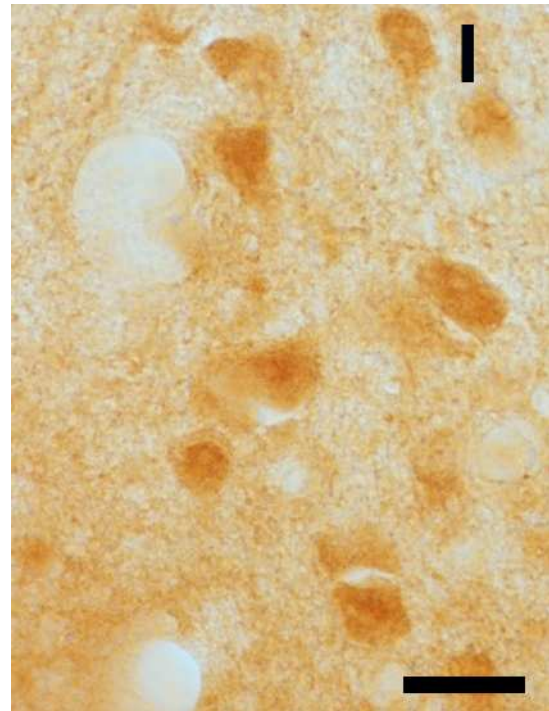
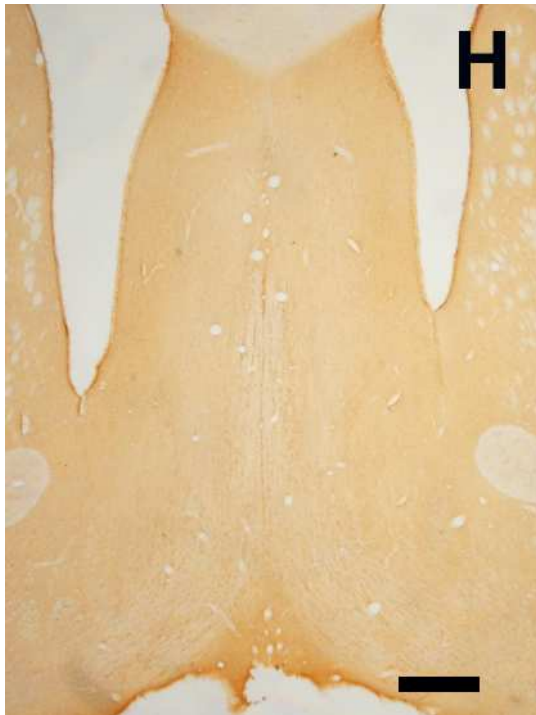
[Abb. B und C] NGF-Immunfärbung bei 2,5x und 40x Vergrößerung



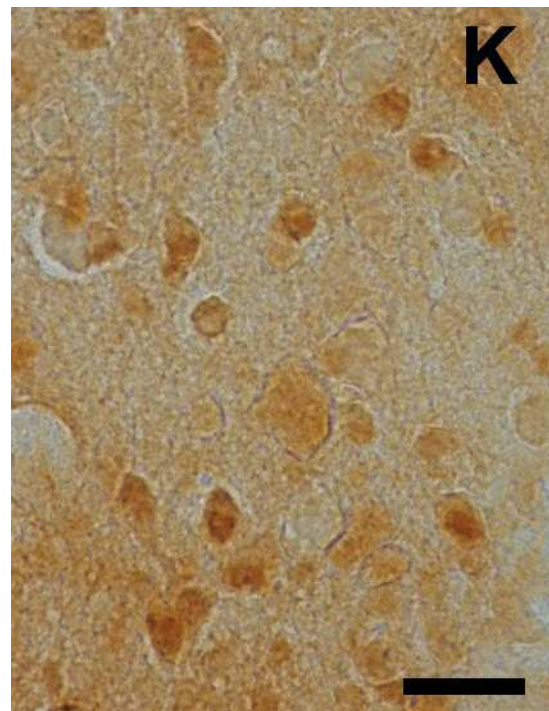
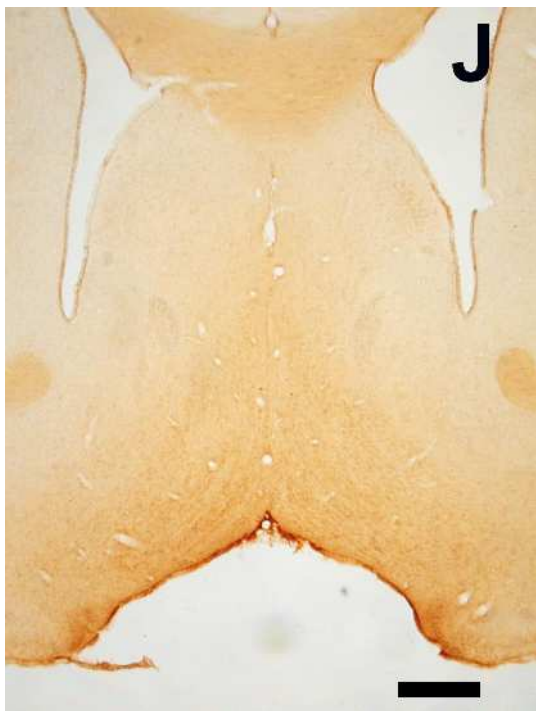
[Abb. D und E] BDNF-Immunfärbung bei 2,5x und 40x Vergrößerung von P10 Tieren



[Abb. F und G] BDNF-Immunfärbung bei 2,5x und 40x Vergrößerung von adulten Tieren



[Abb. H und I] NT-3 Immunfärbung bei 2,5x und 40x Vergrößerung



[Abb. J und K] NT4/5-Immunfärbung bei 2,5 x und 40 x Vergrößerung

### 8.5 Abkürzungs- und Dimensionsverzeichnis:

Abb.	: Abbildung
AD	: adulte Tiere
BDNF	: <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
BSA	: bovines Serumalbumin
bzw.	: beziehungsweise
ca.	: circa
° C	: Grad Celsius
cm	: Zentimeter
d	: Tagen
df	: Freiheitsgrade
DNA	: Desoxyribonucleinsäure
EGF	: <i>Epidermis Growth Factor</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immuno-Stimulated Assay</i>
EPM	: <i>Elevated Plus Maze</i>
F	: Testwert der Varianzanalyse
et al.	: und Kollegen
g	: Gramm
h	: Stunden
I.E.	: internationale Einheiten
K	: Kontrollgruppe
kg	: Kilogramm
m	: männlich und unmittelbar hinter einer Zahl Meter
MAP-Kinasen	: Mitogen aktivierte Proteinkinase
M	: Molar
mg	: Milligramm
min	: Minuten
ml	: Milliliter
n	: Neurone
mRNA	: <i>messenger</i> Ribonucleinsäure
NaCl	: Natriumchlorid-Lösung
NGF	: <i>Nerve Growth Factor</i>
NT-3	: Neurotrophin-3
NT-4/5	: Neurotrophin-4/5
NT-6	: Neurotrophin-6
NT-7	: Neurotrophin-7
o.g.	: oben genannten
P	: Wahrscheinlichkeit
PB	: Phosphatpuffer
PBS	: Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PK	: Pearsons Korrelationskoeffizient
P10	: 10 Tage alte Tiere
p75	: <i>low affinity receptor</i> aller Neurotrophine der NGF-Familie
RL	: Radiallabyrinth
sek	: Sekunden
t	: Testwert im t-Test
T	: Thyroxingruppe
Trk	: Tyrosin-Rezeptor-Kinase



## 8 Anhang

---

TrkA	: Tyrosin-Rezeptor-Kinase A
TrkB	: Tyrosin-Rezeptor-Kinase B
TrkC	: Tyrosin-Rezeptor-Kinase C
T3	: Trijodthyronin
T4	: L-Thyroxin
w	: weiblich
WME	: <i>Working Memory Errors</i>
µg	: Mikrogramm
z.B.	: zum Beispiel
ZNS	: zentrales Nervensystem

### 8.6 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

		<b>Seite</b>
1. [Abb. 2.3]	Neurotrophine der NGF-Familie und ihre Rezeptoren	5
2. [Abb. 2.4]	Biochemische Formel von T3	6
3. [Abb. 3.2 A]	Abbildung des Radiallabyrinths	17
4. [Abb. 3.2 B]	Abbildung des Elevated Plus Maze	18
5. [Abb. 4.1]	Graphik der Körpergewichtsverteilung	22
6. [Abb. 4.2 A]	Graphik der WME im RL	23
7. [Abb. 4.2 B]	Graphik der besuchten neuen Arme aus den ersten 8 Armbesuchen im RL	23
8. [Abb. 4.2 C]	Graphik der benötigten Zeit im RL	23
9. [Abb. 4.3 A]	Graphik der Armbesuche auf den offenen und geschlossenen Armen im EPM	24
10. [Abb. 4.3 B]	Graphik der Aufenthaltsdauer auf den offenen und geschlossenen Armen im EPM	24
11. [Abb. 4.4]	Graphik der NGF immunpositiven Neuronenzahl	25
12. [Abb. 4.5]	Graphik der BDNF immunpositiven Neuronenzahl	26
13. [Abb. 4.6]	Graphik der NT-3 immunpositiven Neuronenzahl	27
14. [Abb. 4.7]	Graphik der NT-4/5 immunpositiven Neuronenzahl	27
15. [Abb. 4.8]	Graphik der Flächengröße des medialen Septums und Broca Bandes	28
16. [Abb. 4.9 A]	Graphik der Korrelation zwischen NGF und der benötigten Zeit im RL	30
17. [Abb. 4.9 B]	Graphik der Korrelation zwischen BDNF und der benötigten Zeit im RL	30
18. [Abb. 4.9 C]	Graphik der Korrelation zwischen NT-4/5 und der Anzahl der richtig besuchten neuen Arme aus 8 im RL	30
19. [Abb. A]	Nissl-Übersichtsfärbung bei 2,5x Vergrößerung	51
20. [Abb. B]	NGF-Immunfärbung bei 2,5x Vergrößerung	51
21. [Abb. C]	NGF-Immunfärbung bei 40x Vergrößerung	51
22. [Abb. D]	BDNF-Immunfärbung bei 2,5x Vergrößerung von P10 Tieren	52
23. [Abb. E]	BDNF-Immunfärbung bei 40x Vergrößerung von P10 Tieren	52
24. [Abb. F]	BDNF-Immunfärbung bei 2,5x Vergrößerung von AD Tieren	52
25. [Abb. G]	BDNF-Immunfärbung bei 40x Vergrößerung von AD Tieren	52
26. [Abb. H]	NT-3-Immunfärbung bei 2,5x Vergrößerung	53
27. [Abb. I]	NT-3-Immunfärbung bei 40x Vergrößerung	53
28. [Abb. J]	NT-4/5-Immunfärbung bei 2,5x Vergrößerung	53
29. [Abb. K]	NT-4/5-Immunfärbung bei 40x Vergrößerung	53
<b>Tabellen :</b>		
1. [Tab. 4.9]	Korrelationstabelle der Neurotrophine	29
2. [Tab. 8.3]	Korrelationstabelle der Neurotrophine und der einzelnen Verhaltensparameter	50

### 8.7 Darstellung des Bildungsweges

#### Persönliche Daten:

Name : Daniele Camboni  
Geboren am : 16.10.1973 in Damme am Dümmer  
Familienstand : ledig  
Konfession : römisch katholisch  
Nationalität : italienisch

#### Bildungsweg:

- Abitur : 1993 am Söderblom-Gymnasium in Espelkamp
- Krankenpflegeausbildung : 1993-1996 Ausbildung zum examinierten Krankenpfleger am St. Elisabeth Stifts-Krankenhaus in Damme am Dümmer
- Medizinstudium : 1996-2003 an der Otto-von Guericke Universität in Magdeburg
- Teilapprobation zur ärztlichen Tätigkeit wurde im Mai 2003 erlangt

#### Stipendien:

- 01.08.-30.09.1999 : DFA-Stipendium für Famulaturen an der Universitätsklinik „Umberto I“ (Allgemeinchirurgie; Prof. Ruggero) in Rom und am Universitätsklinikum „San Martino“ (Allgemeinchirurgie; Prof. Riboli) in Genua, Italien
- 01.10.2001-31.03.2002 : DFG-Stipendium für die Teilnahme am „Graduiertenkolleg für Biologische Grundlagen von Erkrankungen des ZNS“ an der O.-v.-G. Universität in Magdeburg (Prof. Reiser) im Rahmen der Promotionsarbeit
- 15.04.2002-15.11.2002 : DAAD-Stipendium zur Absolvierung der Tertiale Chirurgie und Innere Medizin des Praktischen Jahres am „Kansas University Medical Center“ in Kansas City, Kansas, USA

#### Berufliche Tätigkeit:

- seit August 2003: Beginn des „Arzt im Praktikum“ in der Abteilung für Allgemein-, Thorax-, Gefäß- und Unfallchirurgie an den Krankenanstalten Gilead in Bielefeld Bethel (CA Prof. Schröder, CA Dr. Niemeyer), Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Münster

### 8.8 Wissenschaftliche Vorleistungen:

- seit 1999 wissenschaftliche Tätigkeit als Doktorand am Institut für Anatomie an der O.-v.-G Universität Magdeburg unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Schwegler und OA Dr. med. Dipl. biol. Roskoden
- vom 01.10.2001-31.03.2002 Teilnahme am „Graduiertenkolleg für Biologische Grundlagen von Erkrankungen des ZNS“ an der O.-v.-G. Universität in Magdeburg unter dem Sprecher des Graduiertenkollegs Herrn Prof. Dr. Reiser
- **Publikation:**
  - Camboni, D., Roskoden, T., Schwegler, H. (2003). Effect of early thyroxine treatment on brain derived neurotrophic factor mRNA expression and protein amount in the rat medial septum/diagonal band of Broca. *Neuroscience Letters* 350, 141-144.
- **Poster :**
  - Roskoden, T., Camboni, D., Schwegler, H. (2001): Early postnatal thyroxine treatment leads to alterations in behaviour and expression of mRNA of neurotrophins and neurotrophin receptors in hippocampus and septum of rats. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 109 Suppl.1, S36

### 8.9 Danksagungen

Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater **Herrn Prof. Dr. rer. nat. Herbert Schwegler** bedanken, der mir diese interessante wissenschaftliche Thematik anvertraute. Seine fachliche Beratung und sein stetes Interesse in Form von regelmäßigen kritischen wie informativen Diskussionen haben sehr zum Fortgang der Experimente beigetragen.

Ein großer Dank gilt meinem Betreuer **Herrn OA Dr. med. Dipl. biol. Thomas Roskoden** für die praktische und theoretische Unterstützung während des gesamten Experimentes. Auch waren seine Ratschläge und Anmerkungen bei der Durchsicht dieses Manuskripts außerordentlich hilfreich.

Im nicht geringeren Maße möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Anatomie an der O.-v.-G. Universität in Magdeburg für die angenehme Zusammenarbeit bedanken. Besonders möchte ich mich bei **Herrn PD Dr. rer. nat. Rüdiger Linke** und bei **Frau Dr. med. Deniz Yilmazer-Hanke** bedanken. Sie haben mir zahlreiche Hilfestellungen bei der Fertigstellung dieser Arbeit gegeben. Für die tatkräftige Unterstützung bei den Laborarbeiten und bei den immunzytochemischen Untersuchungen möchte ich mich bei allen Laborassistenten bedanken. Namentlich sind hier besonders **Frau Röhl** und **Frau Ketzler**, sowie **Frau Zipse** und **Frau Wendler** zu nennen.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit möchte ich mich bei **Herrn Dr. Röhl** vom Institut für Biometrie und medizinische Informatik an der O.-v.-G. Universität Magdeburg bedanken.

Ferner möchte ich mich auch beim Sprecher des Graduiertenkollegs für Biologische Grundlagen von Erkrankungen des Nervensystems **Herrn Prof. Reiser** und bei allen Kollegen des Graduiertenkollegs bedanken. Der wissenschaftliche Austausch in Form von zahlreichen Seminaren und Tagungen haben auch Anregungen für diese Arbeit geschaffen.