

Untersuchungen zu Änderungen der Hypothalamus-Hypophysen-
Nebennierenrinden-Achse, des Schlafes und des Verhaltens bei Mäusen
unter basalen und stressinduzierenden Bedingungen nach freiwilliger
Benutzung eines Laufrades

Dissertation

an der Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Susanne-Katrin Droste
München, Februar 2003

1. Gutachter:
Prof. Dr. Rainer Landgraf

2. Gutachter:
Prof. Dr. Gerhard Neuweiler

Datum der mündlichen Prüfung:
17. Juni 2003

Ein Problem zu lösen heißt
sich vom Problem zu lösen.

Goethe

Zusammenfassung

Es scheint, als würde freiwillige körperliche Aktivität einen günstigen Einfluss auf verschiedene physiologische Systeme und zentrale *Stress-coping*-Mechanismen ausüben. Aufgrund dessen, dass die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (engl. *hypothalamus-pituitary-adrenocortical* (HPA))-Achse maßgeblich an den Prozessen, die zu einem besseren Umgang mit Stress führen, beteiligt ist, wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt von freiwilliger Langzeitaktivität auf dieses neuroendokrine System unter basalen und stressinduzierenden Bedingungen untersucht. Darüber hinaus wurde der basale und stressinduzierte Schlaf, das Angstverhalten und die Emotionalität der Tiere analysiert, um einen umfassenderen Einblick darüber zu erhalten, wie die Veränderungen in der HPA-Achse auf andere Systeme Einfluss nehmen. Es wurde die Maus als Tiermodell für die Studien gewählt. Männliche C57BL/6N Mäuse wurden einzeln gehäust, und hatten vier Wochen lang die Möglichkeit, freiwillig ein Laufrad zu benutzen, was sie auch ausdauernd taten (5-6 km/ Tag). Bei Betrachtung der Körperzusammensetzung zeigte sich, dass die Tiere mit Zugang zu einem Laufrad (LR-Tiere) zwar vergleichbare Gewichtsentwicklungen wie Kontrolltiere (KO-Tiere) aufwiesen, sie aber deutlich weniger Fett und dafür mehr Muskelmasse besaßen. Ausdauernde körperliche Aktivität führte zu einer Reihe von komplexen, speziell zu asymmetrischen, strukturellen Veränderungen auf der Ebene der Nebennieren. Während KO-Mäuse größere linke als rechte Nebennieren aufwiesen, wurde diese Asymmetrie bei den LR-Tieren dadurch aufgehoben, dass sich die „kleinere“ Nebenniere der „größeren“ angleich, und dies aufgrund einer expandierten Nebennierenrinde. Diese Tiere wiesen u. a. auch eine erhöhte Expression von Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA, dem limitierenden Enzym der Noradrenalin- und Adrenalin-Synthese, im Nebennierenmark auf, was auf eine (zumindest phasisch) erhöhte sympathische Aktivität in diesen Tieren hinweist.

Des Weiteren zeigte sich unter basalen Bedingungen eine Hypersensibilität der Nebennierenrinde auf ACTH, denn unter morgendlichen Ruhebedingungen war das Plasma-ACTH in den LR-Tieren erniedrigt, bei gleichbleibenden Corticosteron-Gehalten. Zu Beginn der Dunkelphase, der Aktivitätsphase der Tiere, zeigten sich bei gleichbleibenden ACTH-Konzentrationen deutlich erhöhte Corticosteron-Plasmawerte. Ein zusätzlicher Einflussfaktor auf die Sekretion von Glucocorticoiden ist die sympatho-adrenomedulläre Aktivität. Sie ist ein positiver Modulator der

Sensibilität der Nebennierenrinde auf ACTH. Die HPA-Achsen-Aktivität erwies sich als stark stressorspezifisch. Handelte es sich um einen Stressor mit starker physischer Komponente (Schwimmen, Einsperren, sozialer Konflikt), reagierte das Hormonsystem der LR-Tiere mit einem vergleichbaren Anstieg an Plasma-ACTH und deutlich höheren Corticosteron-Plasmakonzentrationen. Wenn es sich allerdings um einen eher milderen Stressor mit psychologischem Aspekt (neue Umgebung) handelte, dann wiesen die LR-Tiere erniedrigte ACTH-Konzentrationen auf. Interessanterweise zeigten diese Tiere eine ebenfalls verminderte Corticosteron-Konzentration im Plasma, wenn die neue Umgebung mit einem funktionstüchtigen Laufrad ausgestattet war.

Die Gehirn- und Hypophysen-Glucocorticoid-Rezeptor (GR)-Dichte war unverändert in diesen Tieren, allerdings wiesen sie verringerte Mineralocorticoid-Rezeptor (MR)-Konzentrationen im Hippokampus auf. Die CRH mRNA-Konzentration war im PVN der LR-Tiere erniedrigt, während bei den mRNA-Konzentrationen der co-exprimierten Hormone Vasopressin und Oxytozin kein Unterschied zu den Kontrolltieren gefunden wurde.

Da ausdauernder körperlicher Aktivität eine antidepressive und anxiolytische Wirkung nachgesagt wird, wurden verschiedene Ansätze verfolgt, die hierbei Aufschluss geben könnten. Es wurde ein Vergleich einiger physiologischer und HPA-Achsen-Parameter nach vierwöchigem freien Zugang zu einem Laufrad im Vergleich zu einer vierwöchigen Medikation mit dem Antidepressivum Tianeptin, einem selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Verstärker, durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass Antidepressiva (AD) alleine nicht zu Veränderungen auf hormoneller und physiologischer Ebene führten, allerdings eine Kombination aus Laufrad und AD zumindest auf die morgendliche Plasmakonzentration von Corticosteron einen synergistischen Effekt ausübte; sie war signifikant erniedrigt. Des Weiteren wurden Tiere, die vier Wochen lang die Möglichkeit hatten ein Laufrad zu benutzen, in verschiedenen Verhaltens- und Angsttests untersucht. Hierbei zeigte sich ebenfalls, dass es stark von dem Kontext des Testes abhing, wie die Tiere reagierten. Handelte es sich um einen Test der einen weniger aversiven Stimulus darstellte (*modified hole board, open field*), waren die LR-Tiere weniger impulsiv als die KO-Tiere. Handelte es sich um einen Test mit stark aversiver Komponente (*elevated plus-maze, dark/light box*), zeigten sich die LR-Tiere deutlich angstreduziert im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Da bekannt ist, dass Glucocorticoide, und somit auch Stress, negativ auf die Neubildung von Neuronen im Gehirn (Neurogenese) Einfluss nehmen, wurde mit Hilfe eines neuen endogenen Markers (Ki-67) die Proliferationsrate im Gyrus dentatus des Hippokampus (eine der wenigen Regionen, in denen Neurogenese im adulten Gehirn möglich ist) untersucht. Hierbei wurde ein Vergleich der Neurogeneserate in Folge von verschiedenen Stressoren (Schwimmen, Predatorexposition) im Vergleich zu Laufrad und Kontrolltieren durchgeführt. Es konnte in Übereinstimmung mit der Literatur nachgewiesen werden, dass Stress die Proliferationsrate herab- und freiwillige körperliche Aktivität sie heraufsetzt.

Da Schlaf für die Regeneration lebensnotwendig ist, und körperlicher Aktivität nachgesagt wird, dass sie zur Verbesserung des Schlafes und somit zu einer verbesserten Regeneration des Organismus führt, wurden Untersuchungen zum normalen und stressinduzierten Schlaf durchgeführt. Es zeigte sich, dass der Schlaf in den LR-Tieren moduliert ist. Ausdauernde Bewegung führte zu einer merklichen Verlängerung der Dauer der einzelnen Schlafepisoden und gleichzeitig zu einer Reduzierung des REMS, was darauf hindeutet, dass körperliche Aktivität einen positiven Einfluss auf die Qualität des Schlafes ausübt. In Folge eines sozialen Stresses wurde der Anstieg an REMS durch die ausdauernde körperliche Aktivität umgekehrt, was ebenfalls auf einen entspannteren Schlaf in diesen Tieren hindeutet.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ausdauernde körperliche Aktivität auf eine Vielzahl von Prozessen sowohl physischer als auch psychischer Natur einen positiven und ausgleichenden Einfluss ausübt. Aus diesem Grund wird Bewegung auch als Therapeutikum verschiedenster Erkrankungen des Menschen (z. B. Herz/Kreislauf-Erkrankungen, Depression) angewendet, obwohl die neurobiologischen Grundlagen noch nicht endgültig geklärt sind.

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AD	Antidepressiva
AVP	Arginin-8-Vasopressin
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
B _{max}	Maximalbindung
BNST	Bed Nucleus Stria Terminalis
BrdU	5'Bromo-2-desoxy-Uridin
CBG	Corticosteron-bindendes Globulin
cRNA	Transport-Ribonucleinsäure
CRH	Corticotropin-freisetzendes Hormon
R1	CRH-Typ 1-Rezeptoren
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DG	Gyrus dentatus
DNA	Deoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	Elektroenzephalogramm
EMG	Elektromyogramm
EPM	elevated plus-maze
EtOH	Alkohol
EW	Edinger-Westphalkern
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
IGF-I	<i>insulin-like growth factor I</i>
IR	Immunreaktivität
K _d	relative Bindungsaffinität
Ki-67	Proliferationsmarker
KO	Kontrolle
LC	Locus coeruleus
LR	Laufrad
MR	Mineralocorticoid-Rezeptor
mHb	<i>modified hole board</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonucleinsäure
NA	Noradrenalin
OXT	Oxytozin
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PFA	Paraformaldehyd
PVN	Nucleus paraventricularis
REMS	<i>rapid eye movement</i> -Schlaf
rpm	Umdrehung pro Minute
SSC	Saline-Natrium-Citrat-Puffer
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
SOD	sozialer Konflikt
SWA	<i>slow wave activity</i>
TH	Tyrosinhydroxylase
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UCN	Urocortin

1 Einleitung

1.1 Das Laufradmodell

Ausdauernde körperliche Aktivität übt eine Vielzahl von positiven Effekten auf einen Organismus aus. Im Tiermodell wurde das freiwillige Laufen in einem Laufrad zum ersten Mal 1898 von Stewart beschrieben. Er untersuchte den Einfluss auf die Nahrungsaufnahme, den Alkoholkonsum und den Blutdruck in Wildratten. Es zeigte sich, dass die freiwillige Benutzung eines Laufrades nicht ein Einzelphänomen darstellt, sondern, dass es sich hierbei um ein „natürliches“ Verhalten von Labortieren handelt, ein Verhalten, das auf Bewegungsdrang basiert. So wurde es nicht nur bei Nagetieren, sondern auch bei Hühnern, Katzen, Füchsen, Wiesel und sogar bei dem Tasmanischen Teufel beobachtet (zur Übersicht Sherwin, 1998). Es wurde ebenfalls festgestellt, dass Umwelteinflüsse von großer Bedeutung für die Laufaktivität sein können, zum Beispiel kann kontinuierliches Licht das Laufen inhibieren (Antipas et al., 1990). Weitreichende Studien, welche das Laufverhalten in Verbindung mit einer zirkadianen Abhängigkeit untersuchten, stellten fest, dass die Tiere vornehmlich in der Aktivitätsphase, bei Mäusen die Dunkelphase, laufen. Aus diesem Grund wird das Modell zu Untersuchungen des zirkadianen Rhythmus und Störungen desselben herangezogen (Solberg et al., 1999).

Ebenso wie Umwelteinflüsse scheinen auch hormonelle Schwankungen eine Rolle für das Laufverhalten zu spielen, wie zum Beispiel der östrogene Zyklus bei den weiblichen Mäusen sich in der freiwilligen Benutzung des Laufrades widerspiegelt (Kock & Rohn, 1971). Die Entfernungen, die dabei von den Tieren zurückgelegt werden, variieren sogar unter verschiedenen Stämmen sehr stark (Ebihara & Tsuji, 1976; Festing, 1977), und es scheint einen Zusammenhang zwischen Geschlecht und Alter, der Geschwindigkeit, der Sequenz und der Unterbrechungssequenz des Laufens zu geben (Ebihara & Tsuji, 1976; zur Übersicht Sherwin, 1998). Das Laufen scheint für die Labortiere eine bedeutende Rolle zu spielen, denn wenn man ihnen nur einen restriktiven Zeitraum zum Laufen und zum Fressen gibt, laufen die Tiere auf Kosten der Futteraufnahme, was bis hin zu Symptomen der Anorexia nervosa und schlussendlich zum Tode führen kann (Burden et al., 1993; Davis, 1997).

Das Laufrad wird auch als Teil einer erweiterten Umgebung (*enriched environment*) verwendet, in der Mäuse generell ein erhöhtes exploratives Verhalten

zeigen (Mech, 1994), was aber auch wieder stammspezifisch zu sein scheint (Van de Weerd et al., 1994). Des Weiteren wurde eine erhöhte Neurogenese (Neubildung von Neuronen) im Hippokampus von Mäusen beobachtet, die in einer erweiterten Umgebung gehalten wurden (van Praag et al., 1999a). Der wichtigste Bestandteil der erweiterten Umgebung scheint dabei das Laufrad zu sein (van Praag et al., 1999a; siehe 1.6).

Neben den bereits erwähnten Veränderungen scheint moderates ausdauerndes Laufverhalten einen immunmodulatorischen Effekt auszuüben (zur Übersicht Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000). Diesbezügliche Untersuchungen zeigten einen Anstieg der Plasmakonzentrationen an Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und verschiedenen Zytokinen sowohl während, als auch nach einer aerobischen Aktivität; ebenso konnte eine erhöhte Funktion der Neutrophilen, der *Natural Killer*-Zellaktivität und der natürlichen Immunität festgestellt werden (Jonsdottir, 2000). Insgesamt scheint regelmäßiges freiwilliges Laufen eine erhöhte Resistenz gegenüber Infektionen zu bewirken.

Im Tiermodell wird die Benutzung eines Laufrades für Untersuchungen des Einflusses von körperlicher Aktivität (Sport) auf die verschiedensten organischen und psychischen Parameter angewendet. Dies liegt begründet in einer Vielzahl von vergleichbaren Effekten, die sowohl beim Menschen als auch beim Tier zu beobachten sind, wie eine Abnahme des Körpergewichtes, eine Verbesserung des Herz/Kreislaufsystems, Stabilisierung des Immunsystems, des Stresssystems und des Wohlbefindens. Einige der hier aufgeführten Punkte werden im Folgenden näher erläutert.

1.2 Die HPA-Achse

Werden an einen Organismus Anforderungen gestellt, reagiert er sehr sensibel darauf. Stress führt hierbei zu Anpassungsreaktionen des Organismus, die dazu dienen, auf interne und externe Bedrohung des physiologischen Gleichgewichtes in adäquater Weise zu reagieren und auszugleichen. Als erste Reaktion kommt es zur so genannten „Kampf oder Flucht-Reaktion“, die durch das sympathische Nervensystem (Adrenalin und Noradrenalin) vermittelt wird. Es steigt zum Beispiel der Blutdruck, der Puls wird schneller, die Verdauung verzögert sich und die Empfindlichkeit der Schmerzrezeptoren wird herabgesetzt. In höheren Organismen wird die folgende Stressreaktion über die Ausschüttung von Cortisol/Corticosteron

aktiviert. Eine Regulation der Stressreaktion findet über die HPA-Achsen-Aktivität statt, wobei eine große Zahl anderer Neuropeptide und Systeme, wie das noradrenerge, adrenerge und serotonerge System, einen Einfluss ausüben. Von großer Bedeutung für das Ausmaß der Stressreaktion ist, um welche Art von Stress und um welchen Umfang (Dauer, Intensität) es sich handelt (Koolhaas et al., 1997; Pacak et al., 1998). Der Begriff Stress wurde als erstes von Hans Selye (1946) beschrieben. Er definierte Stress als unspezifische Reaktion des Körpers auf eine von außen kommende Belastung, die das physiologische Gleichgewicht stört, und die belastenden Faktoren als Stressoren. Als wichtigsten hormonellen Mediator bezeichnete er die von der Nebennierenrinde ausgeschütteten Glucocorticoide Cortisol/Corticosteron. Er erkannte auch, dass es zu Fehlfunktionen des Organismus führt, wenn der Körper kontinuierlich versucht sich starkem Stress anzupassen. Das für die Stressreaktion und seinen Ausgleich wichtigste System ist die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (*hypothalamic-pituitary-adrenocortical* = HPA)-Achse (s. Abb. 1).

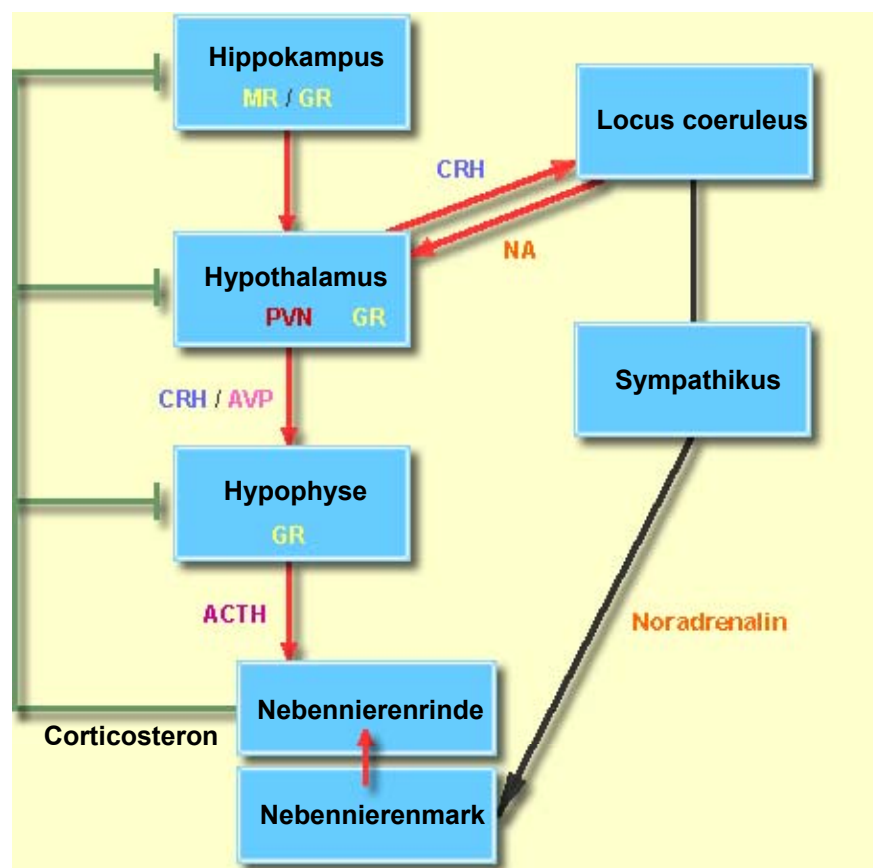


Abb. 1 Schematisch vereinfachte Darstellung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HPA)-Achse mit dem Einfluss des sympathischen Nervensystems. Rot dargestellt sind stimulierende und grün inhibierende Einflüsse. Der Einfluss des sympathischen Nervensystems auf die HPA-Achse ist schwarz dargestellt.

Der Hypothalamus ist eine Hirnregion, die eine immense Menge von Funktionen kontrolliert. Er integriert neuroendokrine und vegetative Regulationen und übt einen Einfluss auf das motorische und kognitive Verhalten aus. Auf der neuroendokrinen Ebene sind hierbei die Projektionen des Nucleus paraventricularis (PVN) zur Adeno- und Neurohypophyse die bedeutendsten. Der PVN besteht aus zwei verschiedenen Nervenzelltypen, die sich sowohl bezüglich ihrer morphologischen als auch ihrer Projektionsareale unterscheiden. Die größeren magnozellulären Neuronen, die neben dem PVN ihre Perikarien auch im hypothalamischen Nucleus supraopticus (SON) haben, bilden die Peptide Arginin-8-Vasopressin (AVP) und Oxytozin (OXT), die sie durch ihre Axone über die Zona interna der Eminentia mediana zur Neurohypophyse transportieren. Sie werden in terminalen Vesikeln gespeichert, und je nach Stimulus unabhängig voneinander in den Blutkreislauf abgegeben. Vasopressin, auch antidiuretisches Hormon genannt, reguliert den Wasserhaushalt (die Niere ist sehr sensitiv für AVP) und die Vasokonstriktion. Das strukturell sehr ähnliche OXT reguliert die Kontraktion der Uterus- und der Milchdrüsenmuskulatur (Cunningham & Sawchenko, 1991). Die kleineren kompakteren parvozellulären Neuronen des PVN sind ein Hauptbestandteil der hypothalamo-adenohypophysär-adrenocorticalen Achse. Sie bilden, im intermediären Teil AVP und andere Neuropeptide, und im medialen Teil Corticotropin freisetzendes Hormon (*corticotropin-releasing hormone* = CRH) (Vale et al., 1981; Sawchenko et al., 1984). Es wird über die Axone in die Zona externa der Eminentia mediana transportiert, wo es stimulus-abhängig in das Portalblut abgegeben wird (Whitnall et al., 1985). In einer weiteren Zellgruppierung sind beide Neuropeptide (CRH und AVP) co-lokalisiert und können in synergistischer Weise die Freisetzung von Adrenocorticotropin (ACTH) aus den corticotropen Zellen der Adenohypophyse stimulieren (Whitnall et al., 1985; De Goeij et al., 1991).

Die Hypophyse (Hirnanhangdrüse) besteht aus der Adenohypophyse (Hypophysenvorderlappen) und der Neurohypophyse (Hypophysenhinterlappen). In der Adenohypophyse binden die vom PVN ausgeschütteten Peptide CRH und AVP an ihre entsprechenden membranständigen Rezeptoren, CRH-Typ 1-Rezeptoren (CRH-R1) bzw. AVP-Typ-1b-Rezeptoren (AVP-R1b), der corticotropen Zellen (Aguilera et al., 1987, Aguilera, 1994). CRH, und in geringerem Maße auch AVP, stimulieren die Sekretion von ACTH (Gillies et al., 1982; Rivier & Vale, 1983a). Unter Stressbedingungen konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis von CRH zu AVP

eine besondere Bedeutung erlangt, denn dann wirken beide synergistisch auf die ACTH Sekretion (Rivier & Vale, 1983b, Whitnall et al., 1985). ACTH wird in der Hypophyse aus einem Vorläuferprotein, dem Proopiomelanocortin (POMC) neben anderen Hormonen wie zum Beispiel β -Endorphin synthetisiert (Bugnon et al., 1979). Ein weiteres wichtiges Hormon der Adenohypophyse ist Somatotropin (Wachstumshormon, GH) das die Bildung von Somatomedinen (*insulin-like growth factor* (IGF) I und II), Proinsulin ähnlichen Peptiden, stimuliert. Sie sind Wachstumsfaktoren, die in der Leber gebildet werden und ohne Speicherung in den Blutkreislauf abgegeben werden.

Das in den peripheren Blutkreislauf abgegebene ACTH induziert auf der Ebene der Nebennierenrinde die Freisetzung von Glucocorticoiden (Rivier & Vale 1983a, b). Die Nebennierenrinde besteht aus drei konzentrischen Schichten, die in ihrer Funktion variieren. Die innerste Schicht, die Zona reticularis, bildet hauptsächlich Testosteron, die äußerste Schicht, die Zona glomerulosa, bildet und sezerniert das Mineralocorticoid-Hormon Aldosteron (Salz- und Wasserhaushalt). Die mittlere Schicht, die Zona fasciculata, bildet die Glucocorticoide Corticosteron (Ratte, Maus) bzw. Cortisol (Mensch, Schwein). Die hauptsächliche Stimulierung der Ausschüttung in den Blutkreislauf findet durch ACTH statt, allerdings haben auch verschiedene Hormone des Nebennierenmarks, wie zum Beispiel Noradrenalin, einen wichtigen modulatorischen Einfluss, da auch sie die Glucocorticoidsekretion auslösen können (Bremner et al., 1996).

Die Glucocorticoide nehmen ihrerseits über verschiedene negative Rückkopplungs-Mechanismen auf die HPA-Achsen-Aktivität Einfluss (Dallman et al. 1989). Diese negative Rückkopplung involviert neben dem PVN auch Strukturen im frontalen Kortex und im limbischen System, die übergeordnet an der Regulation der HPA-Achse beteiligt sind (Sapolsky & McEwen 1985; De Kloet 1991; Vázquez et al. 1996). Die Suppression der HPA-Achse wird über Mineralocorticoid-Rezeptoren (MR) und Glucocorticoid-Rezeptoren (GR) vermittelt (zur Übersicht Reul et al., 2000). Der Hippokampus weist eine große Anzahl an GRs und die höchste Dichte an MRs im Gehirn auf (Reul & de Kloet, 1985; Reul et al., 1987). Glucocorticoide binden mit 6-10fach höherer Affinität an die MRs, so dass unter Basalbedingungen, während der Tal-Phase des zirkadianen Verlaufs der Corticosteron-Sekretion, die MRs nahezu gesättigt sind, und während der Hochphase in der Nacht (in Nagern wie Ratten und Mäusen) und unter Stressbedingungen auch die GRs besetzt werden, und somit zu

der oben genannten negativen Rückkopplung beitragen (Reul & de Kloet, 1985; De Kloet & Reul, 1987; Dallman et al., 1989; De Kloet, 1991).

Unter normalen Bedingungen ist das im Blutkreislauf zirkulierende Corticosteron zu mehr als 95% an das Corticosteron-bindende Globulin (CBG), und zu einem weit geringeren Teil an Albumin, zu dem es nur eine sehr geringe Affinität aufweist, gebunden (Hammond et al., 1990). Demnach liegt nur ein sehr geringer Anteil an Corticosteron ungebunden vor, und ist somit biologisch relevant, denn nur in diesem Zustand kann es mit MR und GR interagieren. CBG wird in der Leber synthetisiert und freigesetzt und wird über negative Rückkopplung von ACTH und Glucocorticoiden kontrolliert (Smith & Hammond, 1992). Normalerweise übt CBG eine Art Schutzfunktion aus, denn es schützt einerseits das Corticosteron vor dem Abbau, und puffert andererseits die Blutkonzentration von freiem Corticosteron (Hammond et al., 1990). CBG ist nicht Blut-Hirn-Schranken gängig.

1.2.1 Regulation der HPA-Achse bei stressvollen Stimuli

Die HPA-Achsen-Aktivität ist durch einen zirkadianen Verlauf geprägt. Der SCN (Nucleus suprachiasmaticus) wirkt dabei als zirkadianer Rhythmusgenerator, von dem zirkadiane Rhythmen der Nervenimpulse abgeleitet werden können (Turek, 1994). Plasma-ACTH zeigt einen nicht so deutlich ausgeprägten zirkadianen Verlauf wie Corticosteron. In der Hochphase (nachts, in der Aktivitätsphase der Mäuse) steigen die ACTH-Konzentrationen um etwa 50-150% an, die von Corticosteron aber um das 10-20fache, verglichen zur Talphase (Dunn et al., 1972). Demzufolge scheint die Sensibilität der Nebennierenrinde für ACTH starken tageszeitlichen Schwankungen zu unterliegen. Neben der HPA-Achse übt auch das sympathische Nervensystem über das Nebennierenmark, und die hier enthaltenen Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin, einen Einfluss auf die Sensibilität der Nebennierenrinde für ACTH und die Glucocorticoid-Sekretion aus (Jasper & Engeland, 1994).

Unter Normalbedingungen reagiert das HPA-Achsen-System in einer adäquaten Weise um den Organismus aufrecht und ausgeglichen zu erhalten. Adäquat heißt hierbei, dass die Glucocorticoid-Spiegel, wenn notwendig (d. h. unter stressvollen Bedingungen), schnell erhöht werden können. Dies führt dann zu einer Besetzung der GRs, und zu einer durch die negative Rückkopplung ausgelösten schnellen Drosselung der Glucocorticoid-Synthese, und somit zur Rückkehr ins Gleichgewicht (Dallman et al., 1987). Unter bestimmten Bedingungen kommt es

allerdings zu einer Störung der HPA-Achse. So wurde zum Beispiel eine erhöhte Aktivität der HPA-Achse bei depressiven Patienten beschrieben (Holsboer, 1989; Holsboer & Barden 1996). Der sogenannte Dex/CRH-Test ermöglicht eine Funktionskontrolle der HPA-Achse. Hierfür wird dem Patienten oral der synthetische Glucocorticoid-Agonist Dexamethason (1.5 mg, 23 h) appliziert. Es wird die negative Glucocorticoid-Rückkopplung auf Ebene des ACTH untersucht, denn unter Normalbedingungen sollte eine Suppression der ACTH-Freisetzung stattfinden. Eine zusätzliche Stimulation der corticotropen Zellen durch intravenöse Applikation von exogenem CRH (100 µg, 15 h folgender Tag) (Holsboer et al. 1987) kann zeigen, ob auf der Ebene der Adenohypophyse Veränderungen vorliegen. Normalerweise sollte eine Suppression von ACTH und Glucocorticoiden aufgrund der negativen Rückkopplung stattfinden. Mit Hilfe dieses Testes konnte gezeigt werden, dass bei depressiven Patienten eine verminderte Suppression der basalen sowie der CRH-stimulierten ACTH-Freisetzung durch Dexamethason stattfindet (Heuser et al., 1994; Holsboer & Barden 1996). Demnach war eine verminderte negative Rückkopplung der Glucocorticoide bei depressiven Patienten vorhanden. Außerdem zeigten die adenohypophysären corticotropen Zellen eine Desensibilisierung der CRH-R1-Rezeptoren (von Bardeleben et al., 1988). Anhand von post-mortem Gewebe konnte gezeigt werden, dass auf hypothalamischer Ebene (PVN) sowohl die Zahl der CRH und CRH/AVP exprimierenden Neuronen als auch die mRNA-Konzentrationen von CRH und AVP in depressiven Patienten deutlich erhöht war (Raadsheer et al., 1994, 1995). Dies deutet auf eine generell erhöhte Aktivität der paraventriculären Neuronen hin, und das trotz einer bereits erhöhten Glucocorticoid-Zirkulation.

Mittlerweile geht die Theorie soweit, dass ein deutlicher Zusammenhang zwischen chronischem Stress und psychiatrischen Erkrankungen besteht, da der Organismus ständig in Alarmbereitschaft versetzt ist, und die dringend benötigten Ruhephasen kürzer werden. Eine hilfreiche Medikation bei manifestierter Depression bieten Antidepressiva. Sie werden nach ihrem Wirkungsmechanismus oder ihrer chemischen Struktur klassifiziert. Es gibt selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRI), selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Verstärker (SSRE), selektive Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer (SNRI), selektive Serotonin/Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSNRI), Monoaminoxidase (MAO)-Hemmer und trizyklische Antidepressiva (TCA). Fast allen Antidepressiva ist gemein, dass sie die postsynaptische Transmitterkonzentration an Noradrenalin bzw. Serotonin erhöhen,

weshalb ursprünglich davon ausgegangen wurde, dass Fehlfunktionen der monoaminergen Neurotransmission zur Depression führen. Zahlreiche Befunde zeigen allerdings, dass infolge einer Antidepressiva-Behandlung es zunächst zu einer Normalisierung der HPA-Achsen-Aktivität kommt (zum Beispiel Senkung der CRH-Konzentrationen im Liquor (De Bellis et al., 1993)), bevor eine klinische Verbesserung beobachtet werden konnte (Heuser et al., 1996; Zobel et al., 1999). Die hier greifenden Mechanismen sind noch nicht eindeutig geklärt. Ebenfalls ungeklärt ist, warum die klinische Wirkung erst lange nach den vermutlich raschen Effekten auf zellulärer Ebene eintritt, was ebenfalls im Tiermodell nachgewiesen wurde (Reul et al., 1983; Barden & Holsboer, 1996; Gesing et al., 2001). Es wird davon ausgegangen, dass die Primärwirkung der Antidepressiva (Neurotransmitter-Inhibition) eine Kaskade von metabolischen Veränderungen auslöst. Hierbei scheint der Hippokampus eine initiale Rolle für die Normalisierung der HPA-Achse zu spielen, denn er wird u. a. durch Projektionen noradrenerger und serotonerger Neuronengruppen (Locus coeruleus und Raphekerne) innerviert (zur Übersicht Bremner et al., 1996; Meijer & De Kloet, 1998). Hier scheint die Funktion von MR und GR den entscheidenden Anstoß zu geben (Meijer & De Kloet, 1998; Reul et al., 2000a, b; Gesing et al., 2001).

1.3 Das sympathische Nervensystem

Das vegetative Nervensystem passt die Prozesse im Körperinneren bei Belastung des Organismus an. Es regelt die lebenswichtigen Funktionen wie zum Beispiel Kreislauf, Verdauung, Stoffwechsel und Körpertemperatur. Es besteht aus Sympathikus, Parasympathikus und dem Darmnervensystem. Der sympathische Teil enthält eine nervöse Komponente, das sympathische Nervensystem, und eine endokrine Komponente, die durch die im Plasma zirkulierenden Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin repräsentiert ist. Diese Moleküle entstehen in den Endigungen sympathischer Nervenfasern (Noradrenalin, oder/und der Neurotransmitter Acetylcholin und diverse Co-Transmitter) und im Nebennierenmark (Adrenalin und Noradrenalin). Das Nebennierenmark besteht hauptsächlich aus chromaffinen Zellen, in denen aus dem Vorläufer Tyrosin mit Hilfe der Tyrosinhydroxylase (TH) über einen mehrstufigen Syntheseweg Noradrenalin (NA) und schließlich Adrenalin (A) gebildet wird (Perlman & Chalfie, 1977). Die Sekretion dieser Hormone geschieht über eine Stimulierung durch Acetylcholin, das durch

präganglionäre sympathische Fasern das Mark innerviert (Perlman & Chalfie, 1977). Das Nebennierenmark ist somit ein Ausläufer des sympathischen Nervensystems. Viele verschiedene Einflüsse (Stress (Perronet & Szabo, 1987), Sport (Perronet & Szabo, 1987), Hypoglykämie (Levin & Sullivan, 1987)) können die Ausschüttung hervorrufen.

Das kardiovaskuläre System wird generell positiv durch moderate Bewegung beeinflusst. So wurde sowohl im Tiermodell (Kramer et al., 2000) als auch in humanen Studien (zur Übersicht Gielen et al., 2001) gezeigt, dass die Herzschlagrate unter basalen Bedingungen erniedrigt ist, und eine erhöhte oxidative Kapazität sowie eine Erniedrigung des Blutdrucks als Folge von ausdauernder körperlicher Aktivität auftritt. Aus diesem Grund wird moderate Bewegung auch als Therapie bei koronaren Erkrankungen und Infarkten angewendet (zur Übersicht Hardman et al., 1996). Körperliche Belastung erhöht somit die sympathische Aktivität auch in Bezug auf NA- und A-Plasmakonzentrationen, die exponentiell abhängig von der Intensität bis zu 50fach ansteigen können (Vendsalu, 1960).

1.4 Einfluss von körperlicher Aktivität auf die Stressreaktion

Wie bereits besprochen geht eine normale Stressreaktion mit einer Aktivierung der HPA-Achse einher. Es ist auch erwähnt worden, dass es auf der Ebene der Nebenniere zu einer Interaktion zwischen dem HPA-Achsen-System und dem sympathischen Nervensystem kommt, was letzten Endes die Glucocorticoid-Sekretion dieses endokrinen Organs bestimmt.

Hier setzen auch die positiven Auswirkungen von moderater körperlicher Aktivität auf den Organismus an, denn eine Senkung der Aktivierung beider Systeme führt u. a. zu einer Verminderung des Risikos der Manifestation von Erkrankungen, die durch chronischen Stress begünstigt werden. So wurde eine Verminderung besonders im Bereich der Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Hypertonie, Herzinfarkt) beschrieben (zur Übersicht Hardman, 1996), gewinnt aber immer mehr Bedeutung auch im Bereich psychiatrischer Erkrankungen (Angst und Depression) (zur Übersicht Byrne & Byrne, 1993; Salmon, 2001).

Die meisten Konzepte, welche zum besseren Umgang mit Stress entwickelt wurden, gehen davon aus, dass durch ausdauernde körperliche Aktivität eine Vergrößerung der aeroben Kapazität der peripheren Muskulatur und damit eine verbesserte Herz-Kreislauf-Regulation und insbesondere ein günstigeres

physiologisches Stressreaktionsmuster erreicht wird. Dies entspricht im wesentlichen einem Adaptionsmechanismus, der somit zu weniger starken kumulativen Effekten von chronischem Stress führt (zur Übersicht Byrne & Byrne, 1993; Salmon, 2001).

Allerdings gibt es in diesem Bereich viele kontroverse Theorien und widersprüchliche Ergebnisse. Da eine große Anzahl von interagierenden Faktoren beteiligt ist, gibt es nach wie vor keine eindeutige Erklärung dafür, warum ausdauerndes Training einen anxiolytischen und antidepressiven Effekt auf die Psyche eines Individuums ausüben kann.

1.5 Das corticotropin-releasing hormone (CRH)-Rezeptor-System

Das 41 Aminosäuren (AS) große Peptid CRH wurde von Vale et al. (1981) zum ersten Mal isoliert und seine Bioaktivität charakterisiert. Es ist ein Mediator der endokrinen, autonomen und immunen Stressreaktion (Vale et al., 1981; De Souza et al., 1995). Außerdem scheint es eine bedeutende Rolle in der Koordination der autonomen und verhaltenstypischen Reaktion auf einen Stressor, wie zum Beispiel bei ängstlichem Verhalten, Fressverhalten, Erregung, Lernen und Gedächtnis, zu spielen (De Souza et al., 1995; Koob & Heinrichs, 1999). Neben dem PVN (Wirkungsweise unter Abschnitt 1.2 erläutert) wurde eine Immunoreaktivität (IR) im zentralen Kern der Amygdala, dem BNST (bed nucleus stria terminalis), dem Nucleus parabrachialis, dem Hippokampus und dem Hirnstamm nachgewiesen (Sawchenko & Swanson, 1985). Im Plasma ist CRH normalerweise an das CRH-Bindungsprotein (37 kDa, CRF-BP) gebunden, über dessen Regulation auch eine Modulation der Stress-Responsivität gezeigt worden ist (Behan et al., 1995).

Vaughan et al. (1995) charakterisierte ein weiteres Neuropeptid, das neben CRH und den Nicht-Säuger Peptiden Sauvagin (Amphibien) und Urotensin I (Fische), zur CRH-Familie gehört. Urocortin (40 AS, UCN) weist eine Homologität der Sequenz zu Urotensin I (63%) und dem Säuger CRH (45%) auf. Die Regionen mit der höchsten Expression von UCN mRNA sind der Edinger-Westphalkern (EW) und die laterale Oliva superior (LSO, beide exprimieren kein CRH). Andere Regionen mit geringerer Expression an UCN mRNA sind Abbildung 2B zu entnehmen. Es wurde weiterhin gezeigt, dass UCN auch außerhalb des zentralen Nervensystems, in peripheren Blutleukozyten, dem Herzen und der Plazenta exprimiert wird (Latchman, 2002).

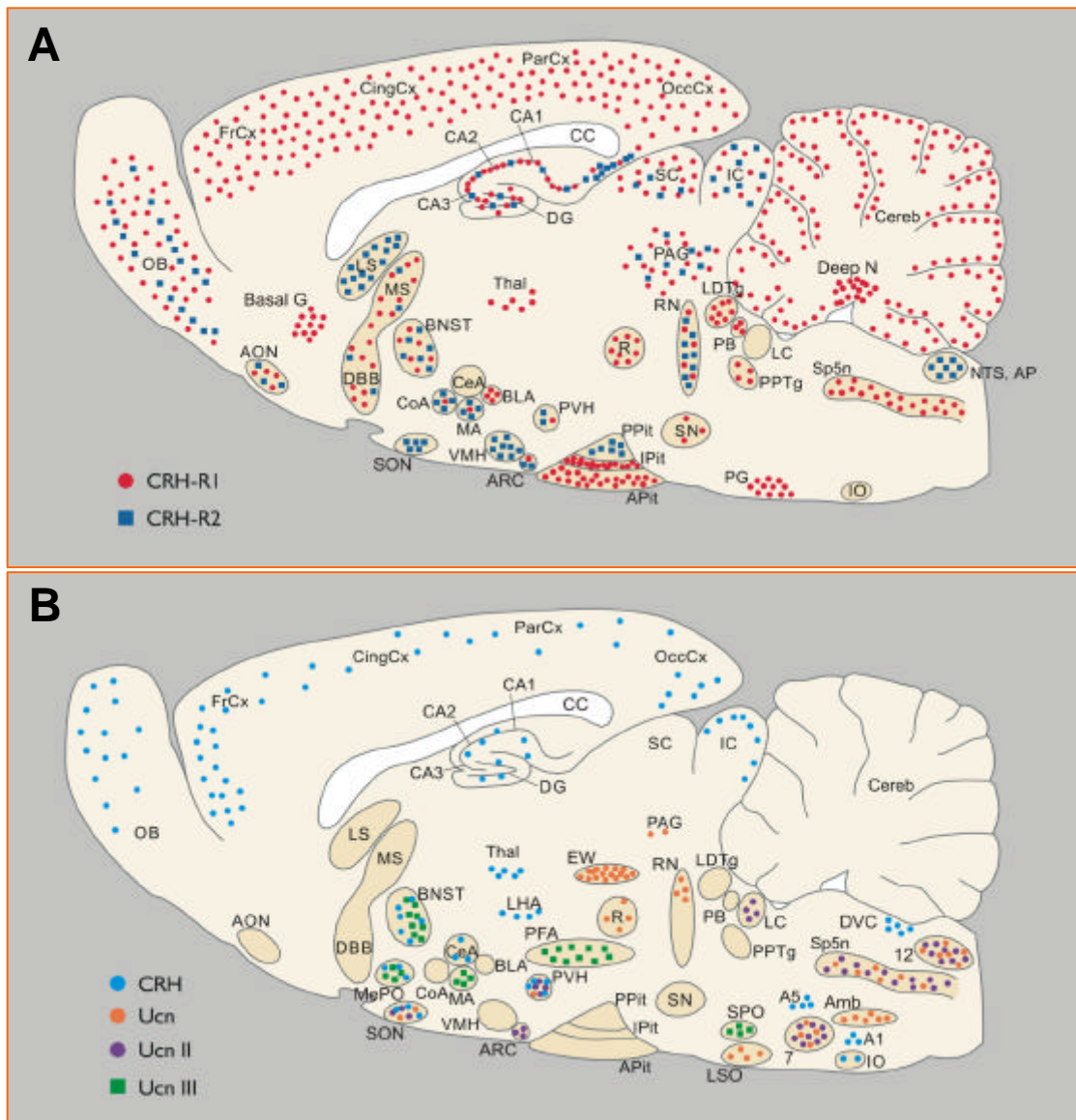


Abb. 2 Verteilung von A) CRH-R1 und CRH-R2 mRNA und B) von CRH, UCN (Ucn), UCN (Ucn) II und UCN (Ucn) III mRNA in einem 2-dimensionalen sagittalen Querschnitt eines Nagergehirns (Abb. J.M.H.M. Reul persönlich).
 Abkürzungen: 7, facialer Kern; 12, hypoglossaler Kern; Amb, ambiguus Kern; AON, vorderer olfaktorischer Kern; AP, Area postrema; APit, Hypophysenvorderlappen; ARC, Nukleus arcuate; Basal G, Basalganglion; BLA, basolaterale Amygdala; CA 1-3, Felder CA 1-3 des Ammon Horns; CC, corpus callosum; CeA, zentraler Kern der Amygdala; Cereb, Cerebellum; CingCx, cingulater Kortex; CoA, korticaler Kern der Amygdala; D 88, diagonales Brocaband; Deep N, tiefer Kern; DG, Gyrus dentatus; FrCx, frontaler Kortex; IC, inferior colliculi; 10, inferior olive; IPit, mittlerer Teil der Hypophyse; LC, Locus coeruleus; LDTg, laterodorsaler tegmentaler Kern; LSO, laterale superior olive; MA, medialer Kern der Amygdala; MePO, mediane preoptische Region; MS, mediales Septum; NTS, Kern des Tractus solitarii; OB, Bulbus olfactorius; OccCx, occipitaler Kortex; PAG, periaquäduktales Grau; ParCx, parietaler Kortex; PFA, perifornikale Region; PG, pontine gray, PPit, Hypophysenhinterlappen; PPTg, pedunculopontiner tegmentaler Kern; R, roter Kern; RN, Raphekerne; SC, superior colliculi; SN, Substantia nigra; SON, supraoptischer Kern; SP5n, spinaler trigeminus Kern; SPO, superior paraolivärer Kern; Thal, Thalamus.

Neben Urocortin wurden noch zwei weitere Säuger CRH-verwandte Peptide identifiziert, Urocortin II (oder Stresscopin-verwandtes Peptid) und Urocortin III (oder Stresscopin). UCN II mRNA-Expression wurde in Regionen, die mit physiologischen Prozessen und Verhaltensreaktionen in Bezug zu Stress stehen (PVN, SON, Locus coeruleus (LC) und Nucleus arcuatus) nachgewiesen, aber auch in motorischen Kernen des Hirnstamms (siehe Abb. 2B; Reyes et al., 2001, Reul & Holsboer, 2002). Alle detektierten Regionen stehen in Zusammenhang mit den Lokalisationen von CRH-R2, zu dem UCN II eine sehr hohe Affinität aufweist (Reyes et al., 2001). UCN II wird außerhalb des ZNS im Herzen, den Nebennieren und in peripheren Blutzellen exprimiert (Hsu & Hsueh, 2001). Urocortin III (UCN III) (Lewis et al., 2001 (Nagetiere); Hsu & Hsueh, 2001 (Mensch)) ist das bisher letzte gefundene Mitglied der CRH-Neuropeptidfamilie. Es ist im Gehirn in der Area preoptica mediana, im BNST, der perifornikalen Region des Hypothalamus und im medialen Kern der Amygdala lokalisiert (s. Abb. 2B) (Lewis et al., 2001). UCN III wird generell weniger als UCN II exprimiert, hat aber außerhalb des ZNS eine hohe Abundanz im gastrointestinalen Bereich, den Muskeln, den Nebennieren und der Haut (Lewis et al., 2001; Hsu & Hsueh, 2001).

Als Bindungspartner stehen den vier Neuropeptiden zwei Typen von CRH-Rezeptoren zur Verfügung, zu denen sie unterschiedliche Bindungsaffinitäten aufweisen. Generell ist der CRH-Rezeptor ein membrangebundener G-Proteingekoppelter Rezeptor mit Adenylatzyklase-Funktion. Es gibt zwei Rezeptorsubtypen, den CRH-Rezeptor 1 (R1) (Perrin et al., 1993) und den Rezeptortyp 2 (R2) mit den zwei Splicingvarianten α und β (R2 α und R2 β) (Kishimoto et al., 1995; Lovenberg et al., 1995; Perrin et al., 1995). R2 α ist die abundante Form im ZNS, während R2 β hauptsächlich in der Peripherie zu finden ist. R1 wird weit verbreitet im Gehirn, mit hoher Abundanz im zerebralen Kortex, dem Septum, dem zentralen Kern der Amygdala und der Adenohypophyse exprimiert (s. Abb. 2A). Die Verbreitung von R2 α ist begrenzt auf die subkortikalen und limbischen Regionen (Lovenberg et al., 1995; Van Pett et al., 2000), R2 β mRNA wurde im Gehirn nur im Choroidenplexus und in einigen zerebralen Blutgefäßen nachgewiesen (Lovenberg et al., 1995).

Beide CRH-Rezeptoren spielen eine unterschiedliche Rolle in emotionalen Prozessen und ihrer Beziehung zu Stress, Angst und Depression (Steckler & Holsboer, 1999; Takahashi, 2001; Reul & Holsboer, 2002). R1 scheint eine wichtige Rolle in der stressinduzierten HPA-Achsen-Reaktion und im emotionalen Verhalten

zu spielen. R1 scheint somit für die regulatorischen Effekte des angstinduzierten Verhaltens von CRH zuständig zu sein, denn R1 bindet CRH mit sehr hoher Affinität und Studien an CRH-überexprimierenden transgenen Mäusen zeigten verstärktes Angstverhalten (van Gaalen et al., 2002). Untersuchungen an R1-*knockout*-Mäusen und R1-Antisense-Oligonukleotidstudien zeigten eine deutlich verringerte Ängstlichkeit (Timpl et al., 1998; Contarino et al., 1999; Liebsch et al., 1999). Des Weiteren wurden in klinischen Tests erfolgreiche Untersuchungen mit einem nicht-peptidergen R1-Antagonisten in depressiven Patienten durchgeführt (Zobel et al., 2000).

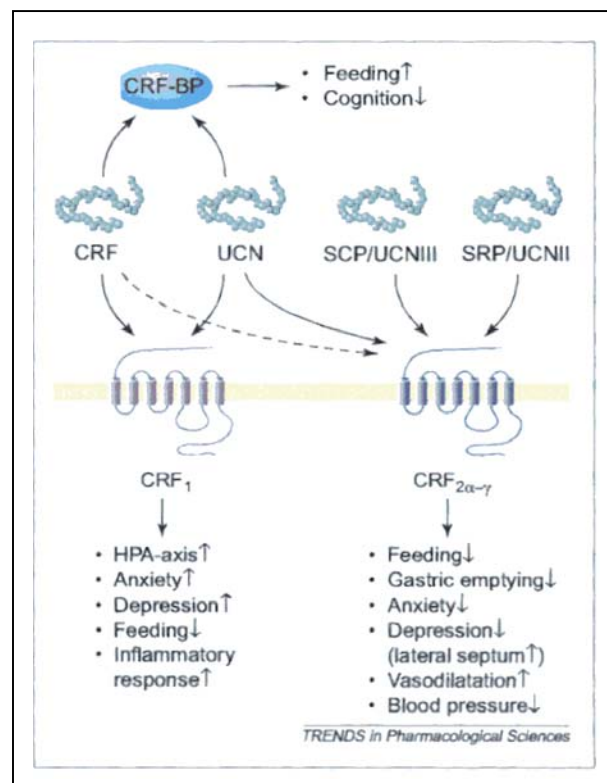


Abb. 3 Interaktion zwischen Säuger *corticotropin-releasing factor* (CRF bzw. CRH)-ähnlichen Peptiden, ihren Rezeptoren und dem CRH (CRF)-Bindungsprotein (CRF-BP). Die Bindung zum CRH-BP oder die Aktivierung der CRH (CRF)-Rezeptoren 1 und 2 stimuliert oder inhibiert eine Vielzahl von physiologischen Reaktionen. Weitere Abkürzungen: UCN = Urocortin; SCP = Stresscopin; SRP = Stresscopin-verwandtes Peptid (aus Dauzenberg & Hauger, TINS 2002)

So deutlich wie die Rolle von R1 lässt sich die Rolle von R2 nicht bestimmen, denn die Ergebnisse von Verhaltensexperimenten mit *knockout*-Tieren und Antisense-Studien sind kontrovers (Bale et al., 2000; Coste et al., 2000; Kishimoto et al., 2000). Es scheint so zu sein, dass die Aktivierung von R2 mal anxiogen und mal anxiolytisch wirkt, was wohl vom Zeitpunkt des Testes und der Lokalisation der

Rezeptoren abhängig ist (Reul & Holsboer, 2002). Generell erscheint es eher so, dass R1 und R2 in antagonistischer Weise auf einen Stress reagieren. R1 aktiviert die Stressreaktion, während R2 sie abschwächt, und in der Erholungsphase eher anxiolytisch wirkt.

R1 bindet UCN und CRH mit gleicher Affinität, während R2 UCN mit 40fach höherer Affinität als CRH bindet. Untersuchungen zur Lokalisation der beiden Rezeptortypen haben gezeigt, dass ein anxiolytischer Effekt des UCN wohl eher über R2 vermittelt wird, und Effekte auf den Appetit eher über R1 (s. Abb. 3). Daraus scheint hervorzugehen, dass R2 der eigentliche Bindungspartner von UCN ist, und die Appetitverminderung der Haupteffekt im Nervensystem ist. Außerhalb des NS wurde R2 im Herzatrium und den Ventrikeln nachgewiesen (Kishimoto et al., 1995), somit scheinen Regulationen im kardiovaskulären System die Hauptaufgabe des UCN außerhalb des Gehirns zu sein, da hier seine Auswirkungen stärker sind als die des CRH (Parkes et al., 2001, Latchman, 2002). UCN II und UCN III haben nur eine Bindungsaffinität zu R2 und binden nicht an R1 (s. Abb. 3). Dadurch sind ihre Wirkungsweisen an die des R2 gekoppelt.

Da es noch keine eindeutige Erklärung dafür gibt, aus welchem Grund körperliche Aktivität zu anxiolytischen und antidepressiven Effekten führt, wurden erste Untersuchungen am CRH/Urocortin-System durchgeführt, um eventuell dort einen Hinweis darauf zu erhalten.

1.6 Neurogenese

Wie schon unter 1.1 erwähnt wurde, scheint ausdauernde Bewegung einen Einfluss auf die Neubildung von Nervenzellen (Neurogenese) auszuüben. Während der Entwicklung des ZNS sind sowohl Neurogenese als auch der programmierte Zelltod (Apoptose) ein weitverbreitetes Phänomen. Der Gyrus dentatus (DG) ist eine der wenigen Regionen, in denen auch im adulten Gehirn Neurogenese noch stattfindet. Dies wurde zum ersten Mal von Altman und Das (1965) in Ratten gezeigt. Seither wurde sowohl in Neuweltprimaten als auch im Menschen Neurogenese nachgewiesen (Gould et al., 1997, 1998; Kornack & Rakic, 1999). Neben dem DG wurde auch in anderen Hirnregionen, wie dem Bulbus olfactorius (Riechkolben) und dem Neokortex, eine Neubildung und ein Überleben von Neuronen nachgewiesen (Kornack & Rakic, 2001; Rakic, 2002).

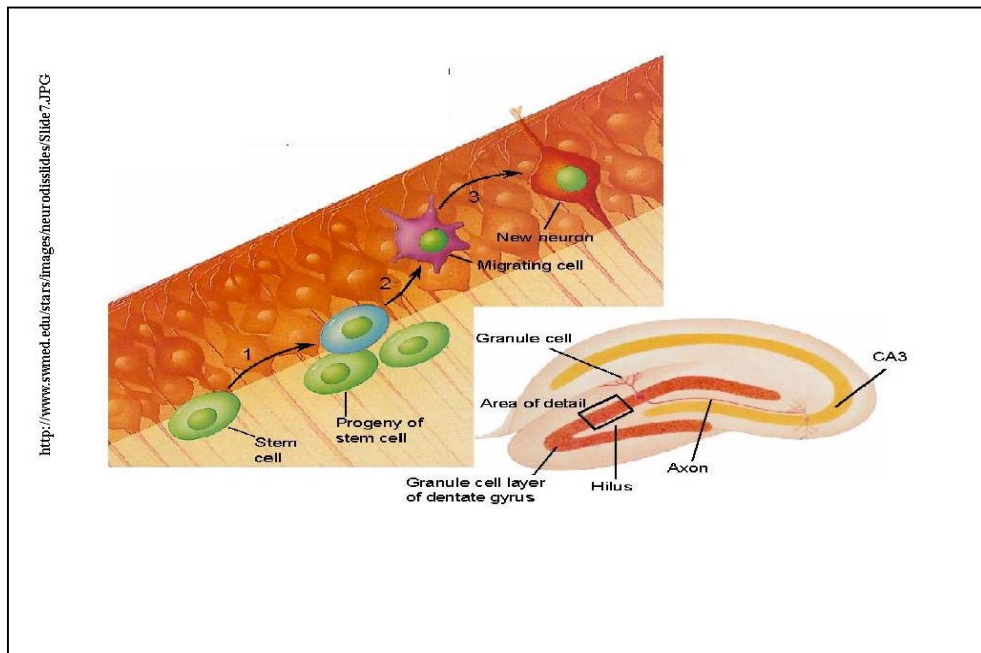


Abb. 4 Ablauf der Neurogenese im Gyrus dentatus. Aus Stammzellen bilden sich Vorläuferzellen in der subgranulären Zellschicht des Gyrus dentatus (1). Von dort migrieren sie in die granuläre Zellschicht (2), wo sie zu Neuronen heranreifen (3).

Neurogenese geht so vonstatten, dass so genannte Vorläuferzellen (*progenitor cells*) von Stammzellen abgeleitet werden, die in der subgranulären Zone (SGZ) des Hilus lokalisiert sind. Mit Hilfe einer Bromo-desoxy-Uridin (BrdU)-Injektion können die proliferierenden Zellen markiert werden, denn BrdU wird während der Zellteilung inkorporiert (Thymidin wird mit dem BrdU-Analogon ersetzt). Während der Reifung migrieren die Zellen in die granuläre Zellschicht (*granule cell layer*; s. Abb. 4) (Gould, 1994). Von dort expandieren sie Dendriten in Richtung der molekularen Zellschicht (*molecular cell layer*). Die Axone (*mossy fibers*) der granulären Neuronen projizieren in Richtung der pyramidalen Zellschicht in der CA2- und CA3-Region des Hippokampus (zur Übersicht Gould & Cameron, 1996). Während dieser Wanderung und Reifung fallen allerdings auch viele der neugeborenen Zellen der Apoptose zum Opfer.

In den ersten Studien wurde die Entdeckung der Neurogenese in einer so genannten erweiterten Umgebung (*enriched environment*) gefunden (Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 1999a). Dabei erhalten die Tiere in ihrem Heimkäfig verschiedene „Spielmöglichkeiten“ wie zum Beispiel Tunnel, Wippen oder Laufräder. In solch einem Umfeld wird den Tieren die Möglichkeiten geboten sozial zu interagieren, sich körperlich zu bewegen und vermehrt zu lernen. Dies entfällt bei

Tieren die unter Standardbedingungen gehalten werden. Den größten Einfluss für die Neurogenese scheint hierbei das Laufrad zu spielen, denn in Tieren, die die Möglichkeit hatten freiwillig zu Laufen, überlebten etwa doppelt so viele neugeborene Zellen wie in Tieren, die in einer erweiterten Umgebung ohne Laufrad gehalten wurden (van Praag et al., 1999a).

Eine Reihe von weiteren verschiedenen Faktoren können einen positiven oder negativen Einfluss auf die Neurogenese ausüben. Einen positiven Einfluss üben zum Beispiel regelmäßige aerobe Bewegung (Cotman & Berchthold, 2002), eine erweiterte Umgebung (Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 1999a) und Lernen (Gould et al., 1999; van Praag et al., 1999b) aus. Ebenfalls wurden positive Effekte auf die Neurogenese-Rate durch Östrogene (Gould et al., 2000; Banasar et al., 2001), Serotonin (Brezun & Daszuta, 1999; Banasar et al., 2001) und Wachstumsfaktoren wie BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) (Nibuya et al., 1995) oder IGF-I (*insulin-like growth factor I*) (Carro et al., 2000) nachgewiesen. Neuere Befunde sprechen Antidepressiva ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Neurogenese zu, denn es konnte gezeigt werden, dass eine chronische Gabe von Antidepressiva die Proliferation und Differenzierung erhöht (Malberg et al., 2000; Bilanz-Bleuel et al., in Vorbereitung). Eine Verminderung der Neurogenese wird durch Altern, Stress, Glucocorticoide und Krankheiten wie Alzheimer, Morbus Parkinson und Depression hervorgerufen (Cameron & Gould, 1994; Gould et al., 1997; zur Übersicht Gould et al., 2000).

Das klassische Werkzeug der Neurogeneseforschung sind Injektionen mit BrdU, das während der Zellteilung inkorporiert wird. Es markiert also nur sich teilende Zellen. Nachteilig ist die Art der Applikation (intraperitoneale Injektionen), die zu unspezifischen Stressreaktionen führen kann. Ein weiterer Nachteil ist die mögliche zelltoxische Wirkung. Deshalb wurden Untersuchungen mit dem endogenen Proliferationsmarker Ki-67 durchgeführt. Ki-67 ist ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch für Zellproliferation ist (zur Übersicht Brown und Gatter, 1990; Smith et al., 1995). Das Ki-67-Antigen ist eine Ribonukleotidreduktase, ein Protein, dass während dem Zellzyklus in allen Stadien, außer der G₀, exprimiert wird und an der DNA-Synthese beteiligt ist (Gerdes et al., 1984).

1.7 Einfluss von körperlicher Aktivität auf den Schlaf

Schlaf ist notwendig für die Regeneration des Organismus. Mit Hilfe des Elektroenzephalogramms (EEG) lassen sich quantifizierbare neurophysiologische Schlafparameter messen. Man unterscheidet den non-REM (*rapid eye movement*)-Schlaf und den REMS. Der non-REMS besteht aus vier Schlafstadien mit zunehmender Tiefe. Stadium 4 wird auch Delta- oder *slow wave sleep* (SWS, Tiefschlaf) genannt, das durch die *slow wave activity* (SWA) gekennzeichnet ist. Der REM-Schlaf ist durch eine Atonie der gesamten Willkürmuskulatur gekennzeichnet und ist dem Wachzustand am nächsten (zur Übersicht Zee & Turek, 1999; Hobson, 1999).

Der Schlaf-Wach-Rhythmus wird, wie auch andere periphere Rhythmen, hauptsächlich über den hypothalamen suprachiasmatischen Kern (SCN), der die interne Uhr eines Organismus darstellt, geregelt. Er spricht, wie auch die Epiphyse (Zirbeldrüse, Melatoninproduktion), auf Lichtreize an, die von der Netzhaut über den retino-hypothalamischen Pfad an den SCN geleitet werden. Die Uhren-Gene (*clock-genes*) im SCN werden daraufhin aktiv und senden Signale an die umliegenden Hirnregionen (zur Übersicht Turek, 1994, Zee & Turek, 1999). Neben dem Hell-Dunkel-Zyklus üben verschiedene non-photische Stimuli einen Einfluss auf den SCN aus. Zu ihnen gehören Erregung und Bewegung. Es konnte gezeigt werden, dass körperliche Aktivität, ausgelöst durch die Benutzung eines Laufrades, bei Mäusen zu einer Synchronisierung der inneren Uhr führen kann, und somit eine Art Zeitgeberfunktion ausübt (Edgar & Dement, 1991). Der positive Einfluss einer Rückkopplung könnte ein interessantes Bindeglied zwischen der Störung der zirkadianen Rhythmik und psychiatrischen Erkrankungen sein, da zum Beispiel Depressionen nicht selten mit Schlafstörungen einhergehen (zur Übersicht Winokur et al., 2001). Regelmäßige körperliche Aktivität zeigte neben einer generellen Stimmungsaufhellung auch eine merkliche Verbesserung des Schlafverhaltens (zur Übersicht Horne, 1981 & Kubitz et al., 1996; LaPerriere et al., 1994; Solberg et al., 1999).

Es wird generell angenommen, dass regelmäßige körperliche Aktivität einen positiven Einfluss auf den Schlaf ausübt, insbesondere unter stressvollen Bedingungen. Relativ viele Studien haben den Einfluss von körperlicher Aktivität auf die Quantität und die Qualität des Schlafes untersucht. Hierbei wurden allerdings sehr gegensätzliche Effekte in den meist humanen Studien gefunden. Dies kann

viele verschiedene Ursachen haben, zum Beispiel individuelle Unterschiede, Alter, Trainingsstatus, Art, Dauer und Intensität der körperlichen Aktivität und der Zeit, die zwischen Training und Schlaf liegt (zur Übersicht Horne, 1981 & Kubitz et al., 1996).

In Ratten und Mäusen findet man einheitlichere Schlaf-Wach-Muster als im Menschen (Welsh et al., 1988) und die äußeren Faktoren lassen sich besser minimieren, weshalb das Laufradmodell bei der Maus in Bezug auf Untersuchungen zum Einfluss ausdauernder körperlicher Aktivität auf verschiedene Schlafparadigmen sehr sensitiv zu sein scheint.

1.8 Ziel der Arbeit

Ausdauernde körperliche Aktivität übt eine Vielzahl von Effekten auf einen Organismus aus. Dabei kommt es zu Veränderungen seitens der verschiedensten zellulären, physiologischen und psychologischen Prozesse, deren Auswirkungen generell einen positiven Einfluss auf den Organismus ausüben. So ist eingehend beschrieben worden, dass positive Auswirkungen in Bezug auf das Herz/Kreislaufsystem und das Immunsystem zu beobachten sind. Es wird ebenfalls von positiven Effekten in Bezug auf den Umgang mit Stress und in der Therapie psychiatrischer Erkrankungen berichtet. Den meisten psychiatrischen Erkrankungen liegt eine Störung des HPA-Achsen-Systems zu Grunde, die durch chronischen Stress begünstigt wird. Zu diesen Erkrankungen gehören neben der Depression auch Angststörungen. Interessanterweise wurden recht wenig umfassende Untersuchungen in Bezug auf mögliche Veränderungen der HPA-Achse induziert durch ausdauernde körperliche Aktivität durchgeführt. Des Weiteren wird häufig von einem besseren Umgang mit stressvollen Ereignissen und des stressbedingten Verhaltens berichtet, allerdings sind umfassende Untersuchungen auch in diesem Bereich sehr dürftig und meist kontrovers.

Das Ziel der im Folgenden dargestellten Studien war es zu untersuchen ob, und wenn zu welchen Veränderungen ausdauernde körperliche Aktivität seitens verschiedener zellulärer, physiologischer und psychologischer Prozesse führt, um mögliche Erklärungsansätze für die berichteten anxiolytischen und antidepressiven Effekte zu finden. Vielleicht ist es möglich auf diesem Wege neue Ausgangspunkte für Pharmaka der Zukunft aufzudecken.

Die Untersuchungen wurden anhand eines Tiermodells durchgeführt. Es wurden männliche C57BL/6N Mäusen, die vier Wochen lang die Möglichkeit hatten

freiwillig ein Laufrad zu benutzen mit Mäusen, die keinen Zugang zu einem Laufrad hatten, verglichen.

Es sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Gibt eine umfassende Charakterisierung der HPA-Achse unter Basalbedingungen Aufschlüsse, warum ausdauernde körperliche Aktivität anxiolytisch und antidepressiv wirkt? Gibt es vergleichbare Veränderungen der HPA-Achse wie die durch Antidepressiva-Medikation hervorgerufenen, um so einen Hinweis auf die greifenden Prozesse zu erhalten?
- Übt das sympathische Nervensystem, das durch ausdauernde Bewegung aktiviert ist, einen Einfluss auf die HPA-Achse aus?
- Gibt es Veränderungen im CRH/Urocortin-System, denn CRH spielt eine bedeutende Rolle in der Depression?
- Wie reagiert die HPA-Achse dieser Tiere auf verschiedene Arten von Stress und welches stressbedingte Verhalten zeigen sie? Gibt es Hinweise auf geänderte Stressbewältigungsmechanismen?
- Ist es möglich die Neurogenese-Rate mit Hilfe endogener Marker zu bestimmen? Welche Effekte haben das Laufrad oder Stressoren auf die Neurogenese?
- Welche Auswirkungen von freiwilliger ausdauernder körperlicher Aktivität sind auf den normalen und stressbeeinflussten Schlaf in Mäusen zu beobachten?

2 Material und Methoden

2.1 Tiere und Tierhaltung

Die Untersuchungen wurden mit männlichen C57BL/6N Mäusen (Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Nach der Ankunft im Alter von 10-12 Wochen wurden die Tiere einzeln in Macrolon® type II Käfigen (43 x 24 x 15 cm) mit hohen Gitterdeckeln unter Standardbedingungen (Temperatur $22 \pm 1^\circ\text{C}$; Luftfeuchtigkeit $60 \pm 5\%$; freier Zugang zu Futter und Wasser; 12 h Licht-/12 h Dunkelphase (wobei das Licht um 6.00 h angeschaltet wurde) gehalten.

2.1.1 Behandlung mit Antidepressiva

Bei den Untersuchungen zu Antidepressiva wurde der selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Verstärker Tianeptin (Servier, Frankreich) in einer Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht/Tag über das Trinkwasser verabreicht. Das mittlere Trinkvolumen der Tiere wurde durch wiederholte Messung ihres Trinkkonsums bestimmt, und entsprechend dem mittleren Körpergewicht der Tiere wurde die Konzentration angepasst. Da das Medikament lichtinstabil ist, wurde es in lichtundurchlässige dunkle Flaschen gefüllt und täglich erneuert. Die Kontrolltiere erhielten normales Leitungswasser. Allgemein zeigte sich kein negativer Einfluss des Antidepressivums auf den Flüssigkeitskonsum der Tiere.

2.1.2 Experimentelles Design

In jedem der beschriebenen Versuche hatten die Mäuse nach Ankunft fünf Tage Zeit sich in den Experimentalräumen zu akklimatisieren, bevor die Experimente begannen. Die Grundbedingung bestand darin, dass ein Teil der Mäuse über einen Zeitraum von vier Wochen einen freien Zugang zu einem Laufrad (rostfreies Metall \varnothing 14 cm, Trixie, D.), das in den Heimkäfig gestellt wurde, hatte (s. Abb. 5). In dieser Zeit wurde das Laufverhalten der Tiere mit Hilfe einer Infrarotkamera oder eines magnetisch funktionierenden Zählersystems untersucht und mehrfach die volle Funktionstüchtigkeit der Räder überprüft.

Für die Untersuchungen der Laufaktivität und Untersuchungen zum Schlafverhalten wurden die Tiere in transparenten Plexiglaskäfigen (40 x 23 x 55 cm, Eigenbau des Institutes) gehalten, an denen ein Laufrad (Plexiglas \varnothing 27 cm) an der Rückseite des Käfigs befestigt war. Die Anzahl der Drehungen wurde hier über ein

automatisches magnetisches Zählersystem erfasst (Eigenbau des Institutes). Für die Schlafuntersuchungen wurden die Tiere in ihrem Heimkäfig in einem Faraday'schen Käfig gehalten, da sich jede Art von elektromagnetischer Strahlung störend auf die EEG-Aufzeichnung auswirken kann.

Des Weiteren wurden über diesen Zeitraum verschiedene physiologische Parameter untersucht und festgehalten. Wöchentlich wurde das Gewicht der Tiere und ihre Fressmengen, sowie die Trinkmenge über 24 h ermittelt. Nachdem die Tiere am Ende der vierwöchigen Laufperiode dekapitiert wurden, wurde ihnen der Thymus, die Nebennieren und das Bauchfettgewebe entnommen und gewogen. Einige Nebennieren, sowie in 2-Methylbutan schockgefrorene Gehirne (s. 2.4.3) wurden für weitere Untersuchungen auf -80°C eingefroren.



Abb. 5 Eine männliche C57BL/6N Maus bei Benutzung eines Laufrads (\varnothing 14 cm).

2.2 Stress- und Verhaltensexperimente

2.2.1 Erzwungenes Schwimmen (forced swimming)

Dieses Stressparadigma dient als Modell für einen kombinierten physischen und psychischen Stressor. Die Prozedur des Schwimmstresses wurde morgens zwischen 8.00 h und 10.00 h durchgeführt. Hierzu wurden die Tiere gezwungen für 10 Minuten in einem 2 l Becherglas, das mit 25°C warmen Wasser (14 cm hoch) gefüllt war, zu schwimmen. Entweder wurden die Tiere sofort im Anschluss oder 24 h später dekapitiert. Die 24 h verbrachten die Tiere in ihrem Heimkäfig.

2.2.2 Einsperrstress (restraint stress)

Dieses Stressparadigma hat sowohl eine sehr starke physische als auch psychische Komponente. Die Tiere wurden über eine Zeitspanne von 30 Minuten in einem Plastikröhrchen (12 cm Länge, Durchmesser 2.7 cm, Greiner, Frickenhausen, D.) immobilisiert, das sowohl Luftlöcher, als auch ein Loch für den Schwanz hatte. Sie hatten wenig Möglichkeit sich zu bewegen und keine Möglichkeit zu entkommen. Am Ende der Stressprozedur wurden die Tiere sofort dekapitiert.

2.2.3 Sozialer Konflikt (social defeat)

Für dieses mehr psychische als physische Stressparadigma wurde das jeweilige Versuchstier (*intruder*) in den Heimkäfig einer anderen Maus (*resident*) gesetzt. Da männliche Mäuse territorial veranlagt sind, attackiert der Resident den Eindringling, um ihn zu vertreiben. Nach dem ersten starken Angriff, wurde eine Trennwand aus Maschendraht zwischen die beiden Tiere eingebracht, so dass die Tiere sich zwar noch riechen und sehen, aber nicht mehr direkt angreifen und verletzen konnten. Nach 15 Minuten wurde die Prozedur beendet, und je nach Versuchsansatz wurde das Tier entweder direkt dekapitiert oder für weitere Schlafuntersuchungen zurück in seinen Heimkäfig gebracht.

2.2.4 Neue Umgebung (novel environment)

Bei diesem sehr milden Stressor steht die psychische Komponente (d. h. eine neue ungewohnte Umgebung) im Vordergrund. Hierzu wurde das Tier für 30 Minuten in einen mit neuem Einstreu versehenen Käfig in einen anderen als den Aufenthaltsraum gesetzt. Nach Ablauf von 30 min wurden die Tiere unter Ruhebedingungen sofort getötet.

2.2.5 Predatorexposition (rat exposure)

Für diese Stressprozedur wurden die Mäuse in durchsichtigen Plexigalkäfigen gehalten, bei denen durch eine durchsichtige, mit Löchern versehene Trennwand ein kleineres Kompartiment abgetrennt war. In dieses abgetrennte Kompartiment wurde am Experimentiertag eine Ratte für 30 min eingebracht (s. Abb. 6). Ratten sind die natürlichen Predatoren von Mäusen. Aus diesem Grund reagieren die Mäuse auf deren Anwesenheit mit Stress, Angst und Vermeidungsverhalten. Es war so, dass die Mäuse die Ratte sehen und riechen konnten, aber ein direkter Kontakt durch die Trennwand verhindert wurde. Die Mäuse wurden 24 h nach der Stressprozedur dekapitiert.



Abb. 6 Predatorexposition. Die Maus wurde in dem größeren Kompartiment gehäust (Heimkäfig). Für die Predatorexposition wurde eine Wistar Ratte in das kleinere Kompartiment für 30 Minuten eingebracht. Die Tiere hatten die Möglichkeit sich zu sehen und durch eingestanzte Löcher in der Trennwand zu riechen, aber es war kein direkter Körperkontakt möglich.

2.2.6 Modified hole board (mHb)

Das mHb stellt eine Kombination aus *open field* und *hole board* dar. Das *open field* ist ein validierter Verhaltenstest, der die Lokomotion von Nagetieren untersucht (Kelley, 1993). Das *hole board* wurde ursprünglich entwickelt, um exploratives Verhalten bei Nagern zu erforschen (File & Wardill, 1975). Eine modifizierte Variante des *hole boards* wurde dazu benutzt, kognitive Eigenschaften von Tupaia zu analysieren (Ohl et al., 1998; Ohl & Fuchs, 1999) und wurde dann als komplexer ethologischer Test für Nagetiere etabliert (Ohl et al., 2001a, b).

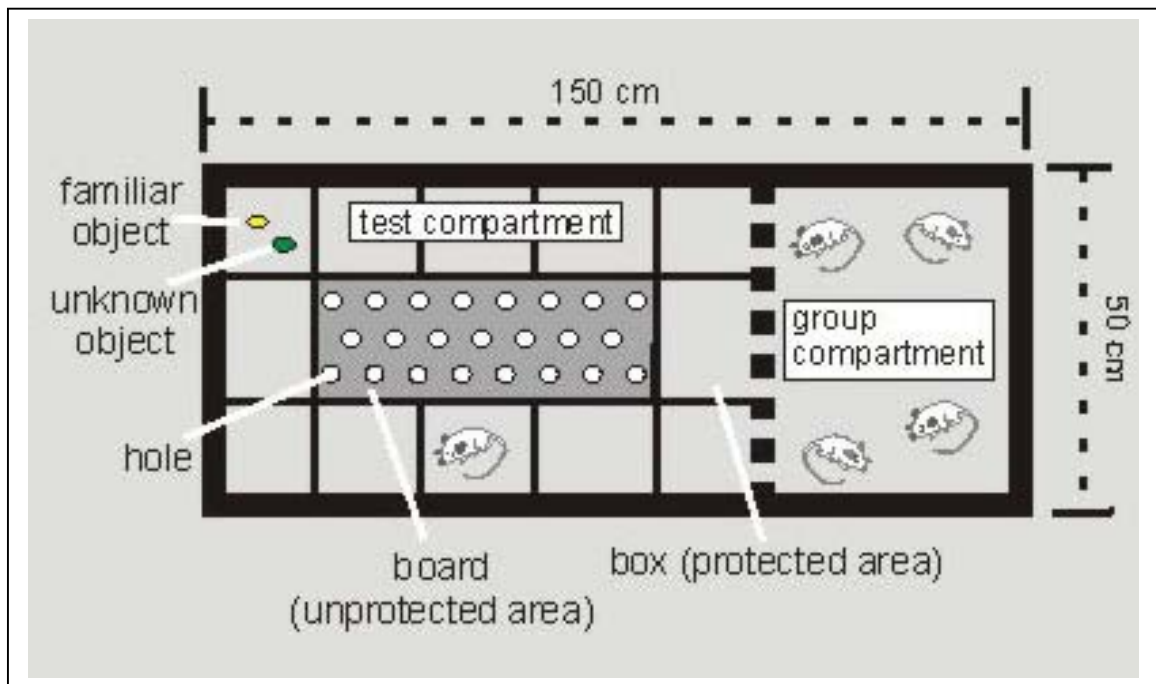


Abb. 7 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des *modified hole board*. Die Maus wurde in die rechte untere Ecke der Box gesetzt (*protected area*) und ihr Verhalten beobachtet. Die Löcher des Boards waren unbelegt und das Gruppenkompartiment war unbesetzt. Als bekanntes Objekt (*familiar object*) erhielten die Tiere ein bekanntes Futter, und als unbekanntes Objekt (*unknown object*) ein ihnen unbekanntes Futter (Abb. F. Ohl persönlich).

Das *hole board* besteht aus grauem PVC (60 x 20 x 2 cm) mit 23 eingestanzten Löchern (1.5 x 0.5 cm) in drei Reihen, die jeweils versetzt angeordnet sind (Abb. 7). Jedes Loch ist mit einem Deckel verschlossen, der sich leicht zur Seite wegrehen lässt und aus dem gleichen Material wie das Board besteht. Das Board befindet sich in der Mitte einer PVC-Box (150 x 50 x 50 cm), deren Boden durch graues Klebeband in 12 Quadrate unterteilt ist (15 x 15 cm). Ein Drittel der gesamten Box wird durch eine Trennwand mit Löchern aus durchsichtigem

PVC abgetrennt. Dieser Teil der Box dient als Gruppenkompartiment und ermöglicht den Kontakt zwischen dem Versuchstier und seiner sozialen Gruppe, falls es sich um in Gruppen gehaupte Versuchstiere handelt. In den beiden zum Startpunkt benachbart liegenden Ecken befanden sich nebeneinander, mit einem Abstand von ca. 1 cm, jeweils ein Stück Mandel (bekanntes Futter) und ein Stück FutterPellet (unbekanntes Futter; Precision Pellets FOO21-J; Bioserv, Holton Industries, Frenchtown, USA). Die Versuchsdauer betrug zehn Minuten. Das Gruppenkompartiment wurde bei dieser Versuchsreihe nicht belegt, da die Tiere einzeln gehalten wurden.

Während eines Versuchsdurchlaufs wurden, der Kategorisierung von Ohl et al. (2001a) entsprechend, folgende Parameter gemessen und bestimmten Verhaltensdimensionen zugeordnet:

angstbezogenes Verhalten:

- % der Zeit, welche das Tier mit mindestens zwei Beinen auf dem Board verbrachte (% Zeit auf dem Board)
- Latenz bis zum ersten Betreten des Boards (Latenz Board)
- Anzahl der Eintritte auf das Board (Eintritt Board)
- Latenz bis zum ersten Linienübertritt (Latenz Linienübertritt)

Lokomotion:

- Linienübertritte (*line crossings*)

Risikoabschätzungsverhalten:

- Häufigkeit der durchgestreckten Körperhaltung (*stretched attends*)

gerichtete Exploration:

- Anzahl der explorierten Löcher

ungerichtete Exploration:

- Häufigkeit des Aufstellens auf beide Hinterbeine in der Box (*rearings box*)

Exploration eines bekannten und unbekanntes Stimulus (Futter):

- Latenz bis zur Exploration des unbekanntes Stimulus (Latenz unbekannt)
- Latenz bis zur Exploration des bekannten Stimulus (Latenz bekannt)

physiologische Erregung:

- Anzahl der Kotbällchen (Boli)
- Latenz bis zum ersten Putzen (Latenz *grooming*)

2.2.7 Elevated plus-maze

Die *plus-maze* ist ein unkonditionierter Angsttest für Nagetiere und basiert auf dem Erzeugen einer Konfliktsituation zwischen einer instinktiven Scheu vor offenen und erhöhten Flächen und dem angeborenen Trieb, eine neue Umgebung zu explorieren (Handley & Mithani, 1984; zur Übersicht Hogg, 1996). Die Testapparatur besteht aus einer kreuzförmigen Plattform aus grauem Kunststoff, die sich in 70 cm Höhe über dem Boden befindet (s. Abb. 8). Die Arme sind jeweils 50 cm lang und 10 cm breit und durch ein 10 x 10 cm großes Mittelstück (neutrale Zone) verbunden. Zwei gegenüberliegende Arme sind durch 25 cm hohe durchsichtige Seitenwände begrenzt (geschlossen), die beiden anderen weisen keine seitliche Begrenzung auf (offen). Zu Beginn des 5minütigen Testes wurde die Maus mit Blickrichtung auf einen geschlossenen Arm in die neutrale Zone gesetzt.

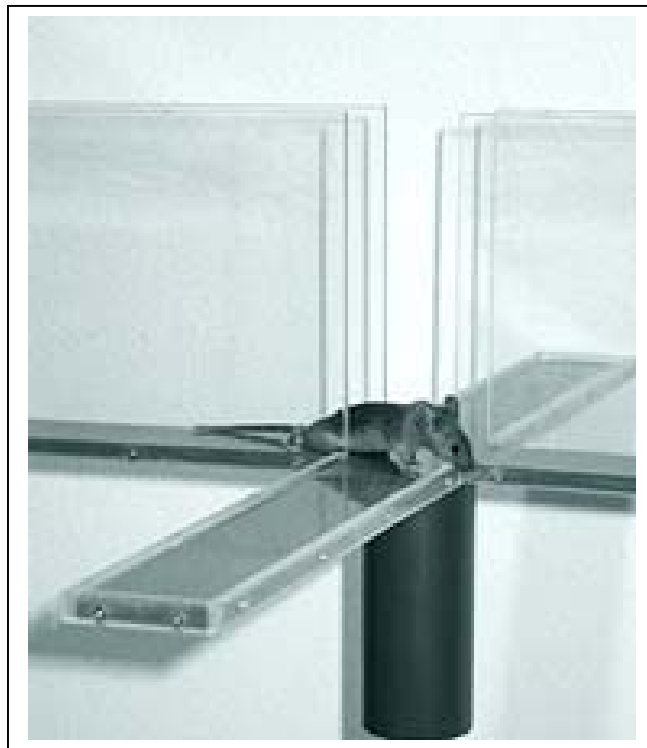


Abb. 8 Versuchsaufbau der *elevated plus-maze*. Die kreuzförmige erhöhte Versuchsanordnung besteht aus zwei geschlossenen Armen mit durchsichtigen Seitenwänden und zwei offenen Armen ohne Wände, die über eine Plattform miteinander verbunden sind. Die Arme bestehen aus grauem Kunststoff (Abb. F. Ohl persönlich).

Die ermittelten Verhaltensparameter waren:

angstbezogenes Verhalten:

- Anzahl der Eintritte in einen offenen Arm (Frequenz offener Arm)
- Anzahl der Eintritte in einen geschlossenen Arm (Frequenz geschlossener Arm)
- Latenz bis zum ersten Eintritt in einen offenen Arm (Latenz offener Arm)
- % Aufenthaltsdauer in einem offenen Arm (% offener Arm)
- % Aufenthaltsdauer in einem geschlossenen Arm (% geschlossener Arm)

Risikoabschätzungsverhalten:

- Häufigkeit der durchgestreckten Körperhaltung (*stretched attends*)

Exploration:

- Häufigkeit des Aufstellens auf beide Hinterbeine (*rearings*)

Neugier:

- Häufigkeit, die das Tier über den Rand der Abgrenzung schaut (*headdips*)

physiologische Erregung:

- Anzahl der Kotbällchen (Boli)
- Häufigkeit Putzen (Anzahl *grooming*)

2.2.8 Dark/light box

Dieser Test wurde etabliert zur Messung von angstbezogenem Verhalten (Crawley & Goodwin, 1980; zur Übersicht Hascoet et al., 2001). Die Testapparatur ist aus schwarzem und weißem Kunststoff gebaut und besteht aus einem kleineren dunklen Kompartiment (15 x 20 x 25 cm), einem größeren hellen Kompartiment (30 x 20 x 25 cm) und einem schmalen dunklen Tunnel (4 x 7 x 10 cm), der das dunkle und das helle Kompartiment miteinander verbindet (s. Abb. 9). Um den Gegensatz der beiden Kompartimente zu verstärken, wurde das helle Kompartiment mittels einer Kaltlichtquelle gleichmäßig und sehr hell ausgeleuchtet (Lichtstärke 680-700 Lux), während in dem dunklen Kompartiment die Lichtstärke nur 2-3 Lux betrug. Der Verbindungstunnel wurde in Richtung des hellen Kompartiments zur Hälfte mit ausgeleuchtet (ca. 50 Lux). Dunkles und helles Kompartiment sind nach oben hin offen; die Abgrenzung des Tunnels nach oben besteht aus durchsichtigem Kunststoff, um die Beobachtung des Verhaltens des Tieres zu ermöglichen (modifiziert nach Costall et al., 1989). Die Testbox befindet sich in einem separierten Bereich des Raumes.

Das jeweilige Versuchstier wurde mit dem Kopf in Richtung Tunnel in das dunkle Kompartiment gesetzt. Während der folgenden 5 Minuten konnte die Maus das Versuchsareal frei explorieren.

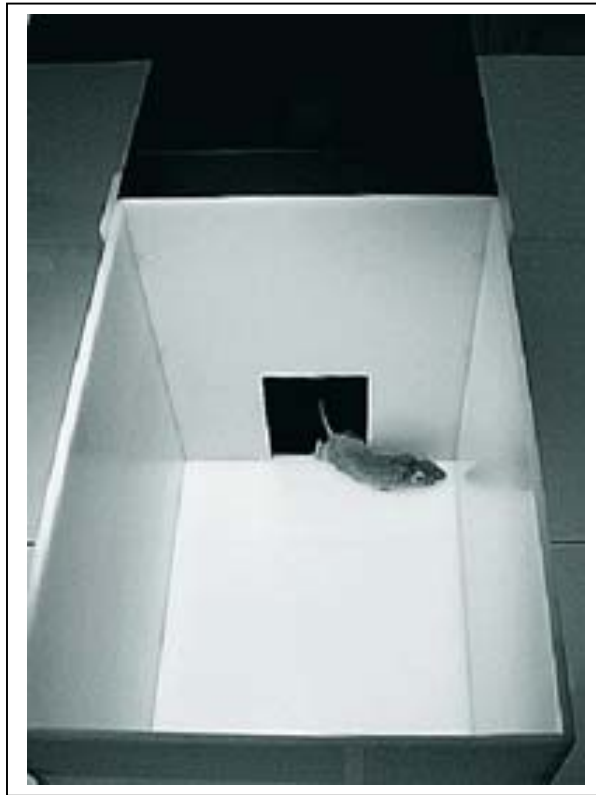


Abb. 9 Versuchsaufbau der *dark/light box*. Die nach oben offene Testbox besteht aus einem kleineren schwarzen Kompartiment und einem größeren helleren Kompartiment, die durch einen schmalen dunklen Tunnel miteinander verbunden sind. Die Box besteht aus farbigem Kunststoff (Abb. F. Ohl persönlich).

Es wurden folgende Parameter gemessen:

angstbezogenes Verhalten:

- Anzahl der Eintritte in das dunkle Kompartiment (Anzahl Eintritte dunkle Box)
- Anzahl der Eintritte in das helle Kompartiment (Anzahl Eintritte helle Box)
- Latenz bis zum ersten Eintritt in den Tunnel (Latenz Tunnel)
- Latenz bis zum ersten Eintritt in das helle Kompartiment (Latenz helle Box)
- Latenz bis zum ersten Besuch des Endes des hellen Kompartiments (Endexploration helle Box)
- % Aufenthaltsdauer im hellen Kompartiment (% helle Box)
- % Aufenthaltsdauer im dunklen Kompartiment (% dunkle Box)

Exploration:

- Häufigkeit des Aufstellens auf beide Hinterbeine (*rearings*)

physiologische Erregung:

- Anzahl der Kotbällchen (Boli)

Als Eintritt in eines der Kompartimente wurde nur gewertet, wenn sich das Tier mit allen vier Pfoten entweder im dunklen oder hellen Teil der Testbox befand.

2.2.9 Open field mit Objekt-Wiedererkennung

Dieser Test wird zur Messung der lokomotorischen und explorativen Aktivität der Tiere herangezogen (Hall, 1934; zur Übersicht Crawley, 1985). Die Testapparatur besteht aus einer runden, nach oben hin offenen Arena aus weißem Kunststoff (s. Abb. 10). Dem Start gegenüberliegend, an der Grenze zwischen Außenbereich und Zentrum, befinden sich zwei in ihrer Struktur unterschiedliche, der Größe der Maus angepasste (nicht angstvermittelnde) Objekte. Das eine war ein bekanntes (metallisches) Objekt, denn es wurde jedem Tier zwei Tage vorher für einen Tag in den Heimkäfig gelegt. Das zweite Objekt bestand aus Gummi und war dem Tier unbekannt. Die lokomotorische Aktivität der Tiere, ihre Explorationsstrategie, ihr Habitationsverhalten und die Exploration der Objekte wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten verfolgt. Die Beleuchtung des *open field* war indirekt und wurde, um ein weniger aversives und somit stressreduziertes Umfeld zu schaffen, während des Versuches relativ niedrig gehalten (127-130 Lux). Auf diese Weise war es möglich ein Explorations- und Lokomotionsverhalten der Versuchstiere unter nahezu Ruhebedingungen (nicht stressinduziert) zu untersuchen. Um das Habitationsverhalten und die unterschiedlichen Strategien der Tiere besser analysieren zu können, wurden die Versuche im *open field* zusätzlich mit einem Computerprogramm von Noldus (Ethovision Color Pro, Wageningen, Niederlande) synchron mitverfolgt und die gelaufenen Strecken aufgezeichnet.

Es wurden folgende Parameter gemessen und bestimmten Verhaltensdimensionen zugeordnet:

Exploration:

- % der Zeit, welche das Tier im Zentrum verbrachte (% Zentrum)
- Anzahl der Eintritte in das Zentrum (Anzahl Eintritte Zentrum)
- Latenz bis zum ersten Betreten des Zentrums (Latenz Zentrum)

- Häufigkeit des Aufstellens auf beide Hinterbeine (*rearings*)
- Zurückgelegte Distanz (Distanz)

Exploration eines bekannten und unbekanntes Stimulus (Objekt):

- % der Zeit, welche das Tier am bekannten Stimulus verbrachte (% bekannt)
- Anzahl der Explorationen des bekannten Stimulus (Anzahl Exploration bekannt)
- Latenz bis zur Exploration des bekannten Stimulus (Latenz bekannt)
- % der Zeit, welche das Tier am unbekanntes Stimulus verbrachte (% unbekannt)
- Anzahl der Explorationen des unbekanntes Stimulus (Anzahl Exploration unbekannt)
- Latenz bis zur Exploration des unbekanntes Stimulus (Latenz unbekannt)

Risikoabschätzungsverhalten:

- Häufigkeit der durchgestreckten Körperhaltung (*stretched attends*)

physiologische Erregung:

- Anzahl der Kotbällchen (Boli)
- % Zeit Putzverhalten (% *grooming*)
- Latenz bis zum ersten Putzen (Latenz *grooming*)

Alle Stress- und Verhaltensexperimente (2.2.1 - 2.2.9) fanden zwischen 8.00 h und 12.00 h statt. Die Verhaltensexperimente wurden von einem trainierten Beobachter observiert, der die Verhaltensparameter mit Hilfe eines Psion Workabouts (Noldus, Wageningen, Niederlande) und der entsprechenden Software (Observer 3.0, Noldus, Wageningen, Niederlande) aufzeichnete. Zusätzlich wurden die Versuche mittels einer Kamera auf Video aufgezeichnet.

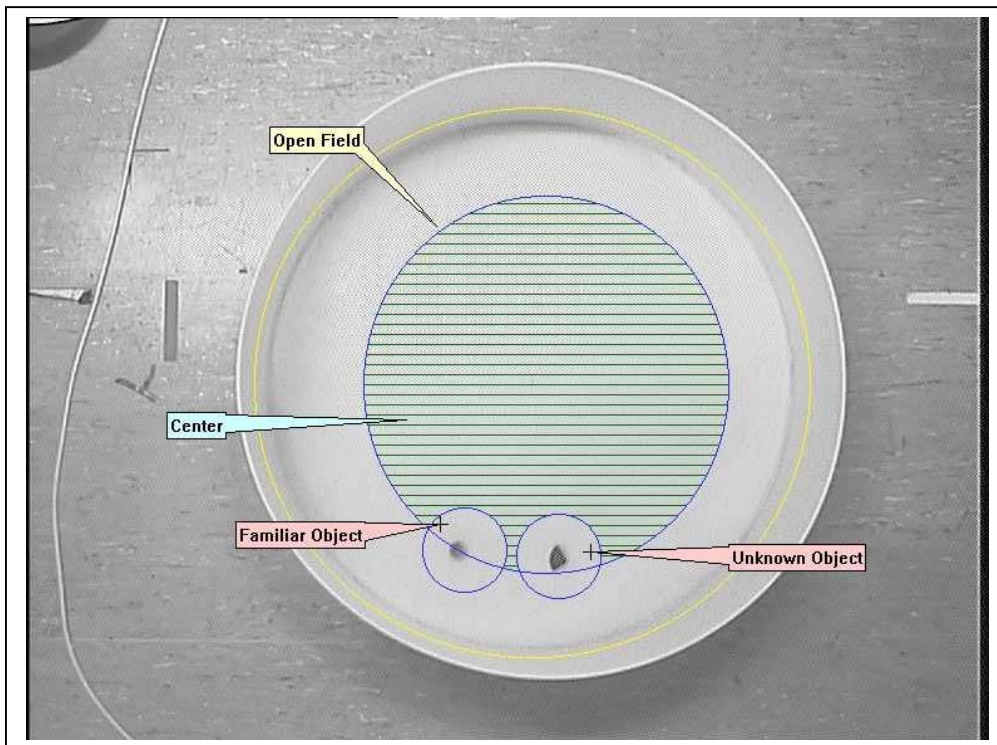


Abb. 10 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der *open field*-Arena. Die aus weißem Kunststoff bestehende runde, nach oben hin offene Arena wurde in Zentrum (*open field*) und Randbereich unterteilt. Der bekannte Stimulus (*familiar object*) bestand aus einem metallischen Objekt, der unbekannte Stimulus (*unknown object*) aus einem Objekt aus Gummi (Abb. F. Ohl persönlich).

2.3 Schlafuntersuchungen

2.3.1 Implantation von EEG- und EMG-Elektroden

Die Tiere wurden unter tiefer Isofluran (Curamed Pharma, Karlsruhe, D.) -Narkose in einen Stereotakten (Typ 51600, TSE Systems, Bad Homburg, D.) eingespannt, und die Kopfoberfläche wurde rasiert und mit 70% Alkohol desinfiziert. Die Kopfhaut wurde median aufgeschnitten und der Schädelknochen wurde freigelegt. Die Schädelhaut wurde entfernt und die Löcher für die Elektroenzephalogramm (EEG)-Elektroden wurden in die Schädeldecke gebohrt (Typ EWL 4970, KaVo Elektronisches Werk GmbH, Leuchtkirch, D.) und alles desinfiziert (Braunol, Melsungen AG, Melsungen, D.). Um die genauen Koordinaten der Elektroden zu bestimmen wurde der stereotaktische Atlas von Paxinos und Franklin (1996) verwendet. Die EEG-Elektroden wurden über dem frontalen Kortex (Koordinaten: 1.5 mm vor dem Bregma, lateral zur Mittellinie +/-1.7 mm) und dem parietalen Kortex

(Koordinaten: 1 mm vor dem Lambda, lateral zur Mittellinie +/-1.7 mm) implantiert. Sie bestanden aus rostfreien Stahlschrauben, die über Golddrähte mit einer Buchse für die Stecker der Ableitkabel verbunden waren. Für die Ableitung des Elektromyogramms (EMG) wurden den Tieren im Nackenmuskel zwei isolierte rostfreie Drähte implantiert. Mit Hilfe von Zahnzement (Paladur, Heraeus GmbH, Wehrheim/Ts, D.) wurde alles fixiert, und die Kopfhaut vernäht (Perma Handseide 5/0, Ethicon GmbH, Norderstedt, D.).

2.3.2 Ableitung und Auswertung von EEG und EMG

Damit die Tiere sich an die Ableitungsbedingungen gewöhnen konnten, wurden die Mäuse mit implantierten Elektroden mindestens vier Tage vor den experimentellen Ableitungen an die Leitungen, die an einem Drehring (Swivel) befestigt waren, angeschlossen. Die Schlafableitungen wurden im Heimkäfig durchgeführt. Die EEG- und EMG-Signale wurden unter Basalbedingungen durchgehend während einer 24 h Periode, und während den ersten 6 h nach einem 15minütigen sozialen Konflikt, abgeleitet und aufgenommen.

Die verwendete Ableitungs- und Aufnahmeeinheit bestand aus einem Verstärker (Eigenbau des Institutes), einem Filter und einem Computer. Das EEG-Signal wurde von einer frontalen und einer kontralateralen parietalen Elektrode abgeleitet, und die verbleibende parietale Elektrode diente zur Erdung des Signals. Die Signale wurden verstärkt und gefiltert. Das Signal wurde mit Hilfe eines *High Pass* Filters bei 0.3 Hz und eines *Low Pass* Filters bei 29 Hz (Dämpfung 49 dB/Oktave; Burr Brown, Dallas, Texas, USA) eingeschränkt. Das EMG-Signal wurde mit einem *High Pass* Filter bei 16 Hz und einem *Low Pass* Filter bei 3000 Hz (Dämpfung 6 dB/Oktave) gefiltert. Sowohl EEG als auch EMG wurden mit einer Rate von 64 Hz abgetastet. Um die EEG-Signale als Rohdaten erfassen und auf dem Bildschirm *online* verfolgen zu können, wurde das Aufzeichnungsprogramm EGErA Aquisition V2.16i (SEA, Köln, D.) verwendet. Das EEG wurde mit Hilfe einer „Fourier Transformation“ auf den für die Auswertung wichtigen Frequenzbereich von 0.5-25 Hz (0.5 Hz Schritte für die Frequenzbänder unter 5 Hz und 1 Hz Bänder für höhere Frequenzen) bei 2 s Messzeiten und einer Mittelwertbildung des Spektrums alle 4 s eingeschränkt. Diese 4 s Epochen wurden mit dem Vigilanzprogramm EGErA Vigilanz 2.2c.PPC (SEA, Köln, Deutschland) analysiert und den Vigilanzstadien

'Wachheit', 'non-REMS', 'pre-REMS' oder 'REM' (*rapid eye movement*)-Schlaf zugeordnet.

Die Muskelaktivität diente hierbei der genaueren Unterscheidung zwischen REMS und Wachzustand, da der typische theta-Rhythmus im REMS-EEG auch im Wach-EEG auftreten kann. Artefakte wurden somit aufgedeckt und aus der Analyse ausgeschlossen.

Für jedes 2 h-Intervall wurde die Zeit, die in jedem Vigilanzstadium verbracht wurde, und für jedes 6 h- oder 12 h-Intervall die Gesamtanzahl und die gemittelte Dauer der non-REMS- (hier sind pre-REMS mit eingeschlossen) und REMS-Episoden ermittelt. Außerdem wurde für jedes 2 h-Intervall nach einem Stress in Form eines sozialen Konfliktes, und für die vergleichbare Basalbedingung die SWA (*slow wave activity*; 0.5 - 40 Hz) während des non-REMS ermittelt.

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 Entnahme und Aufbereitung des Blutes

Die Tiere wurden entsprechend der experimentellen Anordnung (unter absoluter Ruhe bzw. nach Beendigung einer Stressprozedur) und der im Ergebnisteil angegebenen Zeitpunkte in einem Glasbehälter mit Isofluran (Curamed Pharma, Karlsruhe, D) leicht anästhesiert und anschließend dekapitiert. Das Blut eines jeden Tieres wurde in eisgekühlten, mit EDTA (Ethyldiamintetraacetat) beschichteten, Röhrchen (Sarstedt, Nürnberg, D), die mit 5 µl Trasylol (Bayer, Leverkusen, D) versetzt worden waren, aufgefangen und auf Eis gelagert. Anschließend wurde das gewonnene Blut zentrifugiert (20 min, 2500 rpm, 4°C), das Plasma abgenommen und bei -80°C gelagert.

2.4.2 Hormon-Bestimmung im Blutplasma

Der Gehalt an ACTH und Corticosteron im Plasma der Tiere wurde mit kommerziell erhältlichen *Radioimmuno-Assay Kits* (RIA; ICN Biomedicals Costa Mesa, CA) bestimmt.

Der Inter- und Intra-Assay Koeffizient der Varianz lag für ACTH bei 7% und 5%, das Detektionslimit bei 2 pg/ml. Für Corticosteron lagen die Varianzkoeffizienten bei 7% und 4%, mit einem Detektionslimit bei 0.4 ng/ml. Es wurden generell alle zu vergleichenden Gruppen eines Experimentes im selben Ansatz gemessen.

2.4.3 Hirnvorbereitungen zur histologischen Analyse

Alle Gehirne, die für histologische Studien verwendet werden sollten, mussten rasch aus der Kalotte entfernt werden. Hierzu wurden die Tiere kurz mit Isofluran (Curamed, D.) anästhesiert und anschließend dekapitiert. Die Gehirne wurden schnell aus der Kalotte entfernt, in vorgekühltem 2-Methylbutan (-30 - -40°C ; Roth GmbH, Karlsruhe, D.) und auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.4 Gehirn-Kryoschnitte

Für die folgende Analyse der Gehirne mittels Immunhistochemie (s. 2.5.2) wurden die Gehirne auf Höhe verschiedener Regionen (s. 3.3) mit einer Schnittdicke von $20\ \mu\text{m}$ am Kryostaten (Reichert-Jung, 2800 Frigocut E) geschnitten und auf poly-L-Lysin (0.01%; Sigma, Deisenhofen, D.) beschichtete Objektträger (Super Frost, Menzel Gläser, Merck, Ismaning, D.) aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Für Untersuchungen mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung (s. 2.6) wurden die bei einer Temperatur von -18°C in einer Schnittdicke von $12\ \mu\text{m}$ geschnittenen Hirnschnitte verschiedener Regionen auf Objektträger (Super Frost Plus, Menzel, Gläser, Merck, Ismaning, D.) aufgenommen. Um das Gewebe vor osmotischen Verquellungen und Kondenswasser zu schützen, wurden die Objektträger auf einer Wärmeplatte (1 h, 30°C) entdampft und für weitere Verwendungen auf -20°C gelagert.

2.4.5 Nebennieren-Kryoschnitte

Für histologisch/anatomische Untersuchungen der Nebennieren wurden die Organe in Leitungswasser eingebettet und am Kryostaten (Reichert-Jung, 2800 Frigocut E) bei einer Temperatur von -16°C mit einer Schnittdicke von $12\ \mu\text{m}$ geschnitten und der mittlere radiale Teil auf ungekühlte beschichtete Objektträger (Super Frost Plus, Menzel, D.) aufgenommen. Die Objektträger wurden zur weiteren Verarbeitung auf -20°C gelagert.

2.5 Neurogenese

2.5.1 BrdU-Injektion

Die Tiere erhielten eine einzige intraperitoneale 5'Bromo-2-desoxy-Uridin (BrdU; Sigma-Aldrich, D.)-Injektion in einer Dosis von 75 mg/kg Körpergewicht. Die Tiere wurden 24 h später dekapitiert, und wie unter 2.4.3 und 2.4.4 beschrieben verarbeitet.

2.5.2 Immunhistochemie

Auf Objektträger aufgebrachte Gehirnschnitte (s. 2.4.4) wurden für 30 min auf RT gebracht und zunächst für 30 min mit einer 4% Paraformaldehyd (PFA)-Lösung fixiert. Nach 3x 10minütigem Waschen in 1x PBS wurden die Schnitte 30 min mit 0.6% H₂O₂ behandelt, um die endogenen Peroxidasen zu reduzieren. Nach erneutem Waschen mit 1x PBS, wurden die Schnitte für 1 h mit 0.2% Triton X-100 (Sigma, Steinheim, D.) inkubiert, um die Zellpermeabilität zu erhöhen. Nach einem letzten kurzen Waschschrift (2x 5 min in 1x PBS) wurden die Schnitte für mindestens 1 h mit 5% hitze-inaktiviertem Ziegen-Serum (für Ki-67) oder Pferde-Serum (für BrdU, Vector Laboratories, Burlingame, CA) bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert, um die nicht-spezifische Bindung zu minimieren. Anschließend wurde der 1. Antikörper (AK) mit 1.5% Serum/PBS-Lösung verdünnt (Ki-67: Kaninchen polyklonaler AK, Dianova, Verdünnung 1:250; BrdU: Maus monoklonaler AK, BD/Pharmingen, Verdünnung: 1:500) und die Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluss an einen weiteren Waschschrift wurden die Schnitte mit dem 2. Antikörper des entsprechenden Kits (Vector Laboratories, Burlingame, CA) für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) entsprechend der Herstelleranleitung eingesetzt und 1 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Lokalisation des Antigens wurde mit Hilfe eines DAB-Färbekits (Vector Laboratories, Burlingame, CA) sichtbar gemacht. Die DAB-Färbung wurde nach 2-3 min in Leitungswasser gestoppt. Die Schnitte wurden in destilliertem Wasser nochmals gewaschen, anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96% und 100% Ethanol) dehydriert, in Rotihistol (Roth, Karlsruhe, D.) überführt und anschließend in Roti-Histokitt (Roth, Karlsruhe, D.) eingedeckt.

Für die Detektion des injizierten BrdUs war ein DNA-Denaturierungsschritt vor der Inkubation mit dem 1. AK nötig. Dafür wurden die Schnitte für 1 h mit 50% Formamid/ 2x SSC bei 55°C inkubiert, für 30 min mit 2 N HCl bei 37°C angesäuert und mit 0.1 M Na-Borat-Puffer (15 min bei 37°C) neutralisiert. Im Anschluss wurde ein Waschschrift durchgeführt und die Minimierung der nicht-spezifischen Bindung mit 5% Pferde-Serum durchgeführt.

2.5.3 Auswertung der Immunreaktivität von Ki-67

Die Auswertung der im Gyrus dentatus angefärbten Zellen wurde mit Hilfe eines Bildanalyse-Programmes (Optimas 5.2, Optimas Corporation, Media cybernetics, WA; Auflösung: 256 Graustufen) am Computer durchgeführt. Dafür wurden neun Schnitte pro Tier aufgenommen (CCD-Videokamera, XC-77CE, Sony) und die Oberfläche der angefärbten Zellen in der subgranulären Zellschicht mit Hilfe einer densitometrischen Messung bestimmt.

2.6 *In situ* Hybridisierung

Die Technik der *in situ* Hybridisierung erlaubt den Nachweis spezifischer Nukleinsäuren (DNA, RNA) am Gewebeschnitt. Für die hier durchgeführten Untersuchungen auf Ebene der *messenger* RNA (mRNA) gibt es zwei verschiedene *in situ* Hybridisierungs-Methoden. Die eine ist ein Lokalisieren der mRNA mit radioaktiv markierten Oligonukleotid-Proben, die andere, hier ebenfalls verwendete Methode, war die Verwendung von radioaktiv markierten cRNA-Proben.

2.6.1 *In situ* Hybridisierung mit cRNA-Sonden

2.6.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

DNA-Lösungen weisen bei einer Wellenlänge von 260 nm eine spektralphotometrisch nachweisbare Extinktion auf. Eine Extinktion von 1 entspricht einem DNA-Gehalt von 50 µg/ml. Der Quotient der Extinktion gemessen bei 260 nm zu 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) gibt Informationen zu vorhandenen Proteinkontaminationen. Er sollte im optimalen Fall zwischen 1.8 und 2.0 liegen.

2.6.1.2 Transformation von Bakterienzellen

Ein Aliquot Plasmid-DNA wurde mit kompetenten ampicillinresistenten Bakterienzellen (*E.coli* DH5 α) vermischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C (1 min) wurde der Ansatz für 5 min auf Eis gekühlt und mit 900 μ l LB-Medium (1% NaCl, 1% Casein-Hydrolysat, 0.5% Hefe-Extrakt) versetzt. Während einer 20minütigen Inkubationsdauer bei 37°C erholten sich die Bakterien und exprimierten infolge des Hitzeschocks den Plasmid-Resistenzmarker. Die Bakterienzellsuspension wurde auf ampicillinhaltige LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Selektion plasmidhaltiger Bakterien erfolgte über die gewachsenen ampicillinresistenten Kolonien.

2.6.1.3 Präparation von Plasmid-DNA (Qiagen)

Für die Gewinnung von DNA aus den unter 3.6.1.2 beschriebenen Bakterienkulturen, wurden einige der ampicillinresistenten Kolonien gepickt, an LB-Medium angeimpft (Endkonzentration 0.1 mg/ml) und diese über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator (Certomat U, B.Braun Biotech International) kultiviert. Bakterien aus dieser Übernachtkultur wurden durch 15minütige Zentrifugation (6000 rpm, 4°C, Beckman-Zentrifuge) ausgefällt und eine alkalische Lyse durchgeführt. Diese Plasmidpräparation wurde mit dem QIAGEN-Plasmid-Midi-Kit (Qiagen, Hilden, D.) durchgeführt. Das Pellet wurde in 4 ml Puffer P1 resuspendiert und in Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 4 ml Puffer P2 wurde mehrfach vorsichtig durch Invertieren gemischt und für 5 min bei RT stehen gelassen. Es folgte eine Zugabe von eiskaltem Puffer P3, invertieren und eine 15minütige Inkubation auf Eis. Der sich bildende Niederschlag wurde durch 30minütige Zentrifugation (20000 rpm, 4°C, Sorvall Zentrifuge) präzipitiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. Die Anionenaustauschersäule wurde zwischenzeitlich mit Puffer QBT equilibriert und mit dem Überstand beladen. Anschließend wurde die säulengebundene DNA 2x mit 10 ml Puffer QC gewaschen und die DNA in 5 ml Puffer QF eluiert. Die Präzipitation der DNA erfolgte mit 3.5 ml Isopropanol und anschließender 30minütiger Zentrifugation (15000 rpm, 4°C, Sorvall Zentrifuge). Nach Waschen des Pellets mit 70% Ethanol wurde es an der Luft getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen. Die Lagerung von Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C.

Verwendete Puffer:

Puffer P1 (Resuspensionspuffer)

50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A

Puffer P2 (Lysispuffer)

200 mM NaOH, 1% SDS

Puffer P3 (Neutralisationspuffer)

3 M Kaliumacetat (pH 5.5)

Puffer QBT (Equilibrierungspuffer)

750 mM NaCl, 50 mM MOPS (pH 7.0), 15% Isopropanol; 0.15% Triton X-100

Puffer QC (Waschpuffer)

1 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7.0), 15% Isopropanol

Puffer QF (Eluierungspuffer)

1.25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 15% Isopropanol

Puffer TE

10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA

2.6.1.4 Linearisierung von Plasmid-DNA

Um cRNA-Proben herstellen zu können, muss die ringförmige Plasmid-DNA aufgespalten und linearisiert werden, so dass mit Hilfe von Polymerasen die Probe hergestellt werden kann. Diese Restriktionsspaltung wird mit Hilfe spezifischer Restriktionsenzyme durchgeführt. Der analytische Standardansatz enthält 1 µg Plasmid-DNA, 3 U (Einheiten) Restriktionsenzym (Roche Diagnostics, Mannheim, D.), 3 U 10x Restriktionspuffer und steriles H₂O_{dd}. Das Reaktionsgemisch wurde für 2-3 h bei 37°C inkubiert und dann gestoppt. Die Stoppreaktion wurde, abhängig vom Enzym, entweder über eine Denaturierung des Enzyms (15 min bei 65°C), oder einer Phenolextraktion und anschließender DNA-Präzipitation durchgeführt.

Der Erfolg der Restriktionsspaltung wurde durch eine entsprechende gelelektrophoretische Auftrennung überprüft.

2.6.1.5 Phenolextraktion von DNA

Zur Vermeidung von Proteinkontaminationen bei der Ethanolpräzipitation wurde die zu reinigende Probe mit 1 Volumen TE-gesättigtem Phenol/Chloroform (1:1) vermischt, gevortext und kurz zentrifugiert, damit die Phasen getrennt wurden. Mit

der abgenommenen wässrigen Phase wurde eine Chloroformextraktion durchgeführt, um die restlichen Spuren von Phenol zu entfernen.

2.6.1.6 Präzipitation von DNA

Die phenolextrahierte DNA wurde mit 1/10 Vol 3M NaAcetat und 2.5 Vol 100% Ethanol versetzt, gemischt und bei -80°C konzentrationsabhängig für 30-60 min gefällt. Anschließend wurde die Probe für 15 min zentrifugiert (13000 rpm, 4°C), der Überstand abgenommen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4°C). Das an der Luft getrocknete Pellet wurde in sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gelöst und bei -20°C gelagert.

2.6.1.7 Auftrennung von DNA durch Gel-Elektrophorese

Agarose wurde in einer Konzentration von 1% in 1x TAE Puffer (40 mM Tris/Acetat (pH 7.5), 20 mM NaOAc, 1 mM EDTA) suspendiert, und durch Aufkochen gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurde ein wenig Ethidiumbromid-Lösung hinzugefügt, und der Ansatz in die vorbereitete Gel-Apparatur gegossen. Die aufzutrennende Probe wurde vor dem Auftragen mit 1/5 Volumen Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Bestimmung der Größe der Fragmente wurden Standards parallel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in 1x TAE bei 60 V und 300 mA. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf einem UV-Leuchttisch analysiert und photographisch dokumentiert.

2.6.1.8 RNase-freies Arbeiten

Zur Vermeidung einer Kontamination durch körpereigene RNasen wurden bei allen Arbeiten Einmalhandschuhe getragen und von Zeit zu Zeit erneuert. Alle verwendeten Glas- und Plastikwaren wurden, wenn möglich, autoklaviert oder bei 220°C für 4 h hitzesterilisiert. Alle verwendeten Lösungen wurden, wenn möglich, mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem H_2O angesetzt. Hierzu wurde DEPC 1:1000 in aqua dest verdünnt, gut durchmischt, über Nacht inkubiert und anschließend autoklaviert, um das DEPC zu zerstören.

2.6.1.9 Herstellung radioaktiv markierter cRNA-Sonde

Bei RT wurden 3 µl 10x Transkriptionspuffer, 3 µl NTP-Mix (bestehend aus gleichen Teilen ATP, CTP und GTP; Roche Diagnostics, Mannheim, D.), 1 µl 0.5 M DTT, 1 µl RNasin (RNase-Inhibitor; Roche Diagnostics, Mannheim, D.), 1 µl linearisierte Plasmid-DNA, 12 µl α -[³⁵S]-UTP (12.5 mCi/mmol, Hartmann Analytics, Braunschweig, D.) und 1 µl RNA-Polymerase (20 U/µl; Roche Diagnostics, Mannheim, D.) gemischt und für insgesamt 3 h bei 37°C inkubiert. Es wurde nach 1 h erneut 0.5 µl RNA-Polymerase hinzugefügt. Um die DNA-Vorlage zu zerstören wurden 2 µl RNase-freie DNase (Roche Diagnostics, Mannheim, D.) dem Inkubationsgemisch zugefügt und für 8 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die so erhaltene cRNA-Sonde aufgereinigt und extrahiert.

2.6.1.10 Aufreinigung mit RNeasy Mini Kit (Qiagen)

Die zu reinigende Sonde wurde mit RNase-freiem Wasser auf ein entsprechendes Volumen aufgefüllt und mit RLT-Puffer und reinem Alkohol vermischt. Das Lysat wurde in ein *RNeasy mini spin column* (Qiagen, Hilden, D.) überführt und für 15 s bei 13000 rpm zentrifugiert. Nun wurde die Membran 2x mit RPE-Puffer gewaschen und bei 13000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde die gereinigte cRNA von der Membran mit RNase-freiem Wasser eluiert und die Radioaktivität im Eluat mit Hilfe der Liquid-Scintillation (Zinsser Analytics, Frankfurt, D.) im Gamma-Counter (Beckman LS 6000 IC) bestimmt.

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer RLT und RPE ist von Qiagen nicht angegeben worden.

2.6.1.11 Vorbereitung der Schnitte

Die bei -20°C gelagerten Hirnschnitte wurden für mindestens 30 min auf RT gebracht. Dann wurden sie für 10 min in eiskaltem 4% PFA/PBS fixiert, in PBS gewaschen und für 10 min in 0.1 M Triethanolamin-HCl inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in 2x SSC gewaschen, in einer Ethanol/Chloroform/Ethanol-Reihe (60%, 75%, 95%, 100%, Chloroform, 100%, 95%) dehydriert und staubfrei luftgetrocknet.

2.6.1.12 Hybridisierung

Die radioaktiv markierte cRNA-Sonde wurde in Hybridisierungs-Mix (Zusammensetzung s. 2.6.4) auf eine Konzentration von etwa 50000 cpm/ μ l verdünnt. Dieses Gemisch wurde für 3 min auf 90°C erhitzt, um eine Denaturierung der enthaltenen Strukturen und somit eine Verbindung mit der Sonde zu ermöglichen. Nach einer Abschreckung auf Eis wurde die Probe zu je 100 μ l auf die Objektträger aufgetragen. Deckgläschen wurden zur besseren Inkubation der Probe auf die Objektträger blasenfrei aufgebracht. Anschließend wurden die Objektträger in eigens dafür hergestellte feuchte Inkubationskammern gelegt, die eine deionisierte Formamid-haltige Hybridisierungs-Kammerflüssigkeit (erhöht u. a. die Stringenz (Spezifität) bei niedrigeren Temperaturen) enthielt, gelegt, und für bis zu 20 h im Hybridisierungssofen (Bachofer, Reutlingen, D.) inkubiert.

Die Hybridisierungstemperatur (T_h) ist abhängig von den verschiedenen Eigenschaften der jeweiligen cRNA-Probe, und lässt sich wie folgt berechnen:

$$T_h = T_m - 25^\circ\text{C} \text{ (nach Britten \& Kohne, 1968)}$$

T_m ist die Schmelztemperatur des Doppelstrangs, die sich wie folgt berechnet:

$$T_m = 81.5^\circ\text{C} + 0.41 * (\%GC) + 16.6 \log [\text{Na}^+] - 500/n - 0.61 * (\% \text{Formamid})$$

(nach Meinkoth & Wahl, 1984)

Die Ausbildung von DNA-Doppelsträngen aus zwei komplementären Einzelsträngen ist ein reversibler Prozess, der von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird. Diese sind der prozentuale Gehalt der Basen Guanin und Cytosin (% G/C), die Länge des DNA-Doppelstranges (n), die Konzentration monovalenter Kationen (zum Beispiel $[\text{Na}^+]$) und der Gehalt an Doppelstrang-destabilisierenden Agenzien (hier % Formamid). Die Stringenz der Probe lässt sich durch etwas höhere Temperaturen verbessern.

2.6.1.13 Waschprozedur

Die Deckgläschen wurden nach bis zu 20 h Inkubation entfernt und die Schnitte mehrfach (4x 15 Minuten) in 4x SSC (siehe 2.6.4) gewaschen und anschließend für 20 min in 37°C warmem 1x NTE Puffer (siehe 2.6.4), der 20 μ g/ml RNase A enthielt, inkubiert. Dann folgte eine SSC/1 mM DTT-Reihe (2x, 1x, 0.5x für jeweils 10 min) und 2x 30 min in 0.1x SSC/1 mM DTT bei einer Temperatur, die 5-10°C über der

Hybridisierungstemperatur liegen sollte. DTT ist bei [³⁵S]-Proben von großer Bedeutung, da es die Disulfidbrückenbildung verhindert. Anschließend wurde für 10 min in 0.1x SSC gewaschen und die Schnitte in einer Ethanol/NH₄OAc (30%, 50%, 70%)/Ethanol (95%, 100%)-Reihe dehydriert und staubfrei getrocknet.

2.6.1.14 cDNA-Plasmide

Die folgenden Plasmide, die spezifische Inserts enthielten, wurden für die *in situ* Hybridisierung verwendet. Die Antisense (AS)-Sonde bindet an die ihr komplementäre mRNA-Sequenz. Die Sense (S)-Sonde hingegen sollte nicht binden, da sie der mRNA-Sequenz entspricht (kein Signal sichtbar). Sie dient als Negativkontrolle, da sie vergleichbare physikochemische Eigenschaften wie die zu markierende mRNA aufweist.

Sonde	Vektor-plasmid	Insert (bp)	RNA-Polymerase (AS/S)	Restriktionsenzyme (AS/S)
CRH	pCR [®] II-TOPO [®]	356	SP6/T7	Xba I/BamH I
UCN I	pCR [®] II-TOPO [®]	530	T7/SP6	Hind III/Xho I
UCN II	pCR [®] II-TOPO [®]	608	T7/SP6	BamH I/Xho I
UCN III	pCR [®] II-TOPO [®]	603	T7/SP6	BamH I/Xho I
CRH-R1	pBluescript [®] SK+/-	2273	T7/T3	BamH I/Xho I
CRH-R2β	pBluescript [®] SK+/-	1000	T3/T7	Hind III/Xba I

bp = Basenpaare, AS = Antisense, S = Sense

Die cDNA-Plasmide von CRH, UCN I und CRH-R1 wurden freundlicherweise von Wolfgang Wurst (MPI für Psychiatrie, München, D.), UCN II von Paul Sawchenko (Salk Institute for Biological Studies, San Diego, USA) und UCN III und CRH-R2β (enthält codierender Sequenzteil, der homolog zu CRH-R2α ist) von Wylie Vale (Salk Institute for Biological Studies, San Diego, USA), zur Verfügung gestellt.

2.6.2 *In situ* Hybridisierung mit synthetisch hergestellten Oligonukleotid-Proben

Die mit dem Kryostaten hergestellten 12 µm dicken Hirn- oder Nebennierenschnitte wurden mittels einer Ethanol/Chloroform/Ethanol-Reihe dehydriert und staubfrei luftgetrocknet. Für die Hybridisierung wurden hochspezifische 48-Basenpaar große Oligonukleotide (MWG, Sulzbach, D) verwendet. Die Sequenzen sind unter 2.6.2.1 zu entnehmen.

Die Oligonukleotide wurden am 3' Ende mittels Terminaler-Deoxyribonucleotidyl-Transferase (Roche Diagnostics, Mannheim, D.) mit [³⁵S]-dATP (NEN Du Pont, Dreieich, D.) radioaktiv markiert und mittels t-RNA (Sigma, D.) und Ethanol-Präzipitation aufgereinigt (s. 2.6.1.6), in sterilem Wasser gelöst und die Radioaktivität im Eluat mit Hilfe der Liquid-Scintillation (Zinsser Analytics, Frankfurt, D.) im Gamma-Counter (Beckman LS 6000 IC) bestimmt.

Die markierte Probe wurde dann in 45°C warmem Hybridisierungs-Cocktail (s. 2.6.4) auf eine Konzentration von etwa 80000 cpm/µl verdünnt, und pro Objektträger wurden 250 µl aufgebracht und mit Deckgläschen versehen. Die Objektträger wurden in eine feuchte Kammer, die deionisierte Formamid-haltige Hybridisierungs-Kammerflüssigkeit (s. 2.6.4) enthielt, bis zu 20 h bei 45°C im Hybridisierungs-ofen (Bachofer, Reutlingen, D.) inkubiert. Nach Entfernen der Deckgläschen wurden die Objektträger 4x für 15 min mit 1x SSC bei 55°C und 1x 30 min mit 1x SSC bei RT gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger für 10 s in aqua bidest getaucht und mit 65% und 95% ETOH dehydriert. Danach wurden sie für weitere Verwendungen staubfrei getrocknet.

2.6.2.1 Oligoproben

Die für diese Art der *in situ* Hybridisierung verwendeten Proben wurden aufgrund von klonierten Gensequenzen, die in der Literatur zu finden waren, mit Hilfe der *EMBL WU-blastn* Suchmaschine (<http://www.ebi.ac.uk/blast2/>) angefertigt. Dabei war es wichtig ein ausgewogenes G/C-Verhältnis zu beachten.

AVP mRNA: 5'- GCT CAG GAA ACA AGC GGA GAG CGT AGT GTT TAG CAT CCT GGC GAG CAT -3' (nach Hara et al., 1990; gegen die Nukleotide 1493-1540 der Maus AVP-Gensequenz)

OXT mRNA: 5'- CAA GCA GGC AGC AAG CGA GAC TGG GGC AGG CCA TGG CGA TGG TGC TCA -3'(nach Hara et al., 1990; gegen die Nukleotide 1072-1119 der Maus Oxytozin-Gensequenz)

TH mRNA: 5'- TCA ATG GCC AGG GTG TAC GGG TCA AAC TTC ACA GAG AAT GGG CGC TGG – 3' (nach Shores et al., 1999, gegen die Nukleotide 1351-1398 der Ratten TH mRNA-Sequenz)

2.6.3 Autoradiographie

Die Objektträger wurden nach staubfreiem Trocknen in eine Filmkassette gelegt und ein Autoradiographiefilm (Kodak Biomax MR-1, Kodak, D.) in der Dunkelkammer aufgelegt. Nach einer, je von Probe und Region abhängigen Zeitspanne (1-7 d), wurde der Autoradiographiefilm mit einer Entwicklermaschine (3M XP2000, Mailand, Italien) entwickelt.

2.6.4 Verwendete Puffer und Lösungen

NTP-Mix

für 200 µl: 20 µl 100 mM ATP, 20 µl 100 mM CTP, 20 µl 100 mM GTP, 140 µl H₂O_{dd}/DEPC

4% PFA/PBS

für 2 l: 80 g Paraformaldehyd mit 1x PBS ad 2 l, pH 7.4, DEPC-Behandlung, autoklavieren

10x PBS/DEPC

für 2 l: 160 g NaCl, 4 g KCl, 28.2 g Na₂HPO₄, 4.8 g KH₂PO₄, mit H₂O_{dd} auf 2 l, DEPC-Behandlung, autoklavieren

10x TEA (MW 185.7)

für 1 l: 185.7 g Triethanolamin-HCl mit H₂O_{dd}/DEPC 1 l, keine DEPC-Behandlung

20x SSC/DEPC

für 2 l: 350.6 g NaCl, 88.2 g Na-Citrat-2H₂O mit H₂O_{dd} auffüllen, DEPC-Behandlung, autoklavieren

5x NTE

für 1l: 146.1 g NaCl, 50 ml 1 M Tris-HCl pH 8.0, 50 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0, mit H₂O_{dd} ansetzen, DEPC-Behandlung, autoklavieren

5 M DTT (MW 154.3)

für 10 ml: 7.72 g DL-Dithiothreitol mit H₂O_{dd}/DEPC 10 ml

3 M NH₄OAc (MW 77.1)

für 250 ml: 57.81 g NH₄OAc mit H₂O_{dd} 250 ml, DEPC-Behandlung, autoklavieren

1 M Tris-HCl pH 8.0 (MW 157.6)

für 250 ml: 39.4 g Tris-HCl mit H₂O_{dd} 250 ml, DEPC-Behandlung, autoklavieren

0.5 M EDTA pH 8.0 (MW 372.2)

für 250 ml: 186.1 g Na₂EDTA-2H₂O in H₂O_{dd}, DEPC-Behandlung, autoklavieren

30% EtOH/300 mM NH₄OAc

für 500 ml: 150 ml EtOH, 50 ml 3M NH₄OAc, 300 ml H₂O

50% EtOH/300 mM NH₄OAc

für 500 ml: 250ml EtOH, 50 ml 3 M NH₄OAc, 200 ml H₂O

70% EtOH/300 mM NH₄OAc

für 500 ml: 350 ml EtOH, 50 ml 3M NH₄OAc, 100 ml H₂O

RNase A

für 20 ml: 200 mg RNase A in H₂O_{dd}

50% Dextransulfat

für 50 ml: 25 g Dextransulfat unter Erhitzen in H₂O_{dd}/DEPC lösen

20% Sarcosyl (N-Laurocylsarcosin)

für 100 ml: 20 g in H₂O_{dd} lösen auf 100 ml auffüllen

0.2 M Natriumphosphatpuffer

35.6 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O

27.6 g NaHPO₄ x 12 H₂O

mit 1000 ml H₂O_{dd} lösen, pH 7

Hybridisierungs-Kammerflüssigkeit

für 225 ml: 100 ml Formamid, 20 ml 20x SSC, 105 ml H₂O_{dd}

Hybridisierungs-Mix (cRNA-Proben)

für 30 ml:

50% deionisiertes Formamid

20 mM Tris-HCl (pH 8.0)

300 mM NaCl

5 mM EDTA (pH 8.0)

10% Dextransulfat
0.02% Ficoll 400
0.02% Polyvinyl-Pyrolidon
0.02% BSA
0.5 mg/ml tRNA (phenolextrahiert)
0.2 mg/ml Heringssperma DNA (säurefragmentiert)
200 mM DTT

Hybridisierungs-Cocktail (Oligonukleotid-Proben)

100 ml deionisiertes Formamid
40 ml 20x SSC
2 ml Dehnhardt's solution
10 ml 20% Sarcosyl
20 g Dextransulfat
20 ml 0.2 M Na-phosphatpuffer
in einem mit Alufolie ummanteltem Becherglas bei 50°C für 1 h rühren

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht extra angegeben, von Sigma (Taufkirchen, D.), Roth (Karlsruhe, D.) oder Merck (Darmstadt, D.) bezogen.

2.6.5 Auswertung der Autoradiographie

Repräsentative autoradiographische digitale Aufnahmen wurden von den jeweiligen Regionen des Interesses mit einer CCD-Videokamera (XC-77CE, Sony) gemacht. Zur semi-quantitativen Auswertung der mRNA-Expression wurden die Bilder mit Hilfe des Optimas Computerprogramms (Optimas 5.2, Optimas Corporation, Media cybernetics, WA; Auflösung: 256 Graustufen) ausgewertet. Die Region von Interesse (erkennbar durch die Graufärbungen auf dem Film, da die Proben spezifisch gebunden haben) wurde umfahren und der mittlere Grauwert bestimmt. Es wurde ebenfalls ein Hintergrund gemessen (in dem kein Signal vorhanden war), und dieser Wert wurde vom mittleren Grauwert abgezogen. Generell wurden mindestens drei repräsentative Schnitte pro Tier ausgewertet. Die Daten sind als mittlerer Nettograuwert (Mittelwert \pm SEM von 6-10 Tieren pro Gruppe) dargestellt.

2.7 Färbemethoden

2.7.1 Kresylviolett-Färbung

Bei dieser, auch Nissl-Färbung genannten Methode werden Zellkerne und Nissl-Substanz violett, Nervenzellen ganz schwach blau und der Rest farblos angefärbt. Die Lösung besteht aus aqua dest, 10% Essigsäure, 1 M Natriumacetat und Kresylviolett-Acetate. Der Ansatz wurde für 1 h bei 50°C gerührt und anschließend die nicht gelösten Kresylviolettflocken abfiltriert. Die zu färbenden Schnitte wurden für 30 min in 70% EtOH, für 5 min in 96% EtOH, für 5 min in 70% EtOH und für 5 min in H₂O_{dd} vorbehandelt. Anschließend wurden die Schnitte in Kresylviolett für etwa 5 min (abhängig von der Intensität der Färbung) inkubiert, 3x in H₂O_{dd} gespült und dann in einer Ethanol-Reihe (70%, 96%, 100% (je 2x)) für je eine Minute ausdifferenziert. Anschließend 3x in Rotihistol fixiert und anschließend in Roti-Histokitt eingedeckt.

2.7.2 Hämalaun-Eosin-Färbung

Um histologische Untersuchungen an Nebennierenschnitten durchführen zu können, wurde eine Hämalaun-Eosin-Färbung durchgeführt. Der Farbstoff Hämalaun färbt im alkalischen Milieu basophile Strukturen, wie Zellkerne, intensiv blau. Das Cytoplasma wird anschließend mit einer Eosin-haltigen Lösung rot gegengefärbt.

Die Schnitte wurden auf RT gebracht und mit Carnoy (van Gehuchten's Gemisch), einem 3:2 Gemisch aus 96% Ethanol und Eisessig für 1 h fixiert, und in 96% Ethanol gewaschen. Der Eisessig sollte das Schrumpfen der Schnitte verhindern. Dann wurden die Nebennierenschnitte in destilliertem Wasser entwässert und für 10 min in einer sauren Hämalaun-Lösung bestehend aus Hämatoxilin, Natriumiodat, Kalialaun (Aluminium-Kalium-Dodecahydrat), Chloralhydrat und Zitronensäure stark angefärbt. Anschließend wurden die Schnitte für 15 min unter fließendem Leitungswasser gebläut, für 6 min in einer 0.1% wässrigen Eosin-Y-Lösung gegengefärbt, in destilliertem Wasser gewaschen, in einer Ethanol-Reihe entwässert (70%, 96% und 100%), in Rotihistol überführt und anschließend in Roti-Histokitt eingedeckt.

Alle Chemikalien der Färbemethoden wurden von Sigma (Taufkirchen, D.), Roth (Karlsruhe, D.) oder Merck (Darmstadt, D.) bezogen.

2.8 Rezeptor-Messung mittels ^3H -Steroid-Bindungs-Assay

2.8.1 Adrenalektomie (ADX)

Um Rezeptor-Messungen mittels des ^3H -Steroid-Bindungs-Assays durchführen zu können, müssen von endogenem Corticosteron freie Tiere verwendet werden. Aus diesem Grund wurden die Versuchstiere adrenalektomiert. Hierzu wurde auf der Höhe der Nebenniere beidseitig ein kleiner Schnitt gesetzt, über welchen der Zugang zur Nebenniere ermöglicht wurde. Sie wurden aus dem Fettgewebe entnommen, und anschließend die Wunden mit steriler Nähseide (Perma-Handseide, Ethicon, D.) verschlossen und zugeklammert. Nach der Adrenalektomie bekamen alle Tiere 0.9% Saline-Lösung zu trinken, da das für den Wasserhaushalt notwendige Aldosteron nicht mehr endogen ausgeschüttet werden konnte.

Um als Kontrolle zu überprüfen, ob die Nebennieren mitsamt ihren ins Fettgewebe ausstrahlenden Satellitzellen entnommen worden waren, wurde in ebenfalls entnommenem Blut eine Corticosteron-Bestimmung mittels der *Radioimmuno-Assay*-Methode (s. 2.4.2) durchgeführt. Hierbei durfte nicht mehr als 2.5 ng/ml Corticosteron nachweisbar sein, da dies sonst zu fehlerhaften Rezeptor-Bindungsparametern führte, wie unter 3.1.5 (Fig. 26) dargestellt.

2.8.2 Hirndissektion

Zur Bestimmung von Rezeptoren mittels des Bindungs-Assays müssen die entsprechenden Hirnareale schnellst möglich voneinander getrennt werden (nach der Methode von Gispen et al., 1975), um die biochemischen Verhältnisse weitgehend zu konservieren. Die Gehirne der Tiere wurden in verschiedene Areale (Hippokampus, Hypothalamus, frontaler Kortex, Amygdala und Neokortex) dissektiert, die sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt wurden. Es wurde ebenfalls die Hypophyse entnommen, die auch sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C aufbewahrt wurde. Die so gewonnenen verschiedenen Hirnbereiche konnten anschließend zeitlich unabhängig voneinander aufgearbeitet werden.

2.8.3 ³H-Steroid-Bindungs-Assay

Für die Durchführung des ³H-Steroid-Bindungs-Assays mussten die zu untersuchenden Tiere bilateral adrenaletomiert (s. 2.8.1) und einen Tag später dekapitiert und die Gehirne dissektiert (s. 2.8.2) werden. Abhängig von dem zu untersuchenden Gewebe wurden verschiedene Strategien verfolgt, um die Mineralocorticoid-Rezeptor (MR)- und die Glucocorticoid-Rezeptor (GR)-Bindung zu bestimmen. Aufgrund der Größe bzw. Kleinheit des Hypothalamus und der Hypophyse wurden keine Einzelmessungen, wie bei dem Hippokampus, durchgeführt, sondern nur die einzelnen Gruppen "gepoolt". Die Gewebe wurden mit eiskaltem Puffer (pH 7.4; 100 mg Gewebe/ml) homogenisiert (Potter S, Braun). Der Puffer enthielt 5 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5% Glycerin, 10 mM Natrium-Molybdat, 1 mM EDTA und 2 mM β -Mercaptoethanol. Das Homogenat wurde anschließend 1 Stunde bei 2°C mit 13000 rpm zentrifugiert, um das Zytosol (Überstand) zu gewinnen. Aliquots des Zytosols (100 μ l) wurden mit radioaktiv markierten [³H]-Steroiden verschiedener Konzentrationen (0.1-10 nM) oder bei 10 nM (Hippokampus-Einzelkonzentrationsbestimmung) in Doppelbestimmung inkubiert (Gesamtvolumen 150 μ l). Die totale Bindung wurde mit [³H]-Dexamethason (spez. Aktivität: 85 Ci/mmol; Amersham, Braunschweig, D.) oder mit [³H]-Aldosteron (spez. Aktivität: 82.3 Ci/mmol; NEN Du Pont, Dreieich, D.) bestimmt. Um den Mineralocorticoid-Rezeptor zu bestimmen, wurde die totale Bindung gemessen, indem man das Zytosol mit [³H]-Aldosteron und einem 100fachen Überschuss des spezifischen Glucocorticoids RU 28362 (11 β ,17 β -dihydroxy-6-methyl-17 α -(1-propionyl)androsta-1,4,6-triene-3-one) inkubierte. Radioaktiv unmarkiertes RU 28362 wurde eingesetzt, um zu verhindern, dass [³H]-Aldosteron an den Glucocorticoid-Rezeptor bindet. Auf diese Weise konnte ausschließlich die Bindung des [³H]-Liganden am MR bestimmt werden. Die nicht-spezifische Bindung wurde gemessen, indem man das Zytosol mit [³H]-Aldosteron und einem 1000fachen Überschuss an Corticosteron inkubierte. Auf diese Weise konnte die MR-Konzentration direkt bestimmt werden. Die totale Bindung für den GR wurde bestimmt, indem das Zytosol mit [³H]-Dexamethason inkubiert wurde. Da [³H]-Dexamethason aber unter *in vitro*-Bedingungen auch an den MR binden kann (Reul et al., 2000), musste bestimmt werden, wie viel des [³H]-Dexamethasons am MR gebunden hatte. Somit wurde das Zytosol mit [³H]-Dexamethason und einem 100fachen Überschuss an RU 28362 inkubiert. Diese Fraktion wurde von der totalen [³H]-Dexamethason-Bindung abgezogen. Die nicht-spezifische Bindung wurde analysiert, indem die [³H]-Dexamethason-Ligandenlösung

einen 1000fachen Überschuss an Dexamethason enthielt. Die Subtraktion der nicht-spezifischen Bindung von der übrig gebliebenen [^3H]-Dexamethason-Bindung lieferte die spezifische GR-Bindung.

Nach einer Inkubationszeit von 20-24 h bei 0-2°C wurden die gebundenen [^3H]-Steroide von den freien [^3H]-Steroiden mittels Sephadex LH-20 (Pharmacia, Schweden) Gel-Filtration getrennt. Dabei wurden jeweils 100 μl des Inkubationsgemisches auf die LH-20-Säulen aufgetragen, eluiert und anschließend die Radioaktivität im Eluat mit Hilfe Liquid-Scintillation (Zinsser Analytics, Frankfurt, D.) im Gamma-Counter (Beckman LS 6000 IC) bestimmt. Die Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Lowry et al. (1951) mit BSA (Albumin, Bovine) als Standards bestimmt. Die Daten der Bindungs-Assays sind in Femtomol pro Milligramm (fmol/mg) Protein angegeben. Die Maximalbindung (B_{max}) und die relative Bindungsaffinität (K_d) wurden mittels Scatchard-Analyse (Scatchard et al., 1949) ermittelt.

2.8.4 CBG-Bestimmung mittels ^3H -Steroid-Bindungs-Assay

Die Konzentrationen von Corticosteron-Bindungs-Globulin (CBG) wurden mit Hilfe der Bindung an [^3H]-Corticosteron (spez. Aktivität: 70 Ci/mmol; Amersham, Braunschweig, D.) im Plasma bestimmt. Dafür wurde Plasma der Tiere 10fach in Tris-HCl Puffer (s. 2.8.3) verdünnt. Die Bindung von [^3H]-Corticosteron wurde bei einer Konzentration von 40 nM (>95% Sättigung) bestimmt. Die Prozedur der Inkubation, der Separation der gebundenen von der freien Fraktion und die Messung der Radioaktivität wurde wie unter 2.8.3 beschrieben durchgeführt. Die Messung des Proteingehaltes wurde ebenfalls nach der Methode von Lowry et al. (1951) durchgeführt. Für die Kalkulation der totalen Anzahl an CBG-Bindungsstellen musste die spezifische Aktivität des [^3H]-Corticosterons aufgrund des im Plasma enthaltenen endogenen Corticosterons angepasst werden. Der Gehalt an endogenem Corticosteron wurde mit der *Radioimmuno-Assay*-Methode (s. 2.4.2) bestimmt.

2.9 Auswertung histologischer Nebennierenschnitte

Die quantitative Analyse der mit Hämalaun-Eosin angefärbten Schnitte (s. 2.7.2) erfolgte mittels Arealmessungen kompletter Nebennierenschnitte. Hierbei wurden Mark und Kortexumfang getrennt voneinander mit Hilfe des „NIH Scion Image“ Programms bestimmt. Es wurden jeweils 5-15 Schnitte des medianen Teiles jeder Nebenniere, an dem über mindestens 20 Schnitte ein konstanter Durchmesser zu finden war (siehe Prozent Varianz, wie unten dargestellt), ausgewertet. Digitale Aufnahmen wurden mit einer CCD-Videokamera (XC-77CE, Sony), welche an ein Zeiss/Axioplan Mikroskop angeschlossen war, angefertigt. Die Bilder wurden am Computer mit Hilfe der „NIH Scion Image“ Software ausgewertet. Die Gesamtfläche des Nebennierenschnitts, sowie das Mark wurden direkt gemessen und jene für die Rinde durch Subtraktion des Marks von der Gesamtfläche rechnerisch bestimmt. Die Gesamtvarianz in Prozent der Messungen für totale, kortikale und medulläre Fläche war 4.2 ± 0.3 , 4.5 ± 0.3 und 9.5 ± 0.6 (Mittelwert \pm SEM). Diese Zahlen zeigen, dass die Varianz der Messungen von individuellen Schnitten ziemlich gering war. Die Flächen sind als Anzahl Quadratpixel dargestellt. Die ermittelten Flächen der beiden Nebennieren pro Tier wurden in „linke“ und „rechte“ unterteilt dargestellt. Des Weiteren wurde die Gesamtfläche beider Nebennieren addiert. Die Daten sind für gesamte, kortikale und medulläre Fläche pro Tier als Mittelwert \pm SEM (n=10 pro Tier pro Gruppe) dargestellt.

2.10 Auswertung und Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels des Statistik-Programms SPSS, Version 9.0. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) dargestellt. Die Daten des Futter- und Trinkkonsums wurden mittels der Twoway-Varianzanalyse (ANOVA) analysiert. Dabei wurde eine Messwiederholung, und bei angemessenen Fällen, eine anschließende post-hoc Testung mit Kontrasten nach der Bonferroni-Prozedur durchgeführt. Die experimentellen Daten der physiologischen Parameter, der Hormonwerte, der mRNA-Konzentrationen, der Rezeptor-Gehalte, des Plasma-CBGs und der Neurogenese-Raten wurden mit dem Student's t-Test oder einer ANOVA, und bei Bedarf gefolgt von post-hoc Testungen mit Kontrasten nach der Bonferroni-Prozedur getestet. Die Schlafuntersuchungen wurden mittels ANOVA oder dem Student's t-

Test geprüft. Die Verhaltensstudien wurden mittels Student's t-Test oder im Falle des *open fields* mittels ANOVA mit Messwiederholung getestet, und bei angemessenen Fällen wurde eine anschließende post-hoc Testung mit LSD-Korrektur durchgeführt.

Für die Daten, die mittels der ANOVA als signifikant ermittelt werden konnten, sind in den Legenden der entsprechenden Figuren oder im Ergebnistext die genauen statistischen Parameter aufgeführt. Werden jene nicht in der Legende dargestellt, so ergaben sich in dieser Art der statistischen Prüfung keine signifikanten Veränderungen. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0.05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Modell des Laufrades

3.1.1 Laufaktivität

Männliche C57BL/6N Mäuse hatten nach einer Habituationsszeit von fünf Tagen die Möglichkeit freiwillig ein Laufrad über einen Zeitraum von vier Wochen zu benutzen. Es zeigte sich, dass die Funktionsfähigkeit des Laufrades von den Tieren schnell erkannt und dies innerhalb von einer Nacht ausdauernd benutzt wurde. In Abb. 11 ist dargestellt, wie sich das Laufverhalten der Tiere entwickelte. Für dieses Experiment wurden die Tiere in Käfigen gehalten, an denen Räder mit einem magnetischen Zählersystem angeschlossen waren. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 10 Einzeltieren pro Tag. Nach zwei bis drei Tagen erreichten die Tiere ihre durchschnittlich gelaufenen Distanzen (5-6 km), die sie mit leichten Schwankungen über den gesamten Testzeitraum beibehielten.

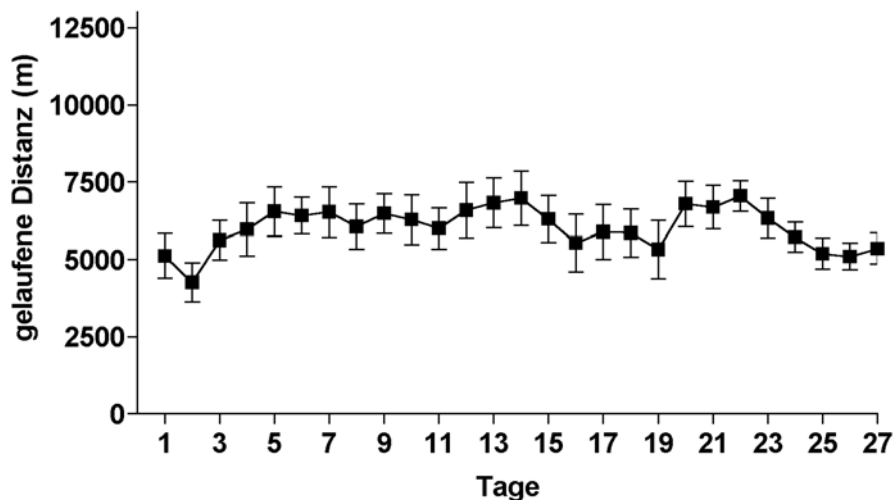


Abb. 11 Das Laufverhalten während des Experimentierzeitraumes. Dargestellt ist das Laufverhalten pro Tag, gemittelt aus 10 Einzeltieren (\pm SEM) über einen Zeitraum von vier Wochen.

Einige Tiere liefen generell mehr als andere, aber es wurde bei allen von uns getesteten Mäusen eine Laufaktivität festgestellt (s. Abb. 12). In Abb. 13 ist die Verteilung der gelaufenen Distanzen, aufgeteilt in einzelne Stunden über 24 Stunden dargestellt. Die größte Laufaktivität zeigten die Tiere direkt nach Beginn der Dunkelphase, dem Beginn der Aktivitätsphase der Tiere, und sie dauerte bevorzugt

die erste Nachthälfte an. Sobald die Hellphase anbrach, die Ruhephase der Tiere, liefen die Tiere so gut wie gar nicht mehr.

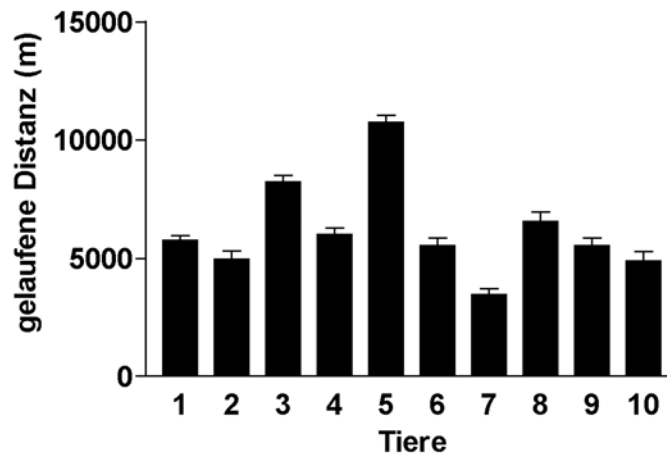


Abb. 12 Das Gesamtlauferhalten einzelner Tiere. Der Mittelwert des Laufverhaltens von Einzeltieren (n=10) ± SEM, gemittelt über den gesamten Testzeitraum von 27 Tagen.

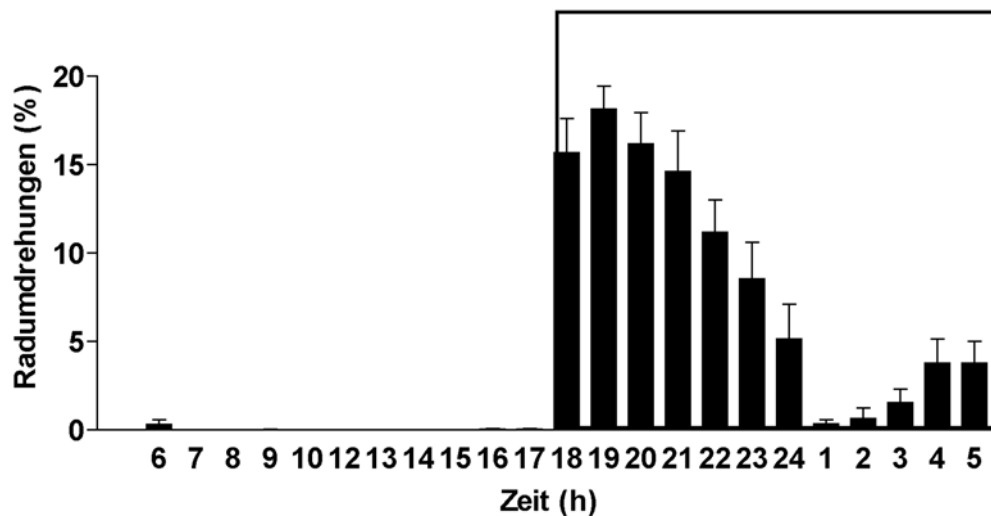


Abb. 13 Zeitkurve der Laufradaktivität über 1 Stunden-Intervalle an einem Tag am Ende der vierwöchigen Experimentierphase. Dargestellt ist der Mittelwert (n=9) ± SEM. Die Daten sind dargestellt als Prozent der gesamten Anzahl der Radumdrehungen. Der eingezeichnete Kasten zeigt die Dunkelphase an.

3.1.2 Allgemeine physiologische Parameter

In Abbildung 14 ist der Zeitverlauf des Futter- und Wasserkonsums von Kontrolltieren (KO) und Tieren, die die Möglichkeit hatten, freiwillig ein Laufrad über einen Zeitraum von vier Wochen zu benutzen (LR-Tiere bzw. LR) dargestellt, ermittelt einmal wöchentlich. Der Futterkonsum über diesen vierwöchigen Zeitraum war nicht

unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen (Effekt LR: $F_{1,8}=1.9$, $p>0.05$; Abb. 14A), aber die Experimentalgruppe zeigte einen erhöhten Flüssigkeitskonsum, welcher ab der zweiten Woche signifikant unterschiedlich zu dem Konsum der Kontrollgruppe war (Effekt LR: $F_{1,8}=9.4$, $p<0.02$; Abb. 14B).

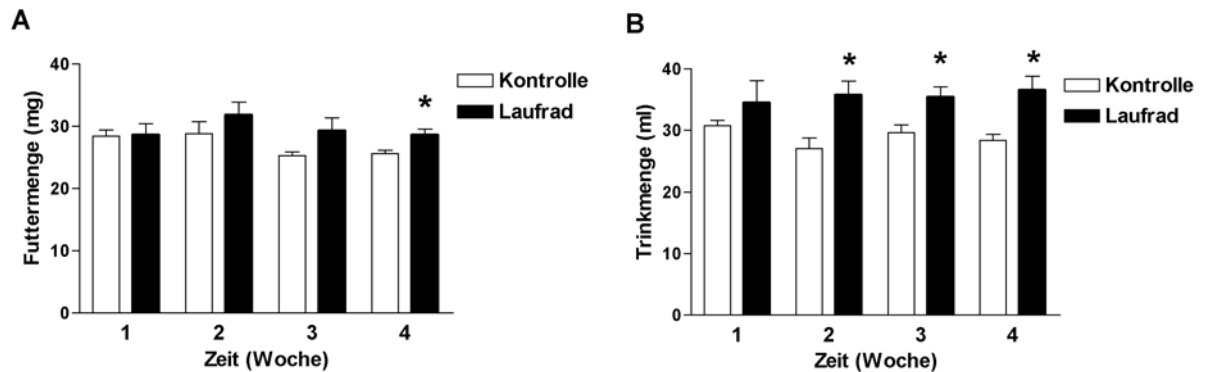


Abb. 14 Der Vergleich von A) Futter- und B) Wasseraufnahme (MW \pm SEM) in C57BL/6N Mäusen mit (LR, n=5) und ohne (KO, n=5) Zugang zu einem Laufrad über einen Zeitraum von vier Wochen. A) Es wurde keine signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen in Bezug auf die Futteraufnahme festgestellt. B) Der Wasserkonsum war signifikant erhöht in den LR-Tieren von der zweiten Woche an. Die ANOVA-Analyse ist dem Text zu entnehmen (*, $p<0.0125$, post-hoc Kontraste).

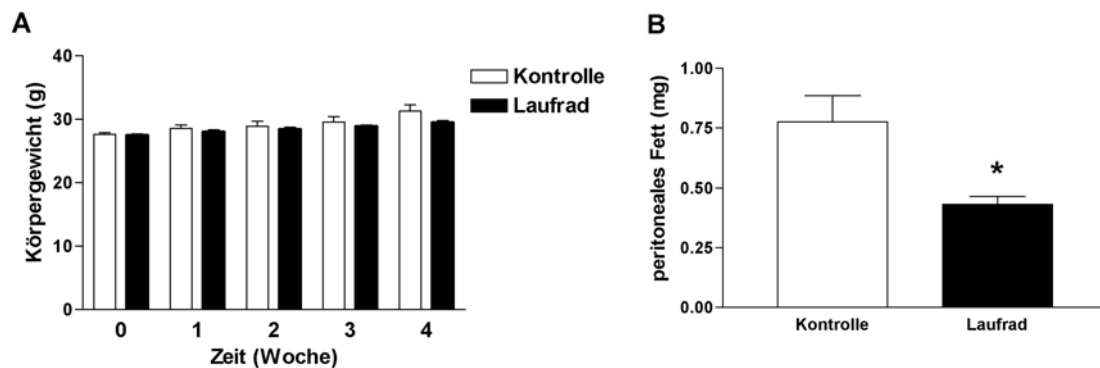


Abb. 15 Der Effekt von freiem Zugang zu einem Laufrad über einen Zeitraum von vier Wochen auf A) den Zeitverlauf des Gesamtgewichtes (KO, n=15, LR, n=15) und B) das Gewicht des peritonealen Bauchfettgewebes (MW \pm SEM) in C57BL/6N Mäusen (LR, n=5, KO, n=5). Nach vier Wochen zeigte sich kein Unterschied zwischen beiden Gruppen in Bezug auf das Gesamtgewicht, aber die LR-Mäuse hatten signifikant weniger peritoneales Fettgewebe als die Kontrollen (*, $p<0.01$, Student's t-Test).

Wie in Abb. 15A dargestellt, nahmen beide Gruppen in der vierwöchigen Testperiode an Gewicht zu (Zeiteffekt: $F_{6,108}=79.2$, $p<0.0001$), allerdings gab es keinen Unterschied zwischen beiden Gruppen (Effekt LR: $F_{1,8}=1.1$, $p>0.05$). Bei einem weiteren Experiment, in dem die Tiere 12 Wochen die Möglichkeit hatten ein Laufrad zu benutzen, zeigte sich weder nach vier noch nach 12 Wochen ein signifikanter Unterschied in der Gewichtszunahme (Daten nicht dargestellt). Am

Ende des vierwöchigen Untersuchungszeitraumes zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf Ebene der Körperzusammensetzung. Die LR-Tiere hatten viel weniger peritoneales (mesenterisches und perirenales) Fettgewebe (-45%) als die Kontrolltiere (Abb. 15B). Bei weitergehenden Untersuchungen der Körper der Tiere konnte festgestellt werden, dass die LR-Tiere mehr Muskelmasse aufwiesen, welche auch besser durchblutet war, was anhand der intensiveren roten Gewebefarbe zu sehen war. Diese Effekte durch physische Aktivität sind mehrfach in der Literatur beschrieben worden. Diese Befunde wurden durch bildgebende nukleare Magnetspinresonanz (NMR)-Untersuchungen bestätigt (Abb. 16). Weiß bedeutet hierbei fetthaltig. Auf den Beispielbildern eines repräsentativen Tieres pro Gruppe ist zu sehen, dass die LR-Maus weniger Fett im gesamten Abdominalbereich, und besonders um die Organe herum aufwies, dafür aber mehr Muskelmasse zeigte, die besonders deutlich an den Beinen zu sehen war. Die gesamte Körperzusammensetzung erscheint nicht nur anhand von NMR-Bildern, sondern auch aufgrund durchgeführter Dissektionen bei LR-Tieren kompakter als bei Kontrolltieren.

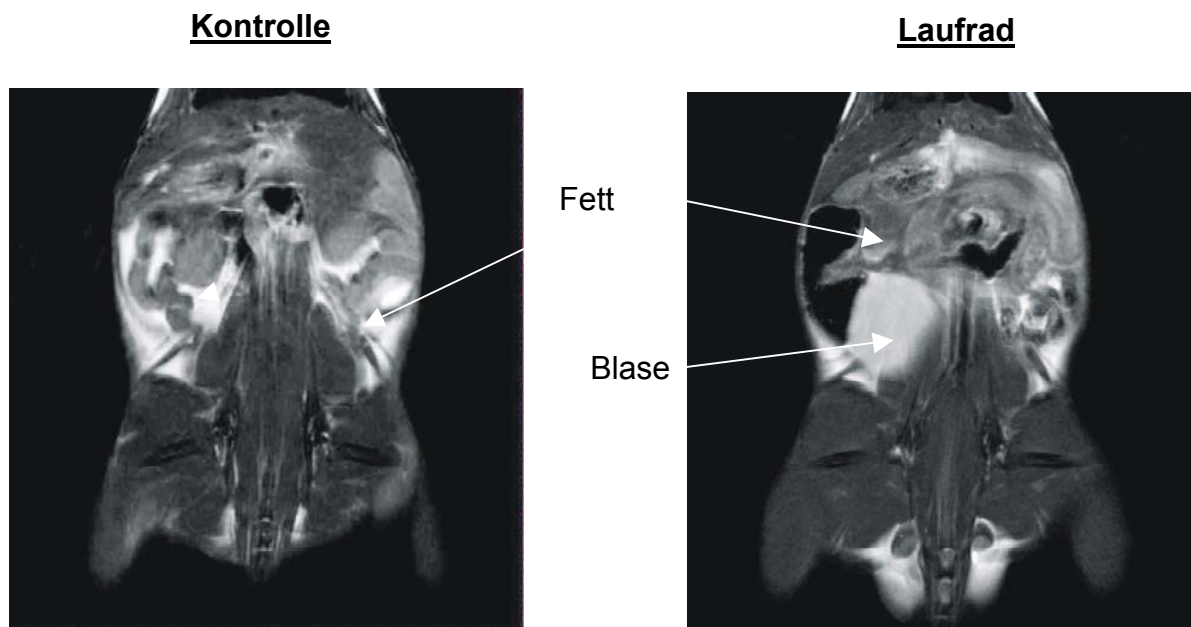


Abb. 16 Dargestellt sind Beispielaufnahmen des Körperinneren im Längsschnitt eines repräsentativen Kontrolltieres und eines repräsentativen LR-Tieres mit Hilfe der nuklearen Magnetspinresonanz (NMR) Technik. Die helle Färbung zeigt die Fettverteilung an.

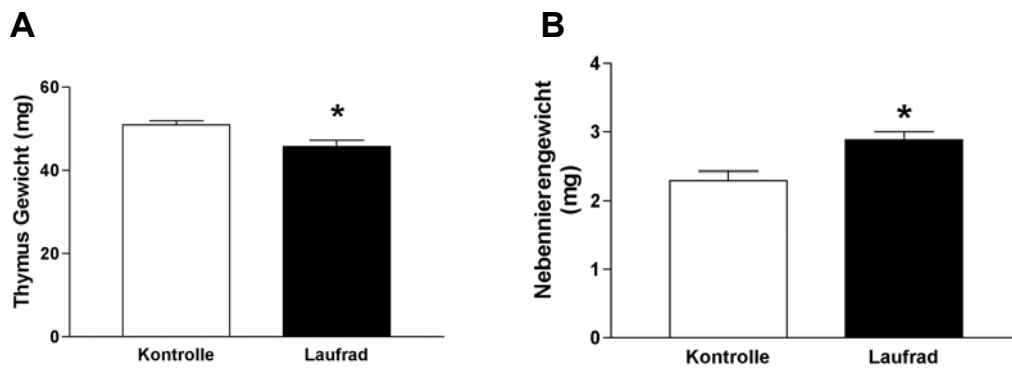


Abb. 17: Effekt von vierwöchigem freien Zugang zu einem Laufрад auf A) das Thymusgewicht (KO, n=20, LR, n=19) und B) auf das Nebennierengewicht (1 Paar/Tier; KO, n=24, LR, n=29) in C57BL/6N Mäusen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die LR-Tiere hatten signifikant verkleinerte Thymi (*, $p < 0.05$, Student's t-Test) und signifikant vergrößerte Nebennierengewichte (*, $p < 0.05$, Student's t-Test) nach der Experimentierphase.

Wie in Abbildung 17 dargestellt, resultiert vierwöchiges freiwilliges Benutzen eines Laufrades in einer signifikanten Abnahme des Thymusgewichtes (Abb. 17A), während eine signifikante Zunahme des Nebennierengewichtes (Fig. 17B) festgestellt werden konnte. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse der Veränderung der Thymus- und Nebennierengewichte auf eine erhöhte Aktivierung der HPA-Achse über den Experimentierzeitraum hin (Dallmann et al., 1987). Um zu untersuchen, ob es Veränderungen in der Zusammensetzung der Nebennieren gab, wurden histologische Untersuchungen der Morphologie anhand angefärbter Gefrierschnitte durchgeführt. Es zeigte sich, dass vierwöchiges Benutzen eines Laufrades zu Veränderungen sowohl auf der Ebene der Zusammensetzung (Rinde vs. Mark) als auch der Gesamtgröße führte (Abb. 18). Dazu wurden beide Nebennieren eines Tieres gemeinsam untersucht, um eine vollständige Erfassung der Kapazität von Mark und Rinde zu erhalten (Abb. 18A). Es zeigte sich, dass die Nebennierenrinde der LR-Tiere signifikant vergrößert war ($p < 0.05$, Student's t-Test), was zu einer tendenziellen Vergrößerung der gesamten Nebennierenfläche der LR-Tiere führte (Abb. 18A „gesamt“). Es wurden ebenfalls beide Nebennieren getrennt untersucht (Abb. 18B „links“ und „rechts“). Die Messung der Gesamtfläche ergab, dass die linke Nebenniere signifikant größer als die rechte war (Effekt links vs. rechts: $F_{1,34}=19.5$, $p < 0.0001$), was sowohl durch ein größeres Mark ($F_{1,34}=20.1$, $p < 0.0001$) als auch durch eine größere Rinde ($F_{1,34}=14.9$, $p < 0.0001$) zustande kam.

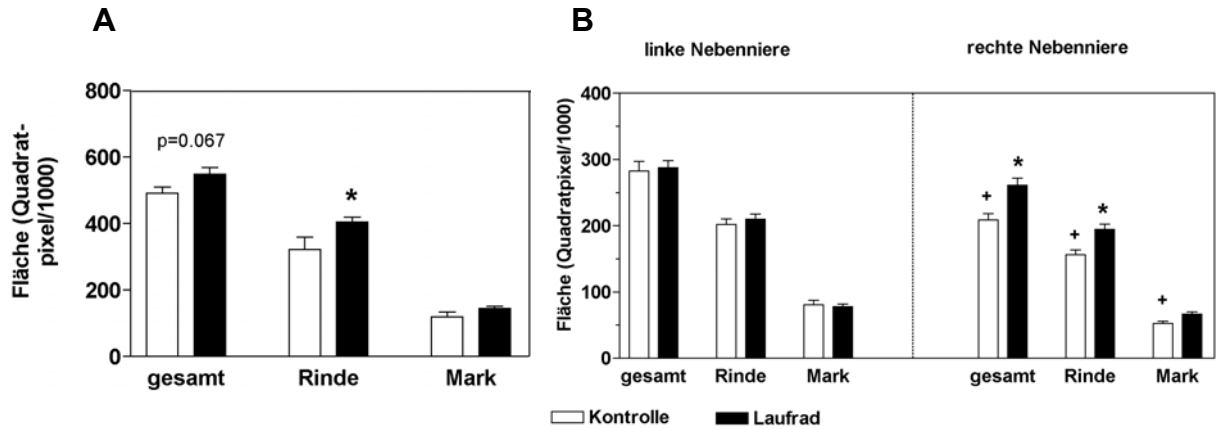


Abb. 18 Veränderungen der Größe von rechter und linker Nebenniere in Tieren, die 4 Wochen die Möglichkeit hatten ein Laufrad zu benutzen und Kontrolltieren. Es sind quantitative Flächenmessungen der beiden (links + rechts) Nebennierenoberflächen (A), und die Unterscheidung der Nebennieren in Gesamtfläche, Nebennierenrinden- und Nebennierenmarksfläche (B) dargestellt (MW ± SEM, n=10). (*, P<0.05, post-hoc Kontraste, Vergleich KO vs. LR; +, p<0.05, post-hoc Kontraste, Vergleich links vs. rechts innerhalb der gleichen Gruppe für „gesamt“, „Rinde“ und „Mark“)

Vier Wochen ausdauernde Bewegung hebt diesen Unterschied zwischen der linken und rechten Nebenniere dadurch auf, dass die rechte Nebennierenrinde selektiv vergrößert ist (Abb. 18B; Interaktion zwischen links/rechts und Laufrad: $F_{1,34}=4.4$, $p<0.05$; Effekt Laufrad: $F_{1,34}=6.3$, $p<0.05$, post-hoc Test mit Kontrasten: Signifikanter Unterschied zwischen den rechten Rinden der LR-Tiere vs. Kontrolle, linke Rinden der LR-Tiere vs. Kontrollen waren nicht signifikant unterschiedlich). Der links/rechts Größenunterschied des Nebennierenmarkes war in den LR-Tieren ebenfalls aufgehoben, was allerdings kein signifikantes Niveau erreichte. Es zeigte sich generell kein Effekt durch das Laufen auf die linke Nebenniere (Abb. 18B).

In Abbildung 19 sind repräsentative histologische Schnitte von jeweils einem Paar Nebennieren von einer Kontrollmaus und einer LR-Maus abgebildet. Es ist zu sehen, dass die beiden Nebennieren der Kontrollmaus in ihrer Größe variieren und eine eher ovale Form zeigen, während die „kleinere“ Nebenniere der LR-Maus sich in ihrer Größe der „größeren“ angeglichen hat, und beide eine eher runde Form aufweisen.

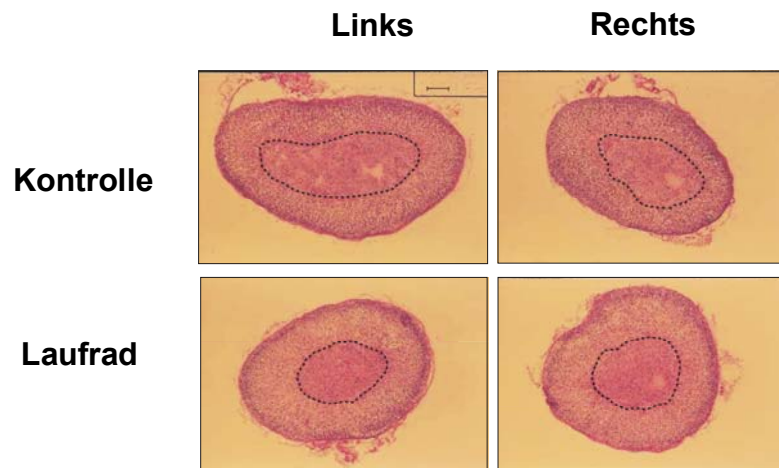


Abb. 19 Repräsentative histologische Aufnahmen von linker und rechter Nebenniere (mittlerer Querschnitt) eines KO- und eines LR-Tieres. Die Schnitte wurden mit Hämalaun-Eosin angefärbt. Zur Verdeutlichung der Grenze zwischen Mark und Rinde wurde diese manuell nachgezogen. Es zeigt sich, dass die ovalen Nebennieren des Kontrolltieres einen Größenunterschied zwischen links und rechts aufweisen, der in den eher runden Nebennieren des LR-Tieres aufgehoben ist.

3.1.3 Tyrosinhydroxylase mRNA-Expression im Nebennierenmark

Der Gehalt an Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA im Nebennierenmark wurde als Index für die sympathoadrenomedulläre Aktivität bestimmt (Hamelink et al., 2002). Diese Aktivität ist ein bekannter Modulator der Sensibilität der Nebennierenrinde für ACTH (Jasper & Engeland, 1994). Die Benutzung eines Laufrades zeigte einen deutlichen Anstieg an TH mRNA-Expression im Nebennierenmark (Abb. 20; Effekt LR: $F_{1,40}=20.3$, $p<0.0001$). Zusätzlich zeigte sich, dass die TH mRNA-Expression im Mark der linken Nebenniere signifikant höher als in der rechten war (links vs. rechts: $F_{1,40}=4.7$, $p=0.037$). Ein post-hoc Test mit Kontrasten erbrachte einen signifikanten Anstieg an TH mRNA-Gehalten im rechten Nebennierenmark nach ausdauernder körperlicher Aktivität ($p=0.008$).

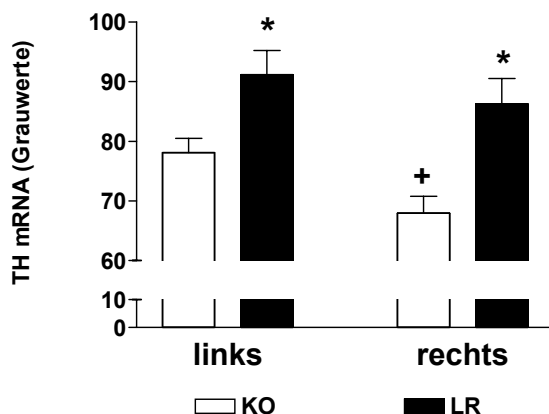


Abb. 20 Veränderungen der Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA-Konzentrationen im Nebennierenmark bei KO- und LR-Tieren ($n=10$ in beiden Gruppen). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (⁺, $p<0.05$, post-hoc Kontraste, Vergleich linke vs. rechte Nebenniere. *, $p<0.05$, KO vs. LR).

3.2 Aktivitätsbedingte Änderungen der HPA-Achse

Um Modifikationen des Status der HPA-Achse infolge von vierwöchigem freiwilligen Benutzen eines Laufrades der Maus zu charakterisieren, wurden auf den verschiedenen Ebenen der HPA-Achse Untersuchungen durchgeführt.

3.2.1 Neuroendokrine Experimente

3.2.1.1 Basalstatus

Um den basalen Status der HPA-Achse von Kontroll- und Experimentiergruppe zu ermitteln, wurde der zirkadiane Verlauf von ACTH, Corticosteron und CBG (Corticosteron-bindendes Globulin) gemessen (Abb. 21). Die Tiere wurden unter Basalbedingungen zu den Zeitpunkten 8.00 h (n=14-15, für CBG: n=8), 18.00 h (n=8) und 24.00 h (n=8) getötet. Um 8.00 h morgens, dem Beginn der Ruhephase der Tiere, zeigte sich kein Unterschied in den Plasmagehalten an Corticosteron zwischen den beiden Gruppen (KO = 5.5 ng/ml \pm 2.1; LR = 5.0 ng/ml \pm 1.3). Die Plasmakonzentrationen von ACTH waren in der LR-Gruppe signifikant erniedrigt (KO = 47.0 pg/ml \pm 2.5; LR = 36.4 pg/ml \pm 2.1; Abb. 21A). Am Ende der Lichtphase (18 h) zeigte sich eine hundertprozentige Erhöhung der Corticosteron-Plasmawerte der LR-Tiere gegenüber den Kontrolltieren, während die ACTH-Werte vergleichbar anstiegen (Abb. 21B). Um Mitternacht war kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen sowohl bei ACTH als auch bei Corticosteron nachweisbar (Abb. 21C). Um festzustellen, ob die erhöhten Corticosteron-Werte der LR-Tiere zu Beginn der Aktivitätsphase der Tiere auch eine biologische Relevanz haben, wurden die Plasmakonzentrationen von CBG gemessen. CBG ist das primäre Transportprotein von Corticosteron in Nagetieren. Zum Zeitpunkt 18.00 h zeigte sich eine signifikante Erhöhung von CBG in den LR-Tieren (Abb. 21C), die allerdings nur 23% entsprach, und somit um einiges geringer war als der Anstieg an Plasma Corticosteron (Abb. 21B). Daraus resultierte eine erhöhte biologische Aktivität von Glucocorticoiden in den körperlich aktiveren Mäusen, dies allerdings nur zum Beginn der Dunkelphase, der Aktivitätsphase der Tiere. Die ANOVA Statistik ergab: ACTH: Effekt der Zeit: $F_{2,55}=88.2$, $p<0.0001$; Effekt LR: $F_{1,55}=3.1$, $p>0.05$; Interaktion Zeit x LR: $F_{2,55}=0.2$, $p>0.05$. Corticosteron: Effekt der Zeit: $F_{2,55}=127.1$, $p<0.0001$; Effekt LR: $F_{1,55}=17.9$, $p<0.05$; Interaktion Zeit x LR: $F_{2,55}=19.1$, $p<0.0001$. CBG:

Effekt Zeit: $F_{2,42}=24.8$, $p<0.0001$; Effekt LR: $F_{2,42}=0.7$, $p>0.05$; Interaktion Zeit x LR: $F_{2,42}=3.7$, $P<0.05$. *, $p<0.05$, post-hoc Kontraste

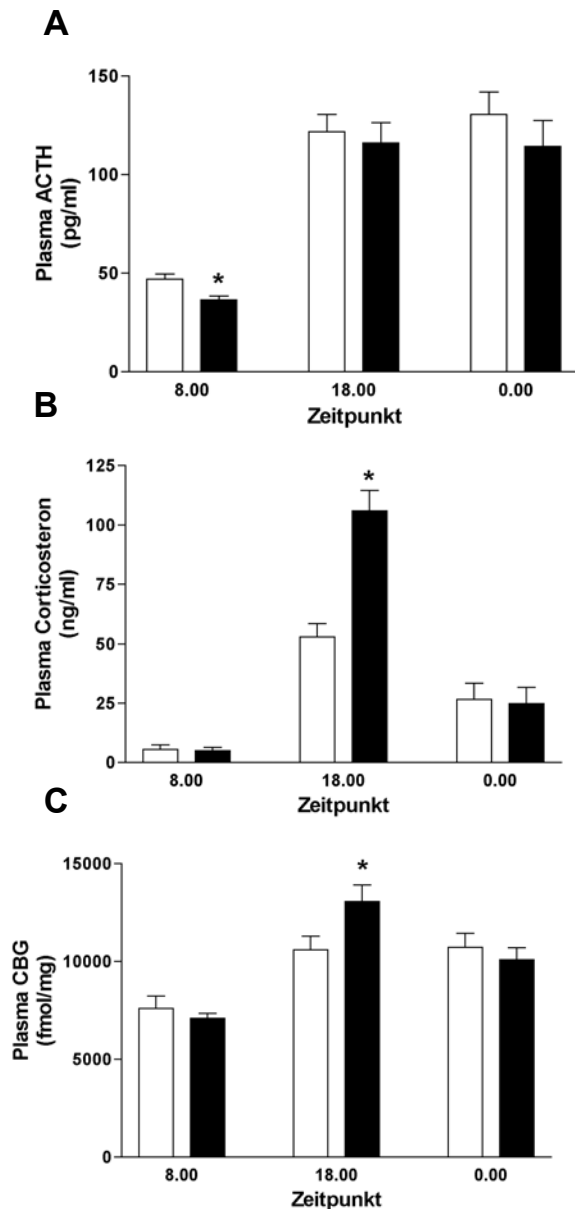


Abb. 21

Zirkadianer Rhythmus von ACTH, Corticosteron und Corticosteron-bindendes Globulin (CBG)-Konzentrationen im Blutplasma von Mäusen, die zu den Zeitpunkten 8.00 h, 18.00 h und 0.00 h unter Basalbedingungen getötet wurden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (KO, n=8; LR, n=8). Die LR-Tiere zeigten zum Zeitpunkt 8.00 h geringere ACTH-Gehalte, während zum Zeitpunkt 18.00 h Corticosteron und CBG-Konzentrationen im Vergleich zu den KO-Tieren erhöht waren (*, $p<0.05$, post-hoc Kontraste).

3.2.1.2 Stress

Um festzustellen, wie sich die HPA-Achse nach vierwöchigem freiwilligen Benutzen eines Laufrades in Bezug auf Stress verhält, wurde der Effekt von verschiedenen Arten von Stressoren untersucht und die Plasmakonzentrationen an ACTH und Corticosteron direkt im Anschluss an den Stressor determiniert. Die verwendeten Stressoren waren 10 min Schwimmstress (*forced swimming*, Abb. 22), 30 min Einsperrstress (*restraint stress*, Abb. 23) und 15 min sozialer Konflikt (*social defeat*, Abb. 24). Bei allen drei Stressoren zeigte sich, dass es einen vergleichbaren Anstieg der ACTH-Plasmakonzentrationen als Antwort auf den Stressor in beiden Gruppen gab (Abb. 22A, 23A, 24A). Der Anstieg der Corticosteron-Plasmagehalte war

allerdings in den LR-Tieren bei allen drei Stressoren signifikant höher als in den vergleichbaren Kontrolltieren (Abb. 22B, 23B, 24B).

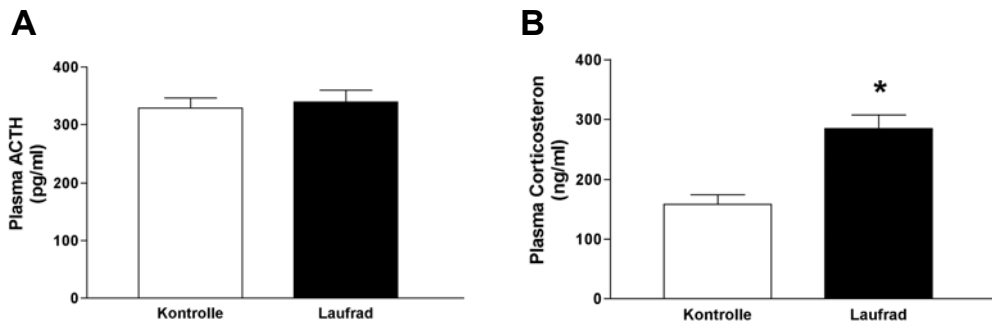


Abb. 22 Schwimmstress. ACTH- und Corticosteron-Konzentrationen im Plasma in Mäusen, die direkt nach einer 10minütigen erzwungenen Schwimmstressprozedur getötet wurden. Die Mäuse, die vier Wochen die Möglichkeit hatten freiwillig ein Laufrad zu benutzen, zeigten signifikant erhöhte Corticosteron-Konzentrationen bei einem vergleichbaren Anstieg an ACTH (*, $p < 0.05$, Student's t-test, $n = 8$).

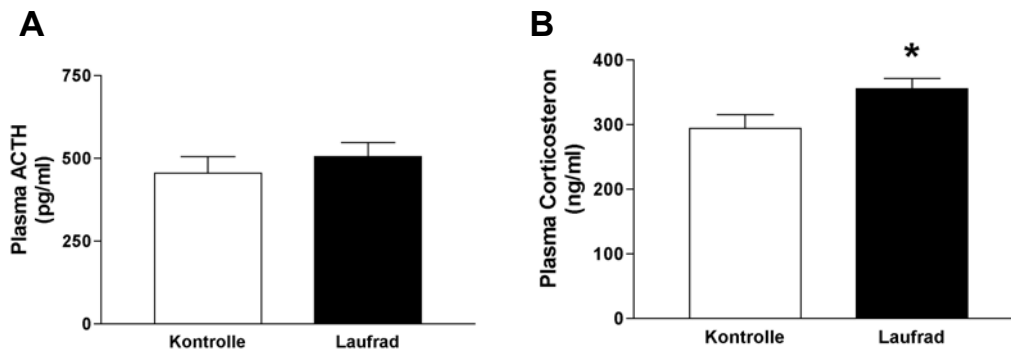


Abb. 23 Einsperrstress. ACTH- und Corticosteron-Konzentrationen im Plasma in Mäusen nach einem 30minütigen Einsperrstress (Tiere wurden direkt am Ende der Stressprozedur getötet). Mäuse, die vier Wochen die Möglichkeit hatten sich ausdauernd in einem Laufrad zu bewegen, hatten signifikant erhöhte Corticosteron-Plasmakonzentrationen bei einem vergleichbaren Anstieg an ACTH (*, $p < 0.05$, Student's t-Test, $n = 8$).

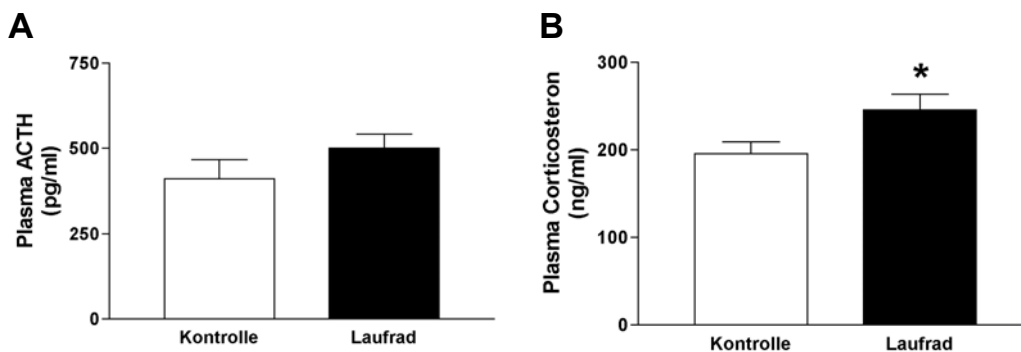


Abb. 24 Sozialer Konflikt. ACTH- und Corticosteron-Konzentrationen im Plasma in Mäusen, die direkt nach einer 30minütigen sozialen Konfliktsituation getötet wurden. Die Mäuse, die vier Wochen lang die Möglichkeit hatten freiwillig ein Laufrad zu benutzen, zeigten signifikant erhöhte Corticosteron-Konzentrationen bei vergleichbaren ACTH-Konzentrationen im Anschluss an den sozialen Konflikt (*, $p < 0.05$, Student's t-Test, $n = 9$).

Um zu ergründen, wie sich die Hormonkonzentrationen in Bezug auf einen eher milden psychologischen Stressor verhalten, wurden Kontroll- und LR-Tiere einem 30minütigen „*novel environment*“-Stress, der bedeutet, dass die Tiere in einen neuen Käfig in einer neuen Umgebung gebracht werden, unterzogen. Dabei wurden die Bedingungen KO- ohne/mit Rad und LR-Tiere mit/ohne Rad getestet. Diese Bedingungen wurden gewählt, um den Einfluss auf die Tiere vergleichbar zu halten, da die LR-Tiere es gewöhnt waren ein LR in ihrem Käfig zu haben, und die KO-Tiere eben nicht. Es wurden jeweils saubere Räder verwendet, um einen olfaktorischen Einfluss auszuschließen. Abbildung 25A zeigt, dass der ACTH-Anstieg in Bezug auf Neuheit in den LR-Tieren bei beiden Bedingungen (mit/ohne LR im neuen Käfig) niedriger war. (Effekt LR: $F_{1,43}=10.466$, $p=0.002$).

Die Anwesenheit eines Laufrades hatte keinen Einfluss auf die ACTH-Plasmakonzentrationen sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei der LR-Gruppe. Eine post-hoc Analyse führte zu einem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen KO + LR und LR + LR ($p<0.05$, Student's t-Test). Der Unterschied zwischen KO - LR und LR - LR war tendenziell unterschiedlich ($p=0.057$, Student's t-Test).

Die Plasma-Corticosteron-Daten (Abb. 25B) zeigten ein differenzierteres Antwortmuster auf Neuheit im Vergleich zu den ACTH-Daten. Hier erlangte die Anwesenheit eines Laufrades in der Stressprozedur Bedeutung (Interaktion zwischen Training und LR im neuen Käfig: $F_{1,44}=4.304$, $p=0.045$). Abb. 25B zeigt, dass ein signifikant verminderter Corticosteron-Anstieg nur in den LR-Tieren mit einem LR im neuen Käfig zu sehen ist. Wenn die Tiere kein LR zur Verfügung hatten, waren die Corticosteron-Konzentrationen vergleichbar mit denen der Kontrolltiere.

Des Weiteren führte ein Vergleich der LR-Tiere ohne bzw. mit LR auf Ebene der durch Neuheit induzierten ACTH- und Corticosteron-Plasmakonzentrationen zu dem Schluss, dass obwohl vergleichbare ACTH-Werte erzielt wurden, das Fehlen der Laufaktivität zu einer erhöhten Corticosteron-Sekretion führte. Dies wird auch deutlich im Ratio ACTH/Corticosteron der LR Tiere ohne LR im Vergleich zu den LR-Tieren mit LR (i.e. 2.2 ± 0.5 ($n=9$) vs. 3.7 ± 0.4 ($n=9$), $p=0.034$, Student's t-Test).

Außerdem zeigte sich, dass die LR-Tiere das Laufrad in den 30 min des Aufenthaltes in dem neuen Käfig ausdauernd nutzten, während die KO-Tiere es explorierten, aber die Funktion eine geringere Bedeutung hatte. Unterbindet man allerdings die Laufaktivität durch ein funktionsuntüchtiges Laufrad (mit einem blockierten Drehmechanismus), sind sowohl ACTH- als auch Corticosteron-

Plasmakonzentrationen signifikant höher als in den LR-Tieren mit einem funktionstüchtigen LR, und dies vergleichbar mit den Werten der Kontrolltiere (Plasma ACTH: 310 ± 28 pg/ml ($n=7$); Plasma Corticosteron 105 ± 12 ng/ml ($n=7$)). Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass ein funktionstüchtiges Laufrad notwendig ist, um eine erniedrigte Corticosteron-Sekretion zu ermöglichen.

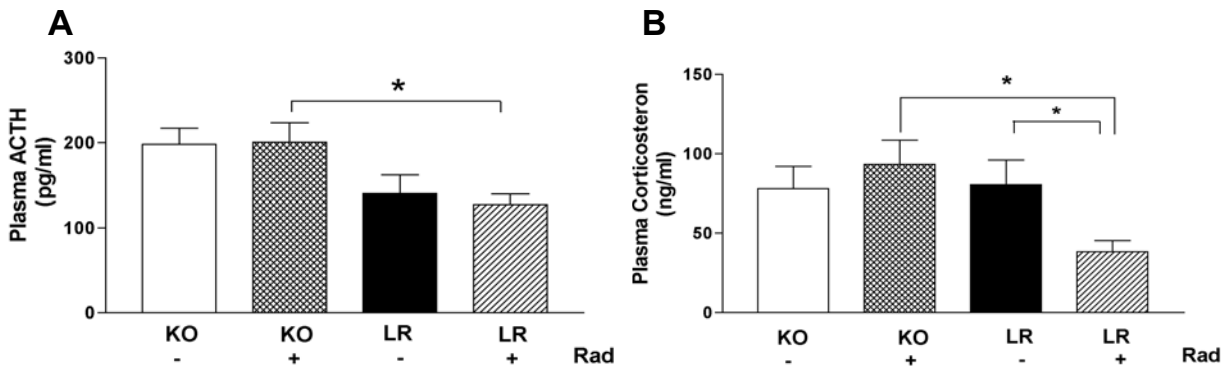


Abb. 25 Neue Umgebung. ACTH- und Corticosteron-Plasmakonzentrationen nach 30minütigem *novel environment*-Stress. Für einige Tiere (sowohl KO- als auch LR-Tiere) wurde in den neuen Käfig ein frisches Laufrad eingebracht. Wenn KO- bzw. LR-Tiere in einen neuen Käfig ohne Laufrad gebracht wurden, zeigte sich kein Unterschied in den Corticosteron-Werten. Die Reduktion an Plasma ACTH erreichte kein signifikantes Niveau. Wenn die Tiere allerdings ein Laufrad in der neuen Umgebung hatten, zeigten die LR-Tiere veränderte Hormonsekretionen im Vergleich zu den Kontrolltieren und den LR-Tieren ohne Laufrad in der neuen Umgebung (*, $p < 0.05$, post-hoc Kontraste, $n=9-12$).

3.2.2 Corticosteroid-Rezeptor-Bindung im Gehirn und in der Hypophyse

Um festzustellen, ob infolge körperlicher Aktivität auch Veränderungen auf Ebene der glucocorticoidbindenden Mineralo- und Glucocorticoid-Rezeptoren (MR und GR) stattfinden, wurden mittels des Rezeptor-Bindungs-Assay Verfahrens ihre Bindungsmenge und Affinität im Hippokampus, dem Hypothalamus und der Hypophyse ermittelt. Der MR wurde nur im Hippokampus bestimmt, da er in dieser Region eine bedeutende Rolle spielt. Bei Untersuchungen zu glucocorticoidbindenden Rezeptoren ist es sehr wichtig, dass eine komplette Adrenalectomie der Tiere stattgefunden haben muss, d. h. es darf kein endogenes Corticosteron mehr im Blutkreislauf zirkulieren, da eine deutliche Korrelation zwischen den im Plasma detektierten Corticosteron-Gehalten und der MR-Bindung zu finden ist (Abb. 26).

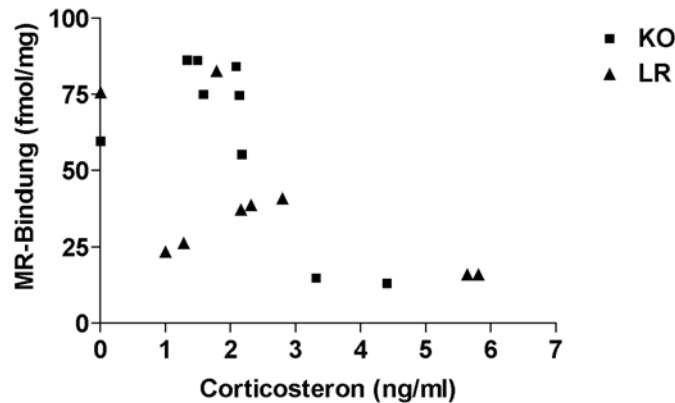


Abb. 26 Die Korrelation von Bindungssättigung des Mineralocorticoid-Rezeptors (MR; fmol/mg) und Corticosteron-Gehalt (ng/ml) im Blutplasma adrenalectomierter Tiere. Es zeigt sich eine deutliche Korrelation. Je höher die Konzentration an Corticosteron, desto niedriger die Bindung an den MR.

Aufgrund der gefundenen Korrelation wurden die Tiere, die 24 h nach einer Adrenalectomie eine Corticosteron-Plasmakonzentration von mehr als 2.5 ng/ml aufwiesen, ausgeschlossen. Es zeigte sich, dass die MR-Bindungskapazitäten im Hippokampus der LR-Tiere um 38% signifikant erniedrigt waren im Vergleich zu den Kontrolltieren ($p < 0.05$, Student's t-Test). Die GR-Bindungskapazitäten waren nicht unterschiedlich im Vergleich der beiden Gruppen. Wegen der Größe des murinen Hypothalamus und der murinen Hypophyse konnten die Untersuchungen zum GR nur in „gepooltem“ Gewebe durchgeführt werden. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf Ebene der GR-Rezeptordichte (Tab. 1).

Die Bindungsaffinitäten (K_d) waren durch das Laufen nicht beeinträchtigt und lagen für die Bindung von [3 H]-Aldosteron an den MR im Hippokampus für beide Gruppen bei 0.1 nM und für die Bindung von [3 H]-Dexamethason an den GR der LR-Mäuse im Hippokampus bei 0.8 nM, im Hypothalamus bei 1.2 nM und in der Hypophyse bei 2.0 nM. Die Kontrollgruppe zeigte K_d -Werte von 0.6 nM im Hippokampus, 1.0 nM im Hypothalamus und 1.5 nM in der Hypophyse (Tab. 1).

Bindungskapazität (fmol/mg)	Hippokampus	Hypothalamus	Hypophyse
MR – KO	132 ± 9	nd	nd
MR – LR	82 ± 16*	nd	nd
GR – KO	201 ± 11	149	136
GR – LR	179 ± 9	154	154

K _d (nM)	Hippokampus	Hypothalamus	Hypophyse
MR – KO	0.1	nd	nd
MR – LR	0.1	nd	nd
GR – KO	0.6	1.0	1.5
GR – LR	0.8	1.2	2.0

Tab. 1 Corticosteroid-Rezeptor-Bindungsparameter im Mausgehirn und der Hypophyse nach vierwöchigem freien Zugang zu einem Laufrad und in vergleichbaren Kontrolltieren. Die Tiere wurden einen Tag nach einer Adrenalectomie getötet. MR- und GR-Bindungsparameter wurden mit einer Radioliganden-Bindung bestimmt (für Details siehe 2.8.3) Die Rezeptoren im Hippokampus wurden durch Einzelmessungen in Tripletts mit einer 95%igen Sättigung der Radioliganden-Konzentration bestimmt (die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt, n=9 pro Gruppe). Aufgrund der Größe bzw. Kleinheit des Hypothalamus und der Hypophyse wurden die Rezeptoren in ihren experimentellen Gruppen gemischt bestimmt. Für die einzelnen Gewebe wurde die Bindungssättigung und eine *Scatchard plot*-Analyse durchgeführt, die zu B_{max} (dargestellt als fmol/mg Protein) und K_d (in nM) Werten führte. In Bezug auf den Hippokampus wurde die Sättigungsbindung und die Scatchard-Analyse in „gepooltem“ Gewebe, beinhaltend jedes Einzeltier, bestimmt. Auf diese Weise konnten ebenfalls die K_d Werte für die hippokampalen Corticosteroid-Rezeptoren bestimmt werden (*, p<0.05, Student's t-Test). nd = nicht gemessen (*not determined*)

3.2.3 Neuropeptid mRNA-Expression im hypothalamischen Nucleus paraventricularis (PVN)

Um zu untersuchen, ob die Änderungen der HPA-Achse induziert durch körperliche Langzeitaktivität auch auf Ebene der Neuropeptid-Expression im PVN stattfinden, wurden mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung die mRNA-Gehalte von CRH, Vasopressin und Oxytozin bestimmt. Diese Peptide sind u. a. verantwortlich für die ACTH-Freisetzung aus den corticotropen Zellen der Hypophyse. Es zeigte sich, dass die CRH mRNA-Expression signifikant erniedrigt in LR-Tieren verglichen mit Kontrolltieren war. Es wurden keine Gruppenunterschiede bei den Mengen an Vasopressin und Oxytozin mRNA festgestellt (Tab. 2).

mRNA	KO-Tiere	LR-Tiere
CRH	89 ± 2	79 ± 3*
Vasopressin	124 ± 9	124 ± 4
Oxytozin	137 ± 10	141 ± 10

Tab. 2 CRH, Vasopressin und Oxytozin mRNA-Konzentrationen im PVN von Mäusen, die vier Wochen die Möglichkeit hatten ein Laufrad zu benutzen und in Kontrolltieren. Die mRNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung und einer semi-quantitativen Messung der Grauwerte von digitalisierten Autoradiographie-Bildern bestimmt (für Details siehe 2.6) Die Daten sind als Netto-Grauwert dargestellt (Mittelwert ± SEM, n=6-8). (*, p<0.05, Student's t-test)

3.3 Neurogenese

Seit 1965 von Altman und Das gefunden wurde, dass auch im adulten Gehirn Neurogenese stattfindet (s. 1.6), werden proliferierende Zellen normalerweise mit Hilfe einer 5'Bromo-2-deoxy-Uridin (BrdU)-Injektion behandelt, die durch die Substitution einer endogenen DNA-Base, dem Thymidin, mit dem BrdU-Analogen zu einer spezifischen Markierung von sich teilenden Zellen führt. Dies lässt sich mit Hilfe einer Antikörperfärbung nachweisen. Da die BrdU-Methode mit einigen Nachteilen verbunden ist, wie zum Beispiel Injektionen, die selbst einen Stress für ein Tier

darstellen können, wurde mit Hilfe eines endogenen Proliferationsmarkers versucht, vergleichbare Ergebnisse zu ermitteln. Es wurde mit Hilfe der Immunhistochemie eine Antikörperfärbung durchgeführt, die das Epitop Ki-67 der Ribonukleotid-reduktase, einem Protein, das an der DNA-Synthese beteiligt ist, markiert. In Abb. 27 ist anhand von Beispielbildern dargestellt, wie die beiden Marker mitotisch aktive Vorläuferzellen in der subgranulären Zellschicht des Gyrus dentatus anfärben (A + D). Dabei zeigt sich in der Vergrößerung (B - F), dass beide Marker kondensierte Chromosomen anfärben, die bei Ki-67 meist als Zellhaufen auftreten. In den Bildern G und H ist dargestellt, wie die mit BrdU markierten Zellen innerhalb von 1-4 Wochen differenzieren und in die granuläre Zellschicht wandern.

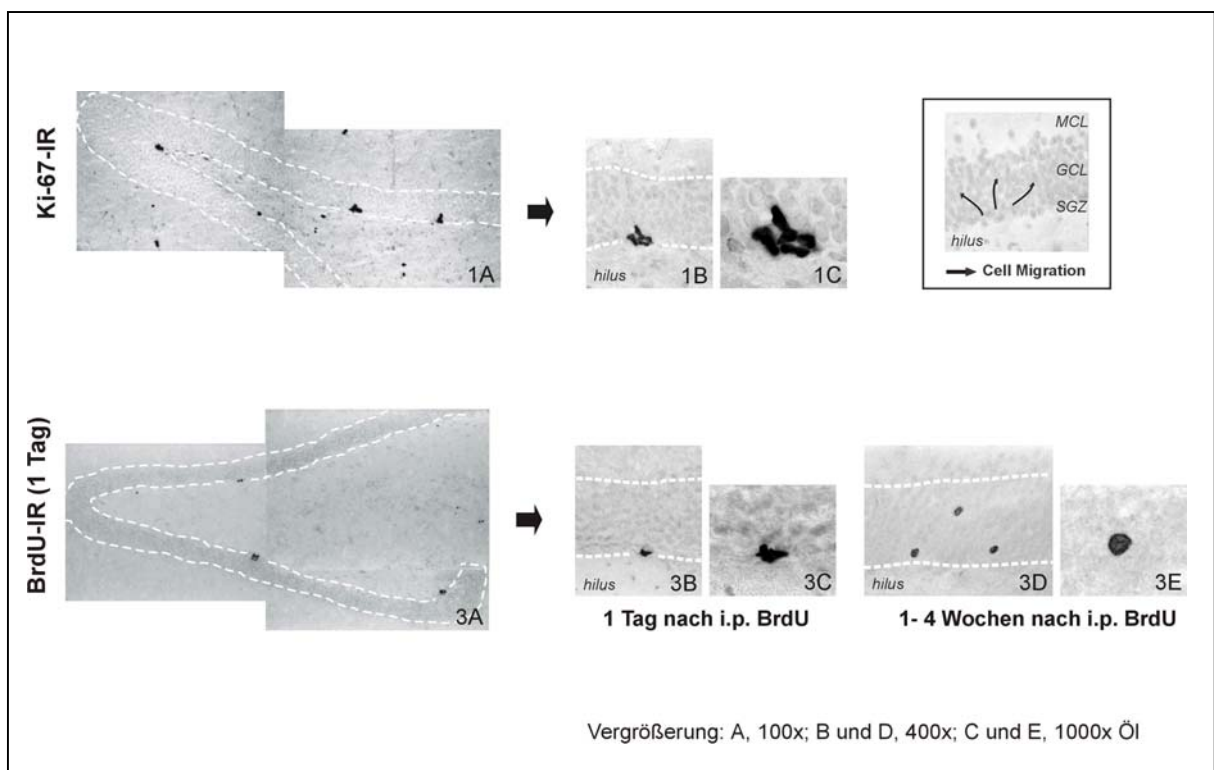


Abb. 27 Dargestellt ist anhand von Beispielbildern, wie die beiden Marker BrdU und Ki-67 neu gebildete Zellen im Gyrus dentatus (DG) des Hippokampus anfärben. A und D zeigen den gesamten DG; B und E im Detail, dass sich die proliferierenden Zellen in der subgranulären Zellschicht (SGZ) des DG befinden. Ki-67-Färbung zeigt sich sowohl in kondensierten Chromosomen, als auch in Zellhaufen (C), während BrdU nur Einzelzellen anfärbt (F), die dann über einen längeren Zeitraum hinweg in die granuläre Zellschicht (GCL) migrieren (G), wo sie zu Neuronen ausdifferenzieren (H). Der Differenzierungsprozess ist nicht mit Hilfe von Ki-67 nachweisbar, da es sich hierbei um einen reinen Proliferationsmarker handelt. (i.p. = intraperitoneale Injektion)

Abbildung 28 zeigt einen Vergleich der Markierungen von BrdU und Ki-67 in der subventrikulären Zone des lateralen Ventrikels, entlang des rostralen Migrationsweges und des Bulbus olfactorius (Riechkolben). Die Markierung, und somit die Anzahl proliferierender Zellen, erscheint mit Ki-67 intensiver, was daran liegt, dass es im gesamten Zellzyklus, außer der G0-Phase, exprimiert wird. Im Bulbus olfactorius zeigen sich nur mit Hilfe der BrdU-Färbung positive Zellen (nach 4-16 Wochen), die aus entlang des rostralen Migrationsweges gewanderten Vorläuferzellen zu Neuronen ausdifferenziert sind. Da Ki-67 nur proliferierende Zellen markiert, sind in der Region des Bulbus olfactorius keine positiven Zellen zu finden.

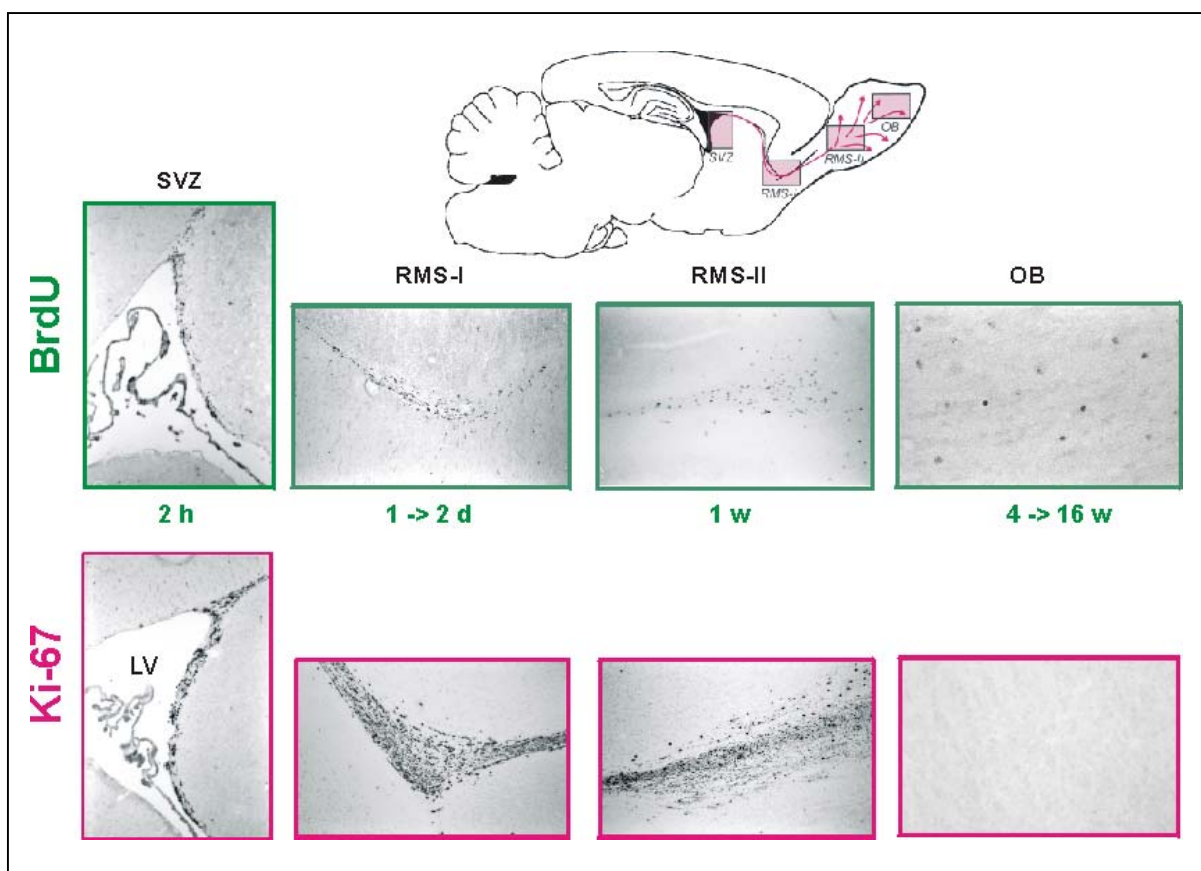


Abb. 28 Dargestellt ist anhand von Beispielbildern, wie die beiden Marker BrdU und Ki-67 proliferierende Zellen in der subventrikulären Zone (SVZ) des lateralen Ventrikels (LV) und dem rostralen Migrationsweg (RMS-I/II) anfärben. In diesen Regionen findet nur Proliferation statt. Im Bulbus olfactorius (OB) findet nur Differenzierung statt, weshalb BrdU positive Zellen zeigt, während Ki-67 keinerlei Zellen markiert.

In Abbildung 29 ist dargestellt, wie sich die Proliferationsrate von Zellen im Gyrus dentatus von adulten Mäusen im Zusammenhang mit verschiedenen Stressoren oder der freiwilligen Benutzung eines Laufrades verändert. Hierfür wurden die Tiere 24 h nach der Stressprozedur bzw. nach vierwöchigem Benutzen eines Laufrades dekapiert und Hirnschnitte mit Hilfe der immunhistochemischen Markierung des Ki-67 sichtbar gemacht. Es zeigte sich, dass infolge eines Stressors die Proliferation von Vorläuferzellen im DG der Tiere signifikant erniedrigt war, während sie nach einem positiven Ereignis, wie dem freiwilligen Laufen in einem Laufrad, signifikant erhöht war. Hierbei handelte es sich allerdings nur um eine Markierung proliferierender Zellen, die keinen Aufschluss über Differenzierung (Neurone oder Gliazellen) oder Überlebensrate gibt.

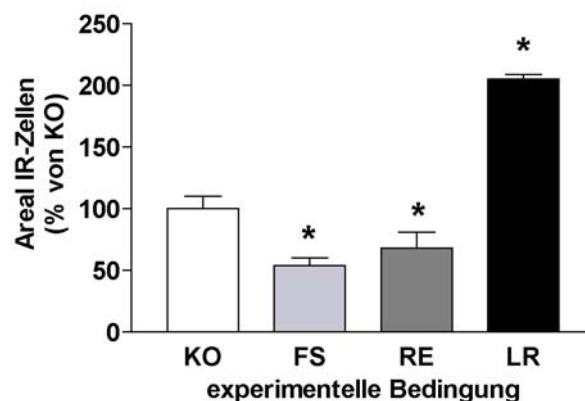


Abb. 29 Die Immunreaktivität ermittelt mit Hilfe des Proliferationsmarkers Ki-67 im Gyrus dentatus des Hippokampus. Dargestellt sind Arealmessungen von IR-Zellen 24 h nach akuten Stressparadigmen (FS = erzwungenes Schwimmen; RE = Predatorexposition), vierwöchiger Nutzung eines Laufrades (LR) und in Kontrolltieren (KO). Aufgetragen sind Mittelwerte ($n=5-6$) \pm SEM in %, im Vergleich zu KO (=100%). Es zeigte sich, dass Stress zu einer Verringerung und freiwilliges Laufen in einem Laufrad zu einem Anstieg der Proliferationsrate führten (*, $p<0.05$, Student's t-Test).

3.4 Schlafstudien

Es wurde untersucht, ob und wenn wie sich das Schlaf-Wach-Verhalten von Tieren, die über vier Wochen die Möglichkeit hatten freiwillig ein Laufrad zu benutzen, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe verändert. Dazu wurden Untersuchungen der verschiedenen Vigilanzstadien und der Schlafarchitektur unter Basalbedingungen und nach einer sozialen Konfliktsituation (*social defeat*) durchgeführt.

3.4.1 Schlaf- Wach-Verhalten unter Basalbedingungen

Für alle Vigilanzstadien wurde mit Hilfe der ANOVA ein signifikanter Effekt über die Zeit festgestellt ($p < 0.0001$). Beide Tiergruppen hatten die meiste Zeit der Hellphase im non-REM, pre-REM und REM-Schlaf verbracht, während sie in der Dunkelphase vorwiegend wach waren (Abb. 30). Für die Stadien Wachheit und non-REMS wurde ein signifikanter Effekt über Gruppe und Zeit festgestellt ($F_{11,176} = 3.2$, $p < 0.01$ und $F_{11,176} = 3.6$, $p < 0.006$). Dies deutet darauf hin, dass die Verteilung dieser Stadien über den Tag in beiden Gruppen unterschiedlich ist. Ein direkter Vergleich zeigte, dass die Tiere mit Zugang zu einem Laufrad signifikant mehr „Wachheit“ und weniger non-REMS zu Beginn der Dunkelphase (erstes 2 h-Intervall) aufwiesen. Ebenfalls wurde ein signifikanter Effekt zwischen den Gruppen bei den REMS beobachtet ($F_{1,16} = 4.8$, $p < 0.05$). Generell waren die REMS-Phasen etwas geringer in den LR-Mäusen als in den Kontrollen.

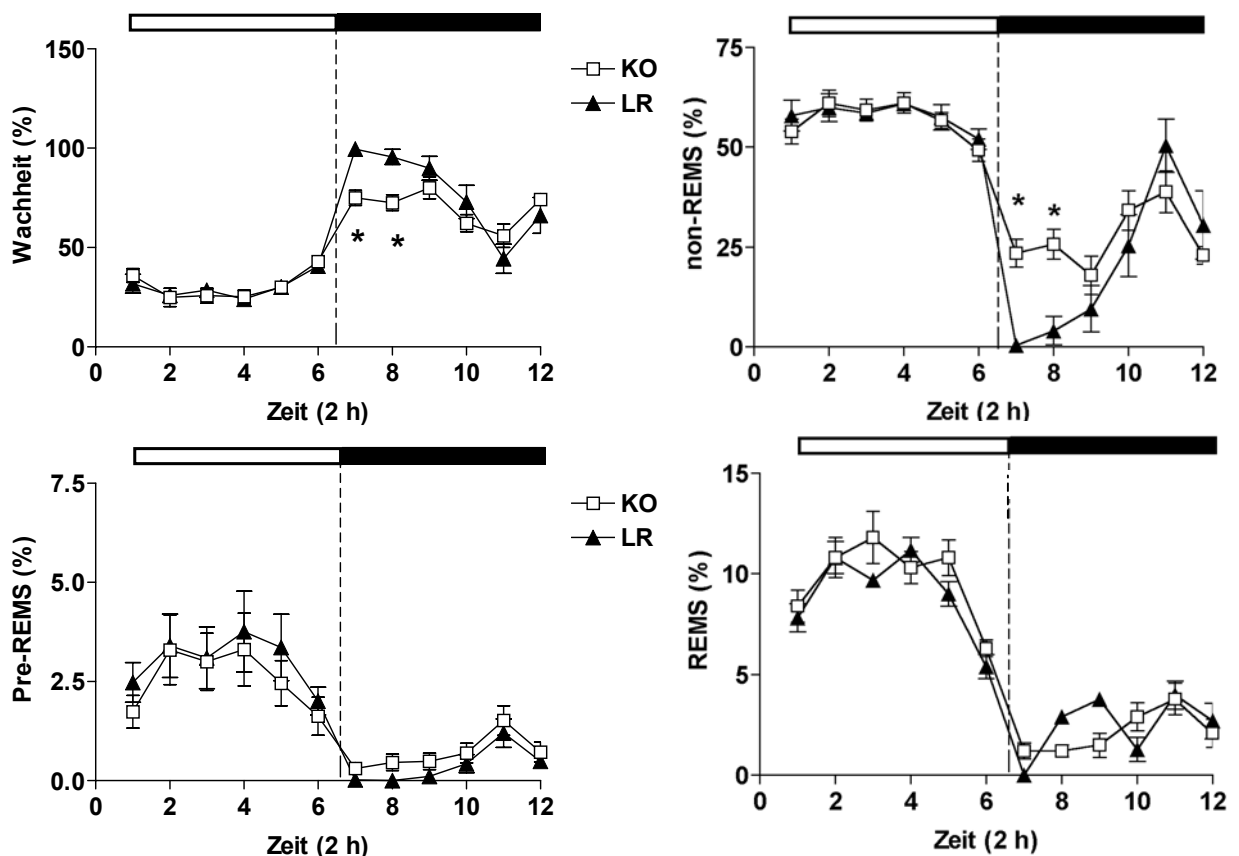


Abb. 30 Unterscheidung der einzelnen Vigilanzstadien von Mäusen mit und ohne Zugang zu einem Laufrad über 24 h unter Basalbedingungen. Dargestellt sind Mittelwerte (2 h-Intervalle, $n=9$ pro Gruppe) \pm SEM in Prozentangaben der Aufnahmezeit. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zeigte sich direkt nach Anbruch der Dunkelphase, in der die LR-Tiere wach waren, während die KO-Tiere im non-REMS verblieben (*, $p < 0.05$, Student's t-Test).

Eine Analyse der Schlafarchitektur zeigte einen signifikanten Effekt über Zeit und Gruppe für die Anzahl an non-REMS- und REMS-Episoden (non-REMS-Episoden: Zeit: $F_{1,16}=103.2$, $p<0.0001$ und Gruppe: $F_{1,16}=7.7$, $p<0.02$; REMS-Episoden: Zeit: $F_{1,16}=230.2$, $p<0.0001$ und Gruppe: $F_{1,16}=9.0$, $p<0.009$). Beide Gruppen zeigten mehr non-REMS-Episoden in der Hell- als in der Dunkelphase (Abb. 31). Unabhängig von der Tageszeit zeigten die LR-Tiere weniger non-REM- und REM-Schlafepisoden als die Kontrolltiere (Episoden über 24 h: non-REMS: 187.6 ± 18.6 vs. 248.6 ± 11.7 ; REMS: 70.2 ± 2.8 vs. 88.0 ± 5.3). Eine ANOVA-Analyse zeigte für die Dauer der non-REMS-Episoden einen signifikanten Effekt der Gruppe ($F_{1,16}=17.5$, $p<0.007$) und über die Zeit ($F_{1,16}=9.0$, $p<0.009$). Demnach hatten die LR-Mäuse längere non-REMS-Episoden sowohl in der Hell- als auch in der Dunkelphase, wo sie noch ausgeprägter waren, verglichen mit den Kontrollmäusen.

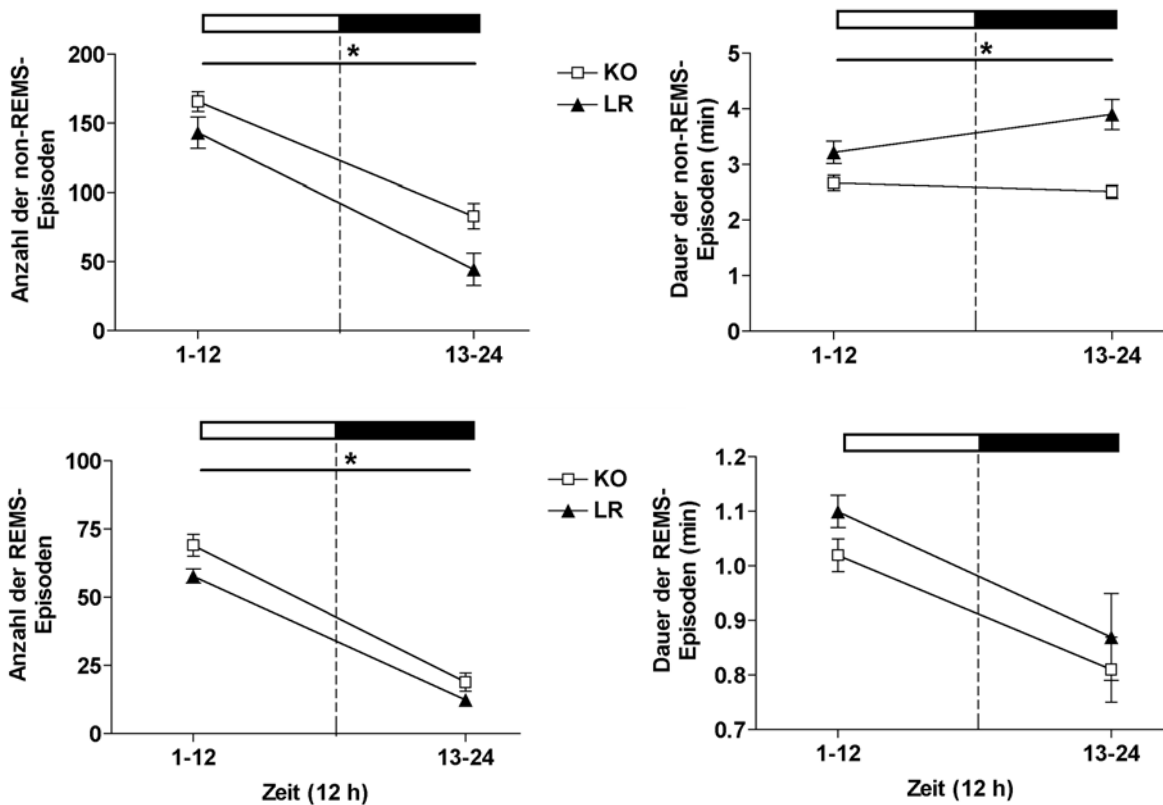
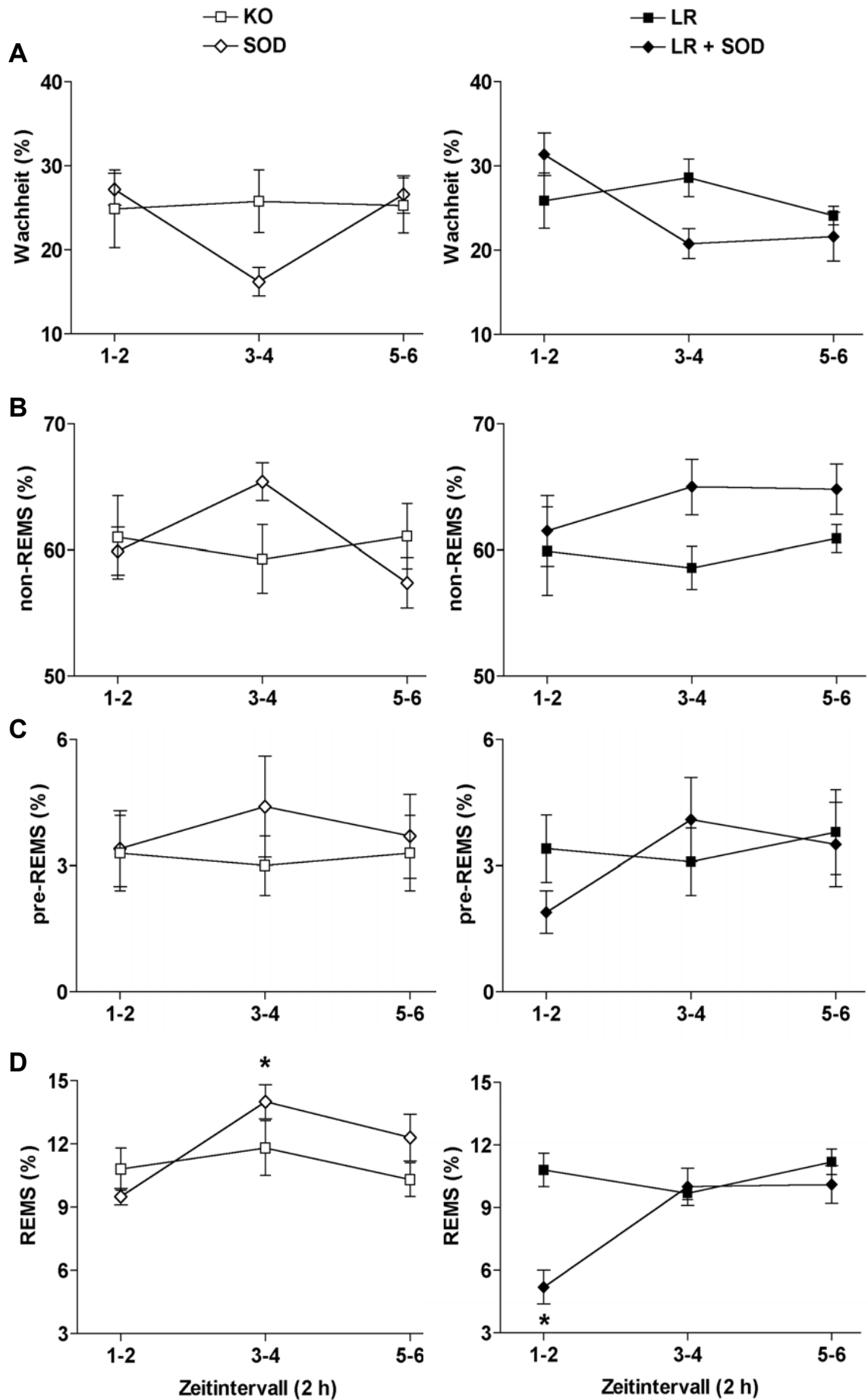


Abb. 31 Gesamtanzahl und durchschnittliche Dauer der non-REMS- und REMS-Episoden während der basalen Hell-/Dunkelphase in Mäusen mit oder ohne vierwöchigen Zugang zu einem Laufrad. Dargestellt sind Mittelwerte ($n=9$ pro Gruppe) \pm SEM. (*, $p<0.05$, signifikanter Effekt der Gruppe)

3.4.2 Schlaf- Wach-Verhalten nach einem sozialen Stress

Eine Analyse der Dauer, in der die Tiere in jedem Vigilanzstadium verweilt haben, ergab einen signifikanten Effekt des sozialen Stresses (*social defeat* = SOD) über die Zeit in Bezug auf „Wachheit“ ($F_{2,32}=5.3$, $p<0.02$; Abb. 32A). Dabei war es, unabhängig von der Gruppe, die Auswirkung des sozialen Konfliktes, der zu einer Verminderung der Wachheit im zweiten Zeitintervall (3-4 h, Abb. 32A) führte. Bei dem non-REM-Schlaf (Abb. 32B) gab es einen signifikanten Effekt der Behandlung ($F_{1,16}=4.4$, $p<0.05$), wobei im zweiten 2 h-Intervall deutlich wurde, dass eine soziale Auseinandersetzung zu einer leichten Erhöhung des non-REMS führte. Für den pre-REMS (Abb. 32C) war der Effekt der Behandlung über die Zeit signifikant ($F_{2,32}=5.3$, $p<0.02$), wobei es einen gruppenunabhängigen Anstieg während des zweiten 2 h-Intervalls gab. Eine Analyse des REMS (Abb. 32D) zeigte signifikante Effekte der Gruppe ($F_{1,16}=6.9$, $p<0.02$) und der Interaktion Gruppe mit Behandlung ($F_{1,16}=17.6$, $p<0.0007$), was bedeutet, dass dieses Schlafstadium durch die vorherige Nutzung eines Laufrades unterschiedlich beeinflusst wurde. Bei den Kontrolltieren war der REMS nach einem sozialen Konflikt erhöht, und dies besonders im zweiten 2 h-Intervall, während bei der LR-Gruppe eine generelle Erniedrigung des REMS zu beobachten war (8.5 ± 0.6 vs. 11.9 ± 0.6 , $p<0.002$).

Abb.32 Prozentangaben der Zeit, in der Tiere mit und ohne Zugang zu einem Laufrad in jedem Vigilanzstadium während den ersten 6 h nach einem sozialen Konflikt und während der vergleichbaren Basalphase verbrachten. Dargestellt sind Mittelwerte ($n=9$ pro Gruppe) \pm SEM. (*, $p<0.05$, Student's t-Test, Interaktion von Behandlung und Gruppe)



Die Verzögerung des non-REMS nach einer sozialen Auseinandersetzung zeigte statistisch gesehen keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen, allerdings tendierten die LR-Mäuse zu einer größeren Verzögerung des REMS (54.9 ± 7.3 vs. 3.6 ± 1.9 min, $p < 0.06$). Eine Analyse der totalen Anzahl und mittleren Dauer der Schlafepisodes während der ersten 6 h nach einem sozialen Konflikt und der korrespondierenden Baseline (s. Tab. 3) zeigte einen signifikanten Effekt der Gruppe für die non-REMS-Episodendauer ($F_{1,16} = 4.6$, $p < 0.05$). Generell zeigten die Mäuse mit Zugang zu einem Laufrad längere non-REMS-Episoden als die Kontrollgruppe. Die Anzahl an REMS-Episoden zeigte einen signifikanten Effekt der Gruppe ($F_{1,16} = 13.0$, $p < 0.003$) und der Interaktion Gruppe mit Behandlung ($F_{1,16} = 10.3$, $p < 0.006$). In der Kontrollgruppe hatte die soziale Konfliktsituation keinen Einfluss auf die REMS-Episoden, während sie bei den LR-Tieren zu einer signifikanten Erniedrigung führte. Letzen Endes zeigte auch die REMS-Episodendauer einen signifikanten Effekt der Gruppe ($F_{1,16} = 4.7$, $p < 0.05$), was einen Behandlungs-unabhängigen Trend in Richtung längere REMS-Episoden in den LR-Mäusen andeutet (Tab. 3).

	Kontrolle		Laufrad	
	Baseline	Sozialer Stress	Baseline	Sozialer Stress
non-REMS				
Episodenanzahl	83.8 ± 12.0	83.1 ± 15.9	71.2 ± 18.3	74.8 ± 9.5
Episodendauer (min)	2.79 ± 0.51	2.93 ± 0.58	3.40 ± 0.67	3.32 ± 0.49
REMS				
Episodenanzahl	37.9 ± 7.8	40.8 ± 6.8	33.0 ± 4.4	$25.9 \pm 7.3^{* \#}$
Episodendauer (min)	1.05 ± 0.13	1.05 ± 0.10	1.14 ± 0.11	1.15 ± 0.16

Tab.3 Non-REMS- und REM-Schlaf-Episodenanzahl und –dauer unter basalen Bedingungen und nach einer sozialen Konfliktsituation. Aufgetragen sind Mittelwerte \pm SEM (n=9). (*, $p < 0.05$, Student's t-Test, signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppe zwischen Baseline und sozialem Stress; #, $p < 0.05$, Student's t-Test, signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen)

Eine ANOVA-Untersuchung der SWA (*slow wave activity*) während des non-REMS zeigte einen signifikanten Effekt der Zeit ($F_{2,32}=11.3$, $p<0.0005$). Unabhängig von der Gruppe der Tiere fiel die SWA über den Zeitraum der Basalphase stetig ab. Der Abfall war nach einem sozialen Konflikt noch ausgeprägter (s. Abb. 33).

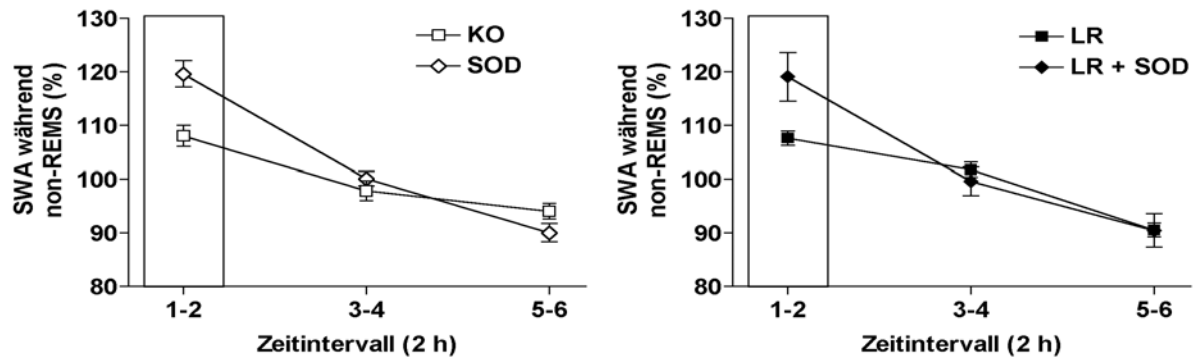


Abb. 33 *Slow wave activity* während des non-REMS in den ersten 6 h nach einem sozialen Konflikt und unter Basalbedingungen in Mäusen, die ein Laufrad zur freiwilligen Verfügung hatten im Vergleich zu Kontrolltieren (n=9 pro Gruppe). Die Daten sind als Prozentangabe (Mittelwert \pm SEM) über den Durchschnitt der SWA während des non-REMS während der 6stündigen Basalphase dargestellt. Die eingekastete Region zeigt einen signifikanten Unterschied der Behandlung der beiden Gruppen an.

3.5 Vergleich zu Antidepressiva-Gabe unter Basalbedingungen

Da aus der Literatur bekannt ist, dass ausdauernde körperliche Aktivität neben einem positiven Einfluss auf physiologischer Ebene auch einen positiven Einfluss auf psychologischer Ebene ausübt, und ihr sogar anxiolytische und antidepressive Wirkungen zugesprochen werden, wurde ein Vergleich von Antidepressiva Medikation (AD) und Benutzung eines Laufrades durchgeführt. Untersucht wurden verschiedene physiologische Parameter, die HPA-Achse unter Ruhebedingungen und das CRH/Urocortin-System. Des Weiteren wird auch davon berichtet, dass die Kombination aus beiden (LR + AD) einen noch deutlicheren Effekt ausübt (Russo-Neustadt et al., 1999), weshalb auch diese Kombination untersucht wurde.

3.5.1 Allgemeine physiologische Parameter

Auf Ebene des Laufverhaltens zeigte sich, dass die Gabe von Tianeptin, einem SSRE-Antidepressivum, einen Effekt auf die Laufaktivität ausübt. Nach Auftrennung der Daten in Intervalle (4 d bzw. 3 d beim letzten) zeigte sich ein Zeiteffekt (Effekt Zeit: $F_{6,54}=4$, $P=0.02$, s. Abb. 34) und, dass die Tiere mit Medikation nach einer

Eingewöhnungsphase (in der beide Gruppen vergleichbare Distanzen zurücklegten) signifikant weitere Strecken liefen, als die Tiere ohne Medikation (Effekt AD: $F_{1,9}=7.5$, $P<0.03$, s. Abb. 34). Auf Abbildung 35 ist der Zeitverlauf des Flüssigkeitskonsums von Kontrolltieren (KO), LR-Tieren (LR), Antidepressiva behandelten Tieren (AD) und der Kombination Laufrad und Antidepressiva (LR + AD) aufgetragen. Die Trinkmengen wurden einmal wöchentlich über einen Zeitraum von 24 h bestimmt, da das Antidepressivum täglich neu angesetzt wurde.

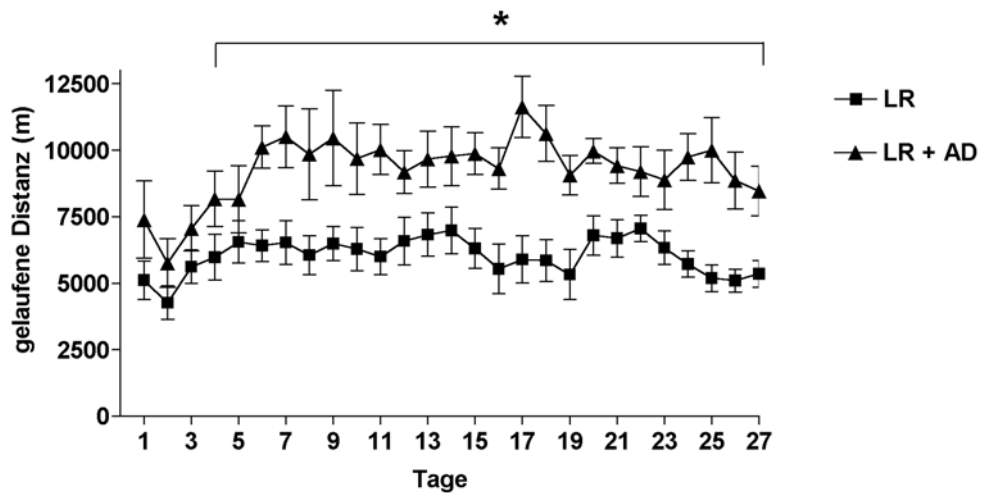


Abb. 34 Das Laufverhalten von Einzeltieren mit und ohne Antidepressiva Behandlung aufgeteilt auf Tage über einen Zeitraum von vier Wochen. Dargestellt ist der Mittelwert (LR, n = 6; LR + AD, n=5) ± SEM pro Tag (*, $p<0.05$ post-hoc Bonferroni).

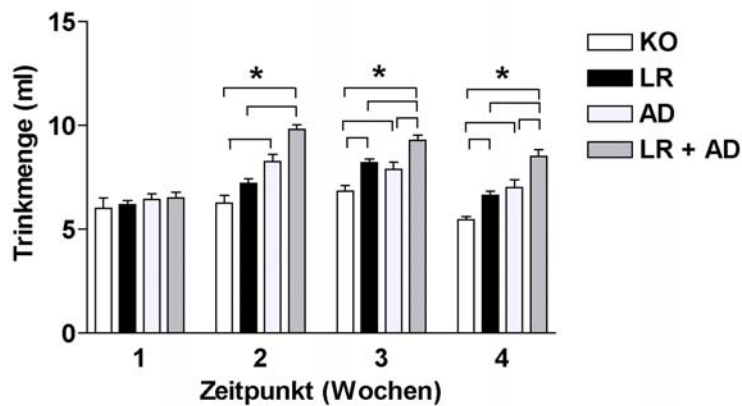


Abb. 35 Der Vergleich von Flüssigkeitsaufnahme (MW ± SEM) in C57BL/6N Mäusen mit (LR, n=10) und ohne (KO, n=10) Zugang zu einem Laufrad, und mit Antidepressiva-Gabe (AD, LR + AD, n=10) über einen Zeitraum von vier Wochen. Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen, die ein LR zur Verfügung hatten und den beiden Gruppen ohne Zugang ab der 2. Woche festgestellt. Ab der 3. Woche war auch die AD-Gruppe signifikant unterschiedlich von der KO-Gruppe. Die ANOVA Analyse ist dem Text zu entnehmen (*, $p<0.05$ post-hoc Bonferroni).

Die Futtermenge ist aufgrund eines Messfehlers nicht ausgewertet worden. Der Vergleich des Trinkverhaltens der Tiere ergab einen Effekt sowohl durch das Laufrad als auch durch die Antidepressiva-Gabe, aber keine Interaktion der beiden Bedingungen (Effekt LR: $F_{1,36}=25.5$, $P<0.0001$; Effekt AD: $F_{1,36}=29.6$, $P<0.0001$; Abb. 35). Es zeigte sich, dass die LR, AD und LR + AD Tiere einen erhöhten Flüssigkeitskonsum hatten, welcher ab der zweiten Woche signifikant unterschiedlich für die AD und die AD + LR Tiere, und ab der dritten Woche auch für die LR-Tiere zu dem Konsum der Kontrollgruppe war.

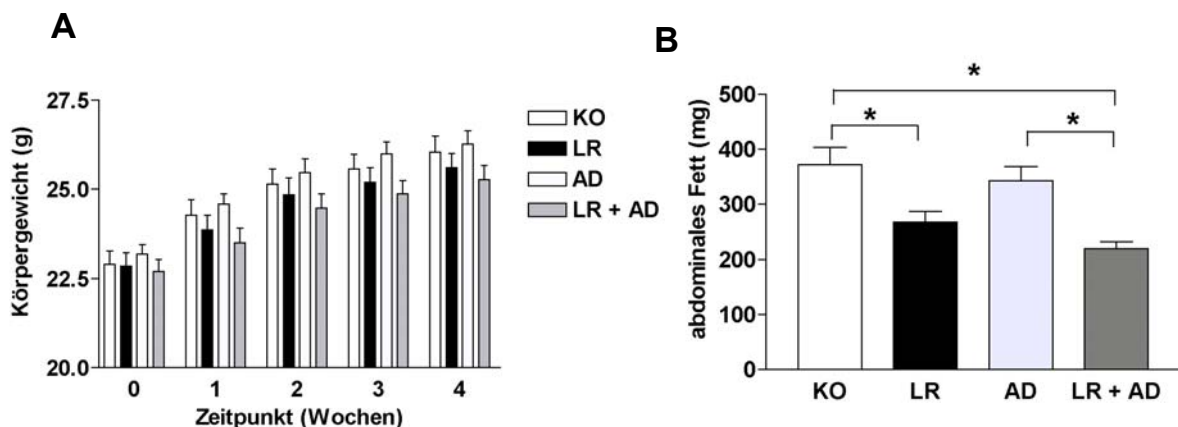


Abb. 36 Der Effekt von freiem Zugang zu einem Laufrad und/oder Antidepressiva-Behandlung über einen Zeitraum von vier Wochen auf A) den Zeitverlauf des Gesamtgewichtes ($n=10$) und B) das Gewicht des abdominalen Bauchfettgewebes ($MW \pm SEM$) in C57BL/6N Mäusen ($n=10$). Nach vier Wochen zeigte sich ein Zeiteffekt, aber kein Unterschied zwischen den vier Gruppen in Bezug auf das Gesamtgewicht, aber die Mäuse mit LR hatten signifikant weniger abdominales Fettgewebe als die ohne LR. AD übte keinen Effekt aus (*, $p<0.05$, ANOVA post-hoc Bonferroni).

Wie in Abbildung 36A dargestellt, nahmen alle vier Gruppen in der vierwöchigen Testperiode an Gewicht zu (Zeiteffekt: $F_{4,144}=338.4$, $p<0.0001$), allerdings gab es keinen Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (Effekt LR: $F_{1,36}=2.9$, $p>0.05$; Effekt AD: $F_{1,36}=0$, $p>0.05$). Am Ende des vierwöchigen Untersuchungszeitraumes zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen auf Ebene der Körperzusammensetzung. Die Tiere, die ein Laufrad zur freien Verfügung hatten (LR; LR + AD), zeigten signifikant weniger abdominales Fettgewebe als die Kontrolltiere bzw. die Tiere, die nur mit Antidepressiva behandelt wurden (Abb. 36B; Effekt LR: $F_{1,36}=23.6$, $p<0.0001$; Effekt AD: $F_{1,36}=2.7$, $p>0.05$; Interaktion LR + AD: $F_{1,36}=0.2$, $p>0.05$).

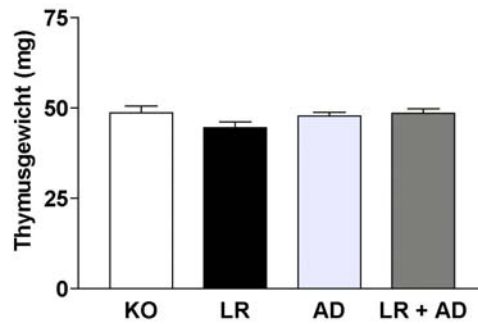


Abb. 37 Effekt von vierwöchigem freien Zugang zu einem Laufrad und/oder Antidepressiva-Medikation auf das Thymusgewicht (n=10) in C57BL/6N Mäusen. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den vier Gruppen.

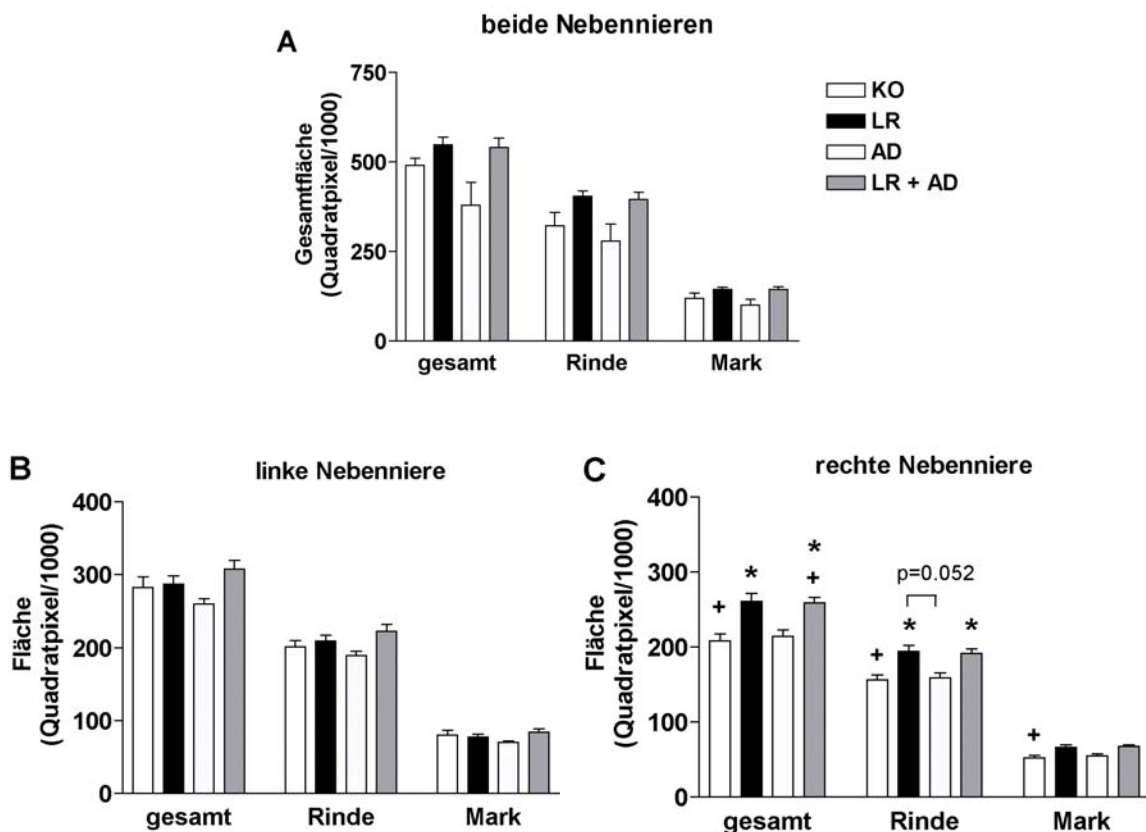


Abb. 38 Vergleich der Größe von rechter und linker Nebenniere in Tieren, die 4 Wochen die Möglichkeit hatten ein Laufrad zu benutzen, eine Antidepressiva-Behandlung bekamen, eine Kombination aus Laufrad/Antidepressiva erhielten und Kontrolltieren. Es sind quantitative Flächenmessungen der beiden (links + rechts) Nebennierenoberflächen, und die Unterscheidung der Nebennieren in totale Fläche, Nebennierenrinden- und Nebennierenmarksfläche dargestellt (MW ± SEM, n=10). (*, p<0.05, post-hoc Bonferroni, Vergleich KO vs. LR; +, p<0.05, Vergleich links vs. rechts innerhalb der gleichen Gruppe für „Total“, „Rinde“ und „Mark“)

Wie in Abbildung 37 dargestellt, resultiert vierwöchiges freiwilliges Benutzen eines Laufrades oder/und die Gabe eines Antidepressivums in keinem Unterschied des Thymusgewichtes im Vergleich zu Kontrolltieren. Die fehlende Bestätigung der verkleinerten Thymi, wie sie nach Laufradbenutzung gefunden wurde (s. 3.1.2), liegt wahrscheinlich an der geringeren n-Zahl, die hier verwendet wurde. Um zu untersuchen, ob es Veränderungen in der Zusammensetzung der Nebennieren gab (s. Abb. 38), wurden histologische Untersuchungen der Morphologie anhand angefärbter Gefrierschnitte durchgeführt. Es zeigte sich, dass vierwöchiges Benutzen eines Laufrades zu Veränderungen auf Ebene der Zusammensetzung führte, das Antidepressivum aber keinen Einfluss ausübte (Effekt LR: $F_{1,65}=24.9$, $p<0.0001$). Anhand von Messungen der Größe der jeweiligen Fläche zeigte sich, dass sowohl die Nebennierenrinde, als auch das Nebennierenmark in den Mäusen, die ein Laufrad zur freien Verfügung hatten (LR und LR + AD) signifikant vergrößert war, verglichen mit Kontrolltieren oder nur mit Antidepressiva behandelten Tieren (Rinde: Effekt LR: $F_{1,65}=10.6$, $p=0.02$, Mark: Effekt LR: $F_{1,65}=27.1$, $p<0.0001$; Abb. 38A). Den deutlichsten Unterschied ergab eine Trennung der Nebennieren in linke und rechte, wobei die linke die größere war. Dieser Größenunterschied zwischen der linken und rechten Nebenniere, der bei den Kontrolltieren deutlich ausgeprägt war, hob sich bei den LR und LR + AD-Tieren dadurch auf, dass die „kleinere“ sich der „größeren“ angepasst hatte (Abb. 38B + C). Generell ist die Vergrößerung der rechten Nebenniere der LR-benutzenden Tiere durch eine signifikante Vergrößerung der Rinde abzuleiten. Der Vergleich zu den AD-Tieren zeigte lediglich einen Trend.

3.5.2 Expression von Tyrosinhydroxylase mRNA im Nebennierenmark und dem Locus coeruleus

Tyrosinhydroxylase (TH) ist das limitierende Enzym der Noradrenalin- und Adrenalinsynthese. Um den Einfluss auf die Katecholamine in den Nebennieren und im Gehirn zu untersuchen, wurde die Menge an TH mRNA im Nebennierenmark und dem Locus coeruleus (LC), einem der wichtigsten Bildungsorte von Noradrenalin im Gehirn, gemessen. Es zeigte sich im Nebennierenmark, dass die Benutzung eines Laufrades zu einem signifikanten Anstieg führte (Effekt LR: $F_{1,35}=22.8$, $p<0.0001$, Abb. 39A). Antidepressiva-Gabe übte kein Effekt aus, und es wurde auch keine Interaktion von LR + AD festgestellt.

Es zeigte sich, dass die freiwillige Benutzung eines Laufrades über einen Zeitraum von vier Wochen zu einem signifikanten Anstieg der TH mRNA-Expression im LC führte (Effekt LR: $F_{1,22}=6.3$, $p=0.02$, Abb. 39B). Es wurde kein Effekt von Antidepressiva und keine Interaktion von LR + AD festgestellt.

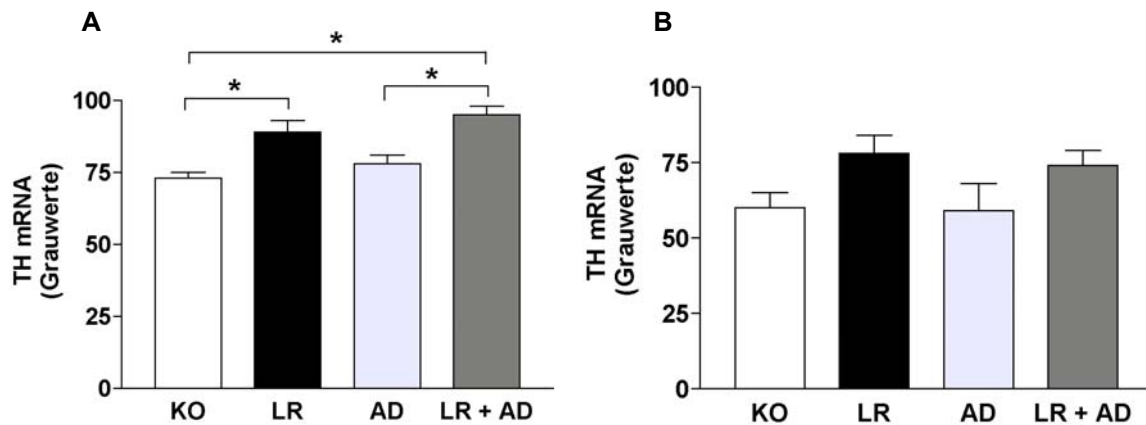


Abb. 39 Veränderungen der Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA-Expression in A) dem Nebennierenmark und B) dem Locus coeruleus bei Tieren, die einen freien Zugang zu einem Laufrad und/oder Antidepressiva-Behandlung über einen Zeitraum von vier Wochen hatten und Kontrolltieren (Nebennieren: $n=9-10$, Locus coeruleus: $n=5-8$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (*, $p<0.05$, post-hoc Bonferroni).

3.5.3 Neuroendokrine Parameter

Um Modifikationen des basalen Status der HPA-Achse infolge von vierwöchigem freiwilligen Benutzen eines Laufrades oder/und Antidepressiva-Behandlung in der Maus zu charakterisieren, wurden die ACTH- und Corticosteron-Plasmagehalte der vier Gruppen ermittelt (Abb. 40). Es zeigte sich, dass kein Unterschied bei den ACTH-Konzentrationen zwischen den einzelnen Gruppen zu finden war (Abb. 40A). Bei den Corticosteron-Plasmakonzentrationen zeigte sich ein Effekt des Laufrades (Effekt LR: $F_{1,33}=7.6$, $p=0.01$). Sowohl Antidepressiva-Gabe, als auch die Interaktion von LR + AD ergaben keinen Effekt. Der Vergleich der einzelnen Gruppen miteinander ergab eine signifikante Erniedrigung der Kombination von LR + AD gegenüber den Kontrolltieren ($p<0.04$, post-hoc Bonferroni Test; Abb. 40B).

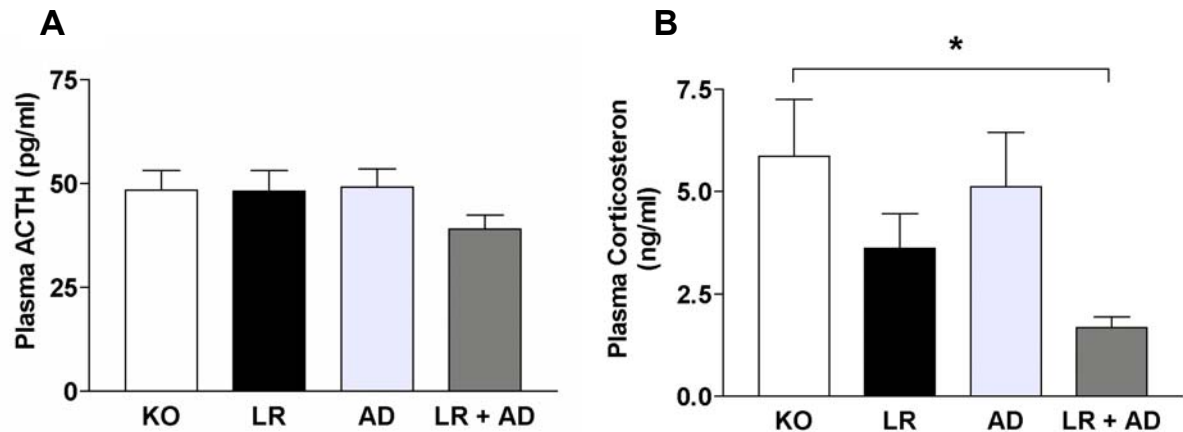


Abb. 40 Die Plasmakonzentrationen von A) ACTH und B) Corticosteron in Mäusen, die unter morgendlichen Ruhebedingungen getötet wurden. Die Tiere hatten einen freien Zugang zu einem Laufrad und/oder Antidepressiva-Behandlung über einen Zeitraum von vier Wochen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n=10$ für alle Gruppen; *, $p<0.05$, post-hoc Bonferroni).

3.5.4 Expression verschiedener mRNAs des CRH-Rezeptor-Systems

Auf der molekularen Ebene wurden verschiedene mRNA-Konzentrationen im Gehirn unter Basalbedingungen untersucht (s. Tab. 4). Eine ANOVA-Analyse ergab, dass die CRH mRNA-Konzentration im PVN nach freiwilliger Benutzung eines Laufrades signifikant erniedrigt war (Effekt LR: $F_{1,16}=13.1$, $p=0.02$). Antidepressiva-Gabe übte keinen Effekt aus, und es ergab sich auch keine Interaktion. Der Vergleich der einzelnen Gruppen miteinander ergab einen signifikanten Unterschied von KO zu LR ($p<0.05$) und einen Trend von KO zu LR + AD ($p=0.053$). Auf Ebene der CRH-Rezeptoren 1 und 2 zeigte sich in den untersuchten Regionen (R1: Hippokampus und R2: laterales Septum) keine Veränderungen durch die Gabe eines Laufrades und/oder Antidepressiva. Des Weiteren wurde Urocortin in seinem Hauptbildungsort, dem Edinger-Westphalkern, untersucht, und es zeigte sich ebenfalls kein Effekt der Behandlung und/oder der Bereitstellung eines Laufrades. UCN II und UCN III wurde ebenfalls in diesen Tieren untersucht, allerdings war das Signal zu schwach, um eine Aussage treffen zu können. Hier sind weitere Untersuchungen von Bedarf.

mRNA	Region	KO	LR	AD	LR + AD
CRH	PVN	110 ± 3	94 ± 3*	105 ± 2	95 ± 5*
CRH-R1	Hippokampus	77 ± 4	72 ± 3	80 ± 3	80 ± 5
CRH-R1	PVN	unter Detektionslimit			
CRH-R2	Laterales Septum	22 ± 2	20 ± 1	25 ± 1	26 ± 2
CRH-R2	PVN	unter Detektionslimit			
UCN	Edinger-Westphal	110 ± 3	112 ± 4	110 ± 5	114 ± 3
UCN II	PVN	unter Detektionslimit			
UCN III	PVN	unter Detektionslimit			

Tab. 4 CRH, CRH-R1, CRH-R2, UCN, UCN II und UCN III mRNA-Konzentrationen in verschiedenen Hirnregionen von Mäusen, die vier Wochen die Möglichkeit hatten ein Laufrad zu benutzen, vier Wochen mit Antidepressiva behandelt wurden, vier Wochen mit einer Kombination aus Laufrad und Antidepressiva behandelt wurden und Kontrolltieren. Die mRNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung und einer semi-quantitativen Messung der Grauwerte von digitalisierten Autoradiographie-Bildern bestimmt (für Details siehe 2.6). Die Daten sind als Netto-Grauwert dargestellt. (Mittelwert ± SEM, n=5-8; *, p<0.05 vs. KO post-hoc Bonferroni).

3.6 Verhaltensstudien

Da die Benutzung des Laufrades bei Mäusen einen großen Einfluss von der molekularen und zellulären bis auf die schlafphysiologische Ebene zeigte, war es von großem Interesse mittels einer ethologischen Verhaltenscharakterisierung die Emotionalität und die Verhaltensstrategien dieser Tiere zu untersuchen. C57BL/6N Mäuse hatten vier Wochen lang die Möglichkeit ein Laufrad freiwillig zu benutzen. Anschließend wurden verschiedene validierte Verhaltenstests durchgeführt. Als erstes wurde eine umfassende Verhaltensphänotypisierung der Tiere im zehn Minuten andauernden *modified hole board* (mHb) Test durchgeführt. Dieser Test ist eine Kombination aus *hole board* und *open field*, und ermöglicht die Messung einer Vielzahl von Verhaltensparametern (zum Beispiel Angst, Lokomotion, Exploration) sowie ihrer Interaktionen. Zur weiteren Untersuchung des Angstverhaltens der Tiere wurden zwei starke selektive Angsttests (*elevated plus-maze* und *dark/light box*) und ein weiterer Test zur Exploration (*open field*) durchgeführt. Eine neue Gruppe von Tieren wurde für fünf Minuten im *elevated plus-maze* (EPM) untersucht, und eine weitere Gruppe von Tieren wurde einer Untersuchung in der *dark/light box* (5 min) unterzogen und 7 Tage später für dreißig Minuten im *open field* getestet. Das *open field* wurde durch eine kognitive Komponente erweitert und enthielt einen bekannten und einen unbekanntem Stimulus.

3.6.1 Modified hole board

Die Ergebnisse aus dem *modified hole board* (s. Abb. 41) zeigten, dass die Latenz bis zum ersten Betreten des Boards bei den LR-Tieren signifikant erhöht ($p < 0.01$, Student's t-Test) und die Anzahl der Linienübertritte bei den LR-Tieren signifikant niedriger war ($p < 0.05$, Student's t-Test) als bei der Kontrollgruppe. Ebenfalls erhöht war die Anzahl an durchgestreckter Körperhaltung (*stretched attends*, $p < 0.01$, Student's t-Test). Dagegen war das Aufrichten auf dem Board (*rearings*) bei den LR-Tieren signifikant erhöht ($p < 0.05$, Student's t-Test). Ein Trend zeigte sich bei der Latenz bis zur ersten Lochexploration ($p = 0.05$, Student's t-Test) und der Anzahl an Lochexplorationen ($p = 0.05$, Student's t-Test). Die Unterschiede in den ermittelten Parametern Latenz bis zum ersten Linienübertritt ($p < 0.2$), Zeit auf dem Board ($p < 0.24$), Anzahl der Eintritte auf dem Board ($p < 0.19$), Latenz bis zur Erstexploration des bekannten ($p < 0.8$) sowie unbekanntem Futters ($p < 0.4$) und Latenz bis zum ersten Putzen ($p < 0.35$) erreichten keine signifikanten Niveaus. Ebenfalls zeigten sich

keine Unterschiede in den Plasmakonzentrationen von ACTH ($215.9 \text{ pg/ml} \pm 28.7$ vs. $234.1 \text{ pg/ml} \pm 21.4$) und Corticosteron ($159.1 \text{ ng/ml} \pm 14.8$ vs. $176.1 \text{ ng/ml} \pm 21$).

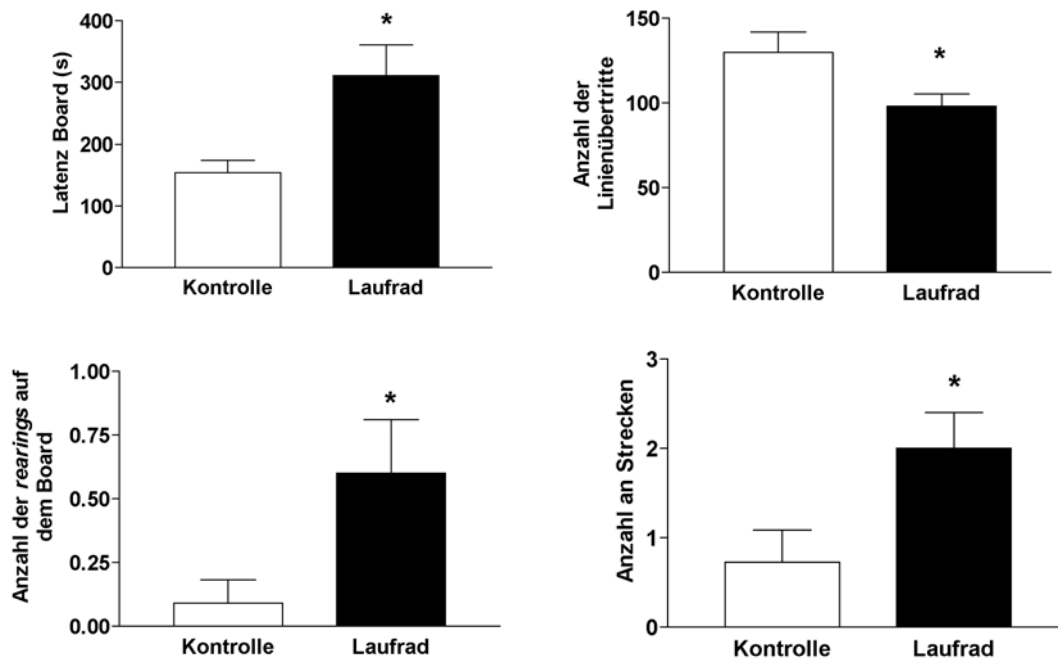


Abb. 41 *Modified hole board*. Verschiedene signifikant unterschiedliche Parameter (dargestellt als Mittelwert \pm SEM) des Verhaltens von Mäusen, die vier Wochen lang ein Laufrad zur freien Verfügung hatten und vergleichbaren Kontrolltieren ($n=9$) im *modified hole board* (*, $p<0.05$, Student's t-Test). Details sind dem Text zu entnehmen.

3.6.2 Elevated plus-maze

Der *elevated plus-maze* (EPM)-Test (s. Abb. 42) ergab, dass die LR-Tiere sich im Vergleich zu den Kontrollen signifikant länger auf dem offenen Arm ($p<0.03$, Student's t-Test) und deutlich weniger auf dem geschlossenen Arm ($p<0.01$, Student's t-Test) aufhielten (Fig. 29A). Dagegen wurden keine Unterschiede bei der Zeit, welche die Tiere auf der Plattform, dem Mittelpunkt des Kreuzes ($p<0.77$), und mit der Endexploration des offenen Armes ($p<0.67$) verbrachten, gefunden. Die Kontrolltiere zeigten signifikant mehr Eintritte in den geschlossenen Arm im Vergleich zu den LR-Tieren ($p<0.005$, Student's t-Test), keine Unterschied zeigten sich bei der Anzahl der Eintritte in den offenen Arm ($p<0.76$) oder in die Plattform ($p<0.06$). Beim Explorationsverhalten zeigte sich, dass die Kontrolltiere signifikant mehr Aufrichtbewegungen (*rearings*) im geschlossenen Arm durchführten ($p<0.004$, Student's t-Test). Es konnte kein Unterschied in der Häufigkeit des Putzens ($p<0.68$), sowie bei der Anzahl der Kotbällchen ($p<0.09$) ermittelt werden. Die Parameter des

Kopfstreckens (*headdips*, $p < 0.16$) und des Risikoabschätzungsverhaltens ($p < 0.32$) waren ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich.

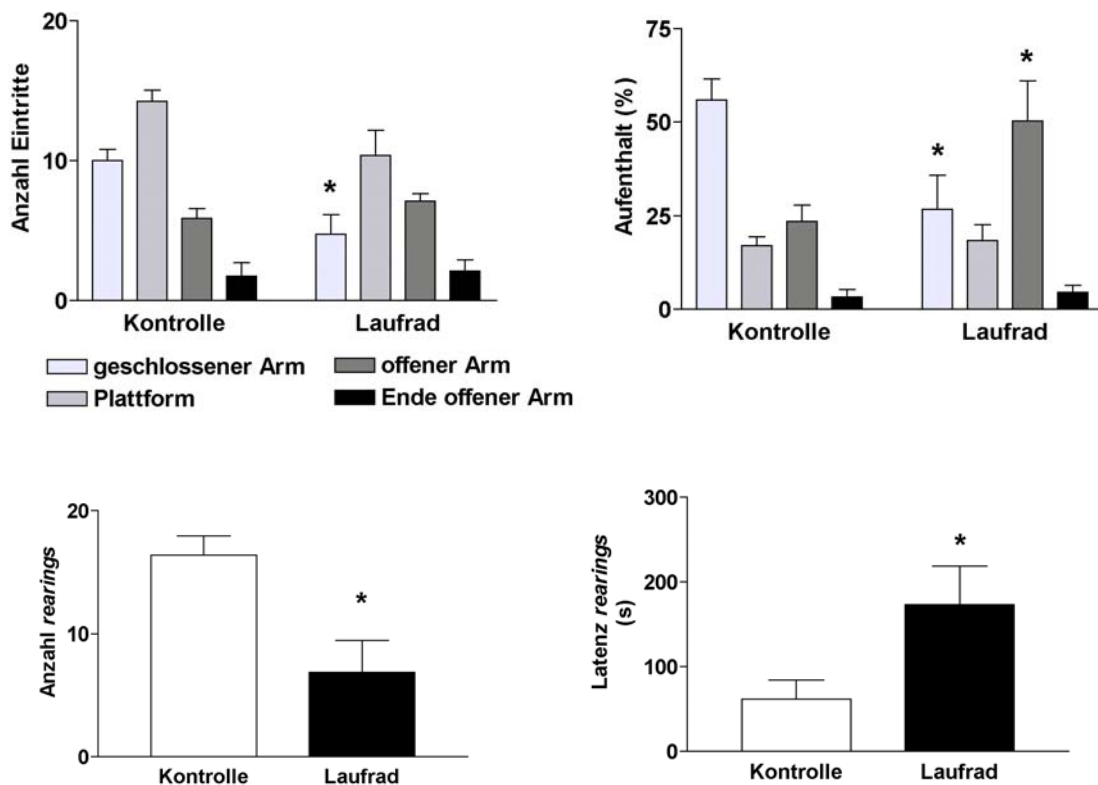


Abb. 42 *Elevated plus-maze*. Verschiedene Parameter (dargestellt als Mittelwert \pm SEM) des Verhaltens von Mäusen, die vier Wochen lang ein LaufRAD zur freien Verfügung hatten ($n=9$) und vergleichbaren Kontrolltieren ($n=9$) auf der *elevated plus-maze*. Die LR-Tiere zeigten ein angstreduziertes Verhalten im Vergleich zu den KO-Tieren (*, $p < 0.05$, Student's t-Test). Details sind dem Text zu entnehmen.

3.6.3 Dark/light box

Als zweiter Test, um das angstbezogene Verhalten der Tiere zu untersuchen, wurde ein Hell/Dunkel Kompartiment-Test (*dark/light box*) durchgeführt (s. Abb. 43). Signifikante Unterschiede wurden bei der Anzahl der Eintritte in den Tunnel ($p=0.035$, Student's t-Test) und in das helle Kompartiment ($p=0.025$, Student's t-Test) gefunden, eine Tendenz bei den Eintritten in das dunkle Kompartiment ($p < 0.07$, Student's t-Test). Die Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in das helle Kompartiment und der Endexploration des hellen Kompartiments war in den LR signifikant niedriger (Eintritt hell: $p < 0.03$; Ende: $p < 0.02$). Die generelle Aufenthaltszeit in einem der Kompartimente war am deutlichsten unterschiedlich zwischen den

beiden Gruppen (Fig. 30C). Während sich die Kontrolltiere bevorzugt im dunkleren Bereich aufhielten ($p < 0.0001$, Student's t-Test), waren die LR-Tiere signifikant länger im hellen Bereich ($p < 0.002$, Student's t-Test), in dem die LR-Tiere auch deutlich mehr Aufrichtbewegungen vollführten ($p < 0.01$, Student's t-Test).

Keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen zeigten sich in der Latenz bis Erkundung des Übergangsbereichs (Tunnel; $p < 0.56$), der Aufenthaltszeit im Tunnel ($p < 1$), der Anzahl der Eintritte in das dunkle Kompartiment ($p < 0.07$) und der Aufrichtbewegungen im dunklen Kompartiment ($p < 0.45$). Ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich war die Anzahl der Endexploration des hellen Kompartiments ($p < 0.08$) und die Aufenthaltszeit am Ende des hellen Kompartiments ($p < 0.15$).

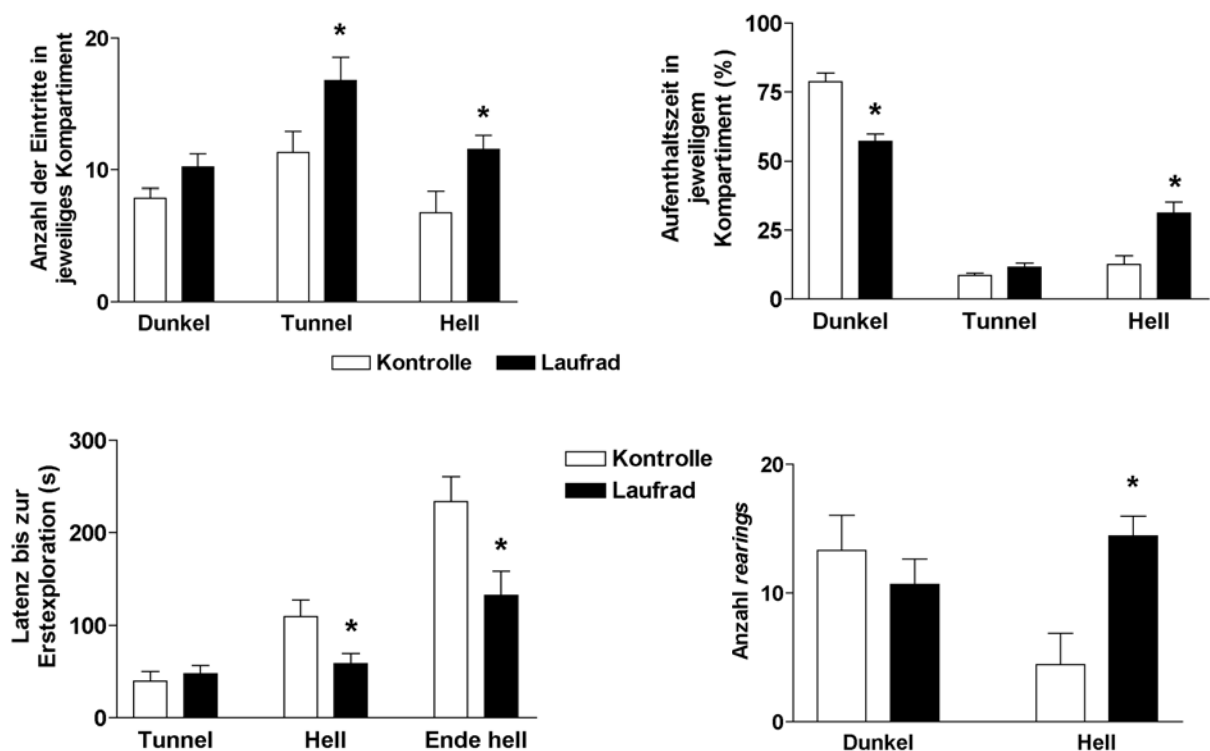


Abb. 43 *Dark/light box*. Verschiedene Parameter (dargestellt als Mittelwert \pm SEM) des Verhaltens von Mäusen, die vier Wochen lang ein Laufрад zur freien Verfügung hatten und vergleichbaren Kontrolltieren in der *dark/light box* ($n=9$ für beide Gruppen). Die LR-Tiere zeigten ein angstreduziertes Verhalten. Sie explorierten das helle Kompartiment schneller und ausdauernder als die KO-Tiere (*, $p < 0.05$, Student's t-Test).

3.6.4 Open field

Im dreißigminütigen *open field*-Test (s. Abb. 44) zeigte sich, dass die beiden Tiergruppen ein unterschiedliches Habitationsverhalten aufwiesen. Die Kontrolltiere waren in den ersten zehn Minuten leicht aktiver (gelaufene Distanz 3516 ± 267 cm vs. 2900 ± 255 cm) und explorierten häufiger das Zentrum in diesem Zeitintervall

($p < 0.05$, post-hoc LSD) und über den gesamten 30minütigen Zeitraum ($F_{2,32} = 3.53$, $p = 0.04$). Dies ist auch an den als Beispiele dargestellten Explorationspfaden (s. Abb. 45) ersichtlich. Diese höhere Aktivität zeigte sich ebenfalls in den gemessenen Latenzen. Die Latenzen bis zur Erstexploration des Zentrums ($p = 0.02$, Student's t-Test), der Erstexploration des bekannten ($p < 0.03$, Student's t-Test) und des unbekanntes ($p < 0.03$, Student's t-Test) Stimulus waren in den LR-Tieren signifikant höher als in den Kontrolltieren. Zum Zeitpunkt zwanzig Minuten fiel die Aktivität der Kontrolltiere ab, während die LR-Tiere aktiver waren, was allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen ergab (s. Abb. 44). Nach dreißig Minuten zeigte sich, dass beide Tiergruppen vergleichbare Werte in allen Parametern aufwiesen. Die Analyse der einzelnen Zeitintervalle ergab, dass die KO-Tiere sich im letzten Intervall (20-30 min) signifikant länger im Zentrum (% Aufenthaltszeit) als im zweiten Intervall aufhielten ($p < 0.03$). Im Gegensatz dazu verbrachten die LR-Tiere im ersten Intervall signifikant weniger Zeit im Zentrum als im zweiten ($p < 0.01$, post-hoc LSD) und im dritten Intervall ($p < 0.05$, post-hoc LSD). Dies lässt sich anhand der Explorationspfade (s. Abb. 45) verdeutlichen. Es ist jeweils ein repräsentatives Tier pro Gruppe dargestellt, und es zeigte sich, dass die KO-Tiere in den ersten 10 min aktiver waren und das Zentrum häufiger aufsuchten als die LR-Tiere. Im zweiten Zeitintervall kehrt sich das Bild leicht um, die LR-Tiere waren aktiver. Im dritten Zeitintervall haben sich beide Tiergruppen adaptiert, und es ist kein Unterschied mehr zwischen ihnen ersichtlich.

Des Weiteren wurden die Parameter Gesamt-Anzahl der Eintritte ($F_{1,16} = 0.2$, $p > 0.05$) und Aufenthaltszeit im Zentrum ($F_{1,16} = 0.4$, $p > 0.05$), die Anzahl und Aufenthaltszeit an einem bekannten Stimulus ($F_{1,16} = 0$, $p > 0.05$, $F_{1,16} = 0.9$, $p > 0.05$) und unbekanntes Stimulus ($F_{1,16} = 0$, $p > 0.05$, $F_{1,16} = 0$, $p > 0.05$), die zurückgelegte Distanz ($F_{1,16} = 2.1$, $p > 0.05$, $F_{1,16} = 0$, $p > 0.05$), die Anzahl und die Dauer von Putzverhalten ($F_{1,16} = 2.7$, $p > 0.05$, $F_{1,16} = 3.5$, $p < 0.08$) und die Anzahl an *rearings* ($F_{1,16} = 0$, $p > 0.05$) gemessen. In Bezug auf die hormonelle Reaktion der Tiere auf diesen Verhaltenstest wurden Plasma ACTH und Corticosteron bestimmt. Nach der 30minütigen Testperiode zeigte sich kein Unterschied in den gemessenen Konzentrationen an ACTH (693.6 pg/ml \pm 42.8 vs. 799.2 pg/ml \pm 49.4), aber ein signifikant höherer Anstieg an Plasma Corticosteron (126.5 ng/ml \pm 18.2 vs. 208.9 ng/ml \pm 22; $F_{1,18} = 8.33$, $p = 0.01$) in den Tieren, die vier Wochen lang einen freien Zugang zu einem Laufrad hatten.

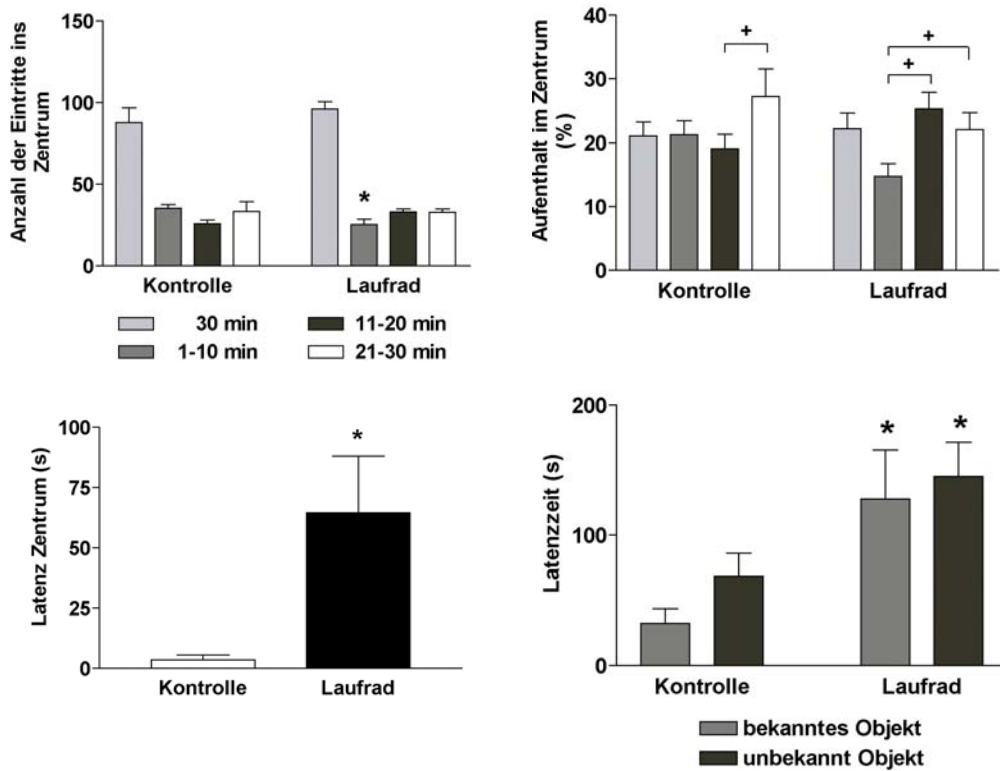


Abb. 44 *Open field*. Verschiedene Parameter (dargestellt als Mittelwert \pm SEM) des Verhaltens von Mäusen, die vier Wochen lang ein Laufrad zur freien Verfügung hatten, und vergleichbaren Kontrolltieren im *open field*. Aufgrund der Habituation wurde der Testzeitraum (30 min) in 10 Minuten-Intervalle unterteilt (*, $p < 0.05$, KO vs. LR; +, Zeitintervall innerhalb der Gruppe). Details sind dem Text zu entnehmen.

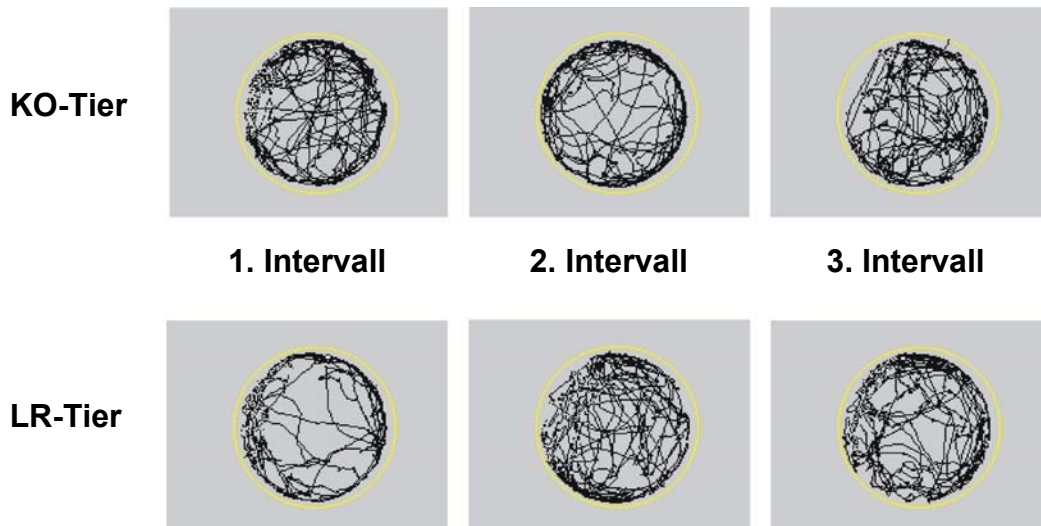


Abb. 45 Habituationsstrategie im *open field*. Dargestellt ist jeweils die Laufbewegung eines Beispieltieres der KO- sowie LR-Gruppe unterteilt in 10 Minuten-Intervalle. Es zeigte sich, dass die KO-Tiere in den ersten 10 min viel aktiver waren, und sie auch mehr das Zentrum aufsuchten. Im zweiten 10 min-Intervall waren die LR-Tiere die aktiveren und explorierten mehr. Im 3. Zeitintervall war das Verhalten der beiden Gruppen vergleichbar.

4 Diskussion

Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HPA)-Achse ist maßgeblich an den Prozessen, die infolge eines Stressors ausgelöst, bzw. einen besseren Umgang mit Stress ermöglichen, beteiligt. Aus diesem Grund wurde der Effekt von freiwilliger Langzeitaktivität auf das neuroendokrine System unter basalen und Stressbedingungen, den basalen und stressinduzierten Schlaf und das Angstverhalten und die Emotionalität dieser Tiere untersucht. Anhand der vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass vier Wochen freiwillige körperliche Aktivität zu Veränderungen in verschiedenen physiologischen Systemen und zentralen Stressbewältigungsmechanismen in männlichen C57BL/6N Mäusen führte.

4.1 HPA-Achse

Unter Ruhebedingungen hatten die LR-Mäuse morgens niedrigere ACTH-Plasmakonzentrationen und zum Anbruch der Dunkelphase deutlich erhöhte Corticosteron-Plasmakonzentrationen im Vergleich zu Kontrolltieren. Diese Veränderung scheint hauptsächlich auf der Ebene der Nebenniere und den damit verbundenen Rückkopplungsmechanismen stattzufinden. Die LR-Tiere wiesen ein erhöhtes Nebennieren-Gesamtgewicht auf, wobei die rechte Nebennierenrinde deutlich vergrößert war. Interessanterweise exprimierten das Nebennierenmark der körperlich aktiveren Tiere höhere Mengen an Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA, was darauf hindeutet, dass zumindest eine episodische sympatho-adrenomedulläre Aktivierung in diesen Tieren vorstatten ging. Diese Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden ebenfalls in den hormonellen Reaktionen von ACTH und Corticosteron auf einen Stressor deutlich. Dabei war es besonders wichtig, um welche Art von Stress es sich handelte. Wenn es sich um einen Stressor mit eher physischer Komponente handelte (erzwungenes Schwimmen, Einsperren oder sozialer Konflikt), reagierte das Hormonsystem der LR-Tiere mit einem stärkeren Anstieg an Corticosteron. Bei einem milden psychologischen Stressor, wie der neuen Umgebung (*novel environment*), reagierte das Hormonsystem mit einer Verminderung des Corticosteron-Anstiegs, sobald die Möglichkeit zur Nutzung eines Laufrades bestand. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die HPA-Achse ein dynamisches System ist, das durch regelmäßige körperliche Bewegung auf

verschiedenen Ebenen verändert wird und auf jede Herausforderung differenziert reagieren kann.

Die Tiere, die die Möglichkeit hatten ein Laufrad zu benutzen, taten dies freiwillig und ausdauernd durchwegs in der Dunkelphase. Die getesteten Tiere erreichten nach einer initialen Lernphase ihre persönliche Laufkapazität, welche sie mit leichten Schwankungen über den gesamten Testzeitraum beibehielten (Seward & Pereboom, 1955) oder die wieder leicht abfiel (Collier & Leshner, 1967). Dabei liefen die Tiere durchschnittlich 5-6 km und dies vornehmlich in der ersten Nachthälfte. Diese Ergebnisse stimmen überein mit Befunden aus der Literatur (Ebihara & Tsuji, 1976; Festing, 1977; Harri et al., 1999), die auch auf die stammesabhängigen Durchschnittsdistanzen hinweisen. Es scheint so, als ob es ein natürliches Bedürfnis der Tiere ist sich zu bewegen (Brant & Kavanau, 1964), fit zu sein (Goodrick, 1978) und dadurch das Körpergewicht zu regulieren (Leshner, 1971; Goodrick, 1978). Dies ist allerdings kein stereotypes Verhalten (Harri et al., 1999), denn es geht nicht auf Kosten des Ruheverhaltens, wie es etwa bei anderen stereotypen lokomotorischen Verhaltensweisen berichtet wurde (Cooper & Nicol, 1991; 1996).

Auf Ebene der physiologischen Aspekte zeigten sich in Übereinstimmung mit der Literatur keine Effekte auf das Körpergewicht (Harri et al., 1999, Solberg et al., 1999). Allerdings führte ausdauernde Bewegung zu Veränderungen in der Körperzusammensetzung. Bei den LR-Mäusen führte sie zu deutlichen Verlusten des abdominalen Bauchfettgewebes (Leshner, 1971; Enevoldsen et al., 2000), was in Zusammenhang mit einer erhöhten Lipolyse, die bei körperlicher Arbeit durch Katecholamine stimuliert wird, steht (Enevoldsen et al., 2000). Lambert und Jonsdottir (1998) zeigten, dass die Menge an peritonealem und perirenalem Fettgewebe durch regelmäßige körperliche Aktivität verringert wird, und somit auch das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen deutlich sinkt. Ausdauernde Bewegung führt ebenfalls zu einer Vergrößerung der Skelettmuskulatur (Allen et al., 2001) und einem erhöhten Gewicht des Herzens (Leshner, 1971; Allen et al., 2001), sowie zu positiven Effekten auf das Herz- Kreislaufsystem, den Blutdruck und die Herzschlagrate. Dies wurde in Tier- (Hoffmann et al., 1987; Morimoto et al., 2000) und humanen Studien (Berlin & Colditz, 1990; zur Übersicht Iellamo, 2001) gezeigt, und dies sowohl unter basalen Bedingungen als auch in Bezug auf einen Stressor. Eine verbesserte cerebrale Durchblutung und eine erhöhte Metabolismusrate u. a. im

Motorkortex wurden ebenfalls nachgewiesen (Ide & Secher, 2000; Mc Closkey et al., 2001).

Durch die erhöhte körperliche Aktivität haben die Mäuse auch einen erhöhten Energiebedarf, denn ihr Metabolismus ist generell aktiver, und sie verbrauchen mehr Energie durch eine erhöhte Fettverbrennung und für den Muskelaufbau. Die Futteraufnahme war in den LR-Tieren nicht unterschiedlich im Vergleich zu der Kontrollgruppe, was mit den Befunden von Harri et al. (1999) übereinstimmt. Der erhöhte Trinkkonsum könnte mit einer erhöhten Evaporation infolge eines zu erwartenden Anstieges der Körpertemperatur sowie der Atemfrequenz zusammenhängen. Somit führt freiwilliges Laufen in einem Laufrad zu deutlichen physischen und physiologischen Veränderungen.

Die Tiere, die sich ausdauernd physisch betätigten, wiesen verkleinerte Thymi und vergrößerte Nebennieren (Leshner, 1971) auf. Dies deutet auf eine aktivierte HPA-Achse hin. Selye (1985) berichtete von diesen Veränderungen in Zusammenhang mit einer vermehrten Glucocorticoid-Zirkulation infolge von Stress. Der Thymus reagiert sehr sensitiv auf Glucocorticoide, während die Nebenniere für die Ausschüttung derselben verantwortlich ist. Die vorliegenden Untersuchungen zeigten, dass die LR-Tiere, zumindest partiell während der Nacht, erhöhte Glucocorticoid-Konzentrationen im Blutplasma aufwiesen. Vergrößerte Nebennierengewichte nach ausdauernder körperlicher Bewegung wurden ebenfalls mehrfach beschrieben (Ingle, 1938; Kjaer, 1992; Coleman et al., 1998). Neben den Befunden des generellen Gewichtunterschiedes zeigte sich, dass es deutliche links/rechts Unterschiede in der Morphologie der Nebennieren gab, und auch auf dieser Ebene Veränderungen durch ausdauerndes Laufen hervorgerufen wurden. Unter Normalbedingungen ist die linke Nebenniere deutlich größer als die rechte, was auch bei anderen Spezies gefunden wurde (Idelman, 1978; Coleman et al., 1998). Diese Asymmetrie wurde nicht nur in C57BL/6N sondern auch in B6C3F1 Mäusen beobachtet (Droste, Ulbricht, Reul unveröffentlichte Beobachtung). Dies deutet darauf hin, dass die sympatho-adrenomedulläre Aktivität asymmetrisch ist mit einer größeren Aktivität auf der linken Seite. Diese Befunde korrespondieren mit dem Konzept der bevorzugten Nutzung der rechten Gehirnhemisphäre bei der Kontrolle sympathischer Aktivität und den erhöhten Noradrenalin-Konzentrationen in dieser Seite des Gehirns (Wittling et al., 1998; Wittling, 2001). Diese Seitendifferenzen des autonomen Nervensystems wurden bisher nur sehr wenig erforscht, doch die

gefundenen Ergebnisse des links/rechts Unterschiedes unterstützen das Konzept der sympathischen Asymmetrie.

Nach vierwöchiger ausdauernder körperlicher Aktivität wurde dieser Größenunterschied der beiden Nebennieren allerdings dadurch aufgehoben, dass sich die rechte Rinde und in geringerem Maße auch das rechte Mark der linken Seite angleichen. Dieses nicht deutlich vergrößerte Nebennierenmark steht scheinbar im Gegensatz zu den vermehrten Perioden an physischer Aktivität, die bekanntermaßen die sympathische Aktivität erhöhen (Kjaer, 1998; Iellamo, 2001). Anderen Studien zufolge, wurde sowohl in Tieren als auch in Menschen eine Vergrößerung des Nebennierenmarks infolge ausdauernder körperlicher Bewegung gefunden (Stallknecht et al., 1990; Schmidt et al., 1992; Kjaer, 1998). Kjaer (1998) spricht von dem so genannten "Sportler-Nebennierenmark", welches er über einen kontinuierlich erhöhten Adrenalinbedarf und -ausschüttung während körperlicher Aktivität erklärt. Allerdings wurden in diesen Studien entweder Hochleistungssportler (Kjaer, 1998) oder erzwungenes (nicht freiwilliges) Laufen auf einem Laufband bei Ratten untersucht (Bedford et al., 1979; Stallknecht et al., 1990; Schmidt et al., 1992). Demnach ist das Modell des freiwilligen Laufens nicht direkt mit diesen Studien vergleichbar. Interessanterweise zeigten die LR-Tiere, unabhängig von den morphologischen Befunden, eine Erhöhung der Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA-Expression im Nebennierenmark, was auf adaptive Prozesse der chromaffinen Zellen in Antwort auf eine Dezimierung der Adrenalinressourcen, verursacht durch regelmäßige körperliche Bewegung, hindeutet (Hamelink et al., 2002). Wie dem auch sei, diese Nebennierenmarksasymmetrie und die Aufhebung derselben nach ausdauernder körperlicher Aktivität sind faszinierende Beobachtungen, deren funktionale Bedeutung und die zugrunde liegenden Mechanismen bisher ungeklärt sind. Eine spekulative Erklärung könnte sein, dass in den LR-Tieren die Dominanz der rechten Hemisphäre bei der Regulierung der sympathischen Aktivität aufgehoben ist. Auf der Ebene des Marks könnten auch Neuropeptide wie zum Beispiel Substanz P oder Neuropeptid Y, die ebenfalls während ausdauernder Bewegung ausgeschüttet werden, einen modulatorischen Einfluss ausüben (Pernow et al., 1989). Es sollte allerdings bemerkt werden, dass es ein genereller Befund in trainierten Versuchsobjekten war, dass sie unter Ruhebedingungen eine reduzierte sympathische Aktivität zu Gunsten einer erhöhten parasympathischen kardiovaskulären Regulation aufwiesen (Winder et al., 1978; Duncan et al., 1985;

Meredith et al., 1990; Sothman et al., 1996). Unsere Beobachtungen stimmen mit diesen Beobachtungen überein.

Auf der Ebene der Nebennierenrinde zeigte sich eine Vergrößerung nach ausdauernder Bewegung, und auch diese war am deutlichsten im Vergleich der rechten Nebennieren. Im Einklang mit den bisherigen Befunden stand auch, dass das Totalgewicht der beiden Nebennieren bei den LR-Tieren erhöht war. Makroskopisch gesehen wiesen die Nebennieren der LR-Mäuse eine runde Form auf, während die der Kontrolltiere eine ellipsoide Form zeigten (s. Abb. 19). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es aufgrund von ausdauernder körperlicher Bewegung zu Veränderungen auf molekularer, zellulärer und organischer Ebene der Nebennieren kommt, und dies vermutlich, um den veränderten Aktivitätszustand des Organismus auszugleichen. Zur Klärung der schlussendlichen Bedeutung der Asymmetrie der Nebennieren und ihrer Aufhebung durch ausdauernde Bewegung werden noch weiter reichende Untersuchungen erforderlich sein.

In der bisherigen Diskussion wurde viel Wert auf die durch ausdauernde Bewegung initiierten Veränderungen auf Ebene der Nebennieren gelegt. Dies geschieht, um die Neuartigkeit der Beobachtungen hervorzuheben, aber auch, um über die Veränderungen des sympatho-adrenomedullären Systems möglicherweise Rückschlüsse und Erklärungsansätze für die beobachteten Unterschiede in der hormonellen Sekretion der HPA-Achse zu finden. Dies könnte schon eine Rolle bei der Beobachtung, dass unter Basalbedingungen die Amplitude des Plasma Corticosterons während des zirkadianen Rhythmus in den LR-Tieren stärker ausgeprägt war, spielen. Zu Beginn der Dunkelphase, der Aktivitätsphase der Tiere, war die Plasmakonzentration von Corticosteron doppelt so hoch wie bei den Kontrolltieren. Dies stand allerdings nicht in Zusammenhang mit einer Erhöhung von ACTH im Blutplasma zu diesem Zeitpunkt. Die erhöhte adrenokortikale Reaktion auf ACTH könnte ihre Ursache in einer erhöhten sympatho-adrenomedullären Aktivität zu dieser Zeit haben (Kjaer, 1998; Iellamo, 2001), denn die Mäuse liefen bevorzugt in der ersten Nachthälfte. Dies würde auch die normalen Corticosteron-Konzentrationen um Mitternacht erklären. Wie schon vorher angedeutet, ist die sympathische Aktivität des Nebennierenmarks ein positiver Modulator der Sensibilität der Nebennierenrinde für ACTH (Jasper & Engeland, 1994). Der unerwartet hohe Anstieg an Plasma Corticosteron zum Zeitpunkt 18.00 h könnte als vorbereitender adaptiver Prozess für

die aufkommende physische Aktivität gedeutet werden. Die Beobachtung, dass keine signifikante Herabregulierung der Glucocorticoid-Rezeptoren (GRs) sowohl im Gehirn als auch in der Hypophyse gefunden wurden, und es nur eine moderate Verkleinerung der Thymi in den LR-Tieren gab, deutet darauf hin, dass die Hypersekretion von Corticosteron in Ausmaß und Dauer in diesen Tieren limitiert war. Das leicht erhöhte zirkulierende CBG zum Anbruch der Dunkelphase (23% vs. 100% bei Corticosteron) hat dabei wahrscheinlich einen einschränkenden Einfluss auf die biologische Bedeutung der Hypersekretion von Glucocorticoiden. Die verringerte Anzahl an Mineralocorticoid-Rezeptoren (MRs) im Hippokampus war eine unerwartete Beobachtung, denn normalerweise sind diese Rezeptoren im Gegensatz zu den GRs resistent gegenüber homologer Herabregulierung (Reul et al., 1987). Aus diesem Grund scheint diese Erniedrigung nicht das Ergebnis einer episodischen Glucocorticoid-Hypersekretion in den LR-Tieren zu sein. Es ist bekannt, dass die MRs des Gehirns durch verschiedene Neuropeptide wie CRH (Gesing et al., 2001), Neurotransmitter wie Serotonin (Seckl et al., 1990) und Noradrenalin (Maccari et al., 1992; Kabbaj et al., 1995) und Wachstumsfaktoren (Reul et al., 1988) reguliert werden. Serotonin und β -Adrenozeptor-Agonisten sind dabei positive Regulatoren des MR. Die Erniedrigung der hippokampalen MRs könnte durch α -adrenerge Stimulation hervorgerufen werden. Durch α -adrenerge Agonisten oder einen durch Stress hervorgerufenen Anstieg an Noradrenalin und Adrenalin kann eine Suppression an MR mRNA ausgelöst werden (Kabbaj et al., 1995), und die Gehalte an Noradrenalin im Gehirn sind während ausdauernder und spontaner physischer Aktivität erhöht (Linthorst et al., 1996; Dishman et al., 2000). Des Weiteren sind α -adrenerge Rezeptoren mit den MRs in den hippokampalen Pyramidalneuronen colokalisiert (Williams, 1997). Ob andere Faktoren oder/und Mechanismen, wie zum Beispiel eine Desensibilisierung der Signaltransduktionswege, als Erklärung für die MR-Erniedrigung in Frage kommen, bedarf weiter gehender Untersuchungen.

Die Beobachtung, dass die morgendlichen Ruhekonzentrationen von ACTH in den LR-Tieren signifikant erniedrigt waren, deutet auf Veränderungen sowohl im hypothalamischen-hypophysären *Drive* als auch in den negativen Rückkopplungsmechanismen hin. Es wurde auch eine Erniedrigung der CRH mRNA-Konzentrationen in diesen Tieren gefunden. Es ist allerdings unklar, ob das als Indikator für einen herabgesetzten *Drive* der hypothalamischen-hypophysären Achse gedeutet werden kann, denn normalerweise ist CRH eher in der durch Stress

ausgelösten ACTH-Sekretion involviert, und nicht in der unter Basalbedingungen (Timpl et al., 1998). Alternativ gesehen könnte die Erniedrigung von morgendlichem ACTH eine Folge der erhöhten negativen Rückkopplung via der GRs, ausgelöst durch die deutlich erhöhten Corticosteron-Werte der ersten Nachthälfte, sein. Die Erniedrigung der hippokampalen MRs kann nur schwerlich für die geringeren ACTH-Plasmakonzentrationen verantwortlich gemacht werden, denn es ist bekannt, dass die MRs eine tonische Inhibierung auf die parvozellulären Neuronen des PVN ausüben (Reul & De Kloet, 1985, De Kloet & Reul, 1987; Herman et al., 1989; Reul et al., 2000b), weshalb erhöhte ACTH-Werte zu erwarten gewesen wären. Es erscheint daher eher so, als ob es in den LR-Mäusen als Antwort auf die erhöhte Glucocorticoid-Wirkung über die GRs zu einer kompensatorischen Erniedrigung der MR-Dichte kommt, um das homöostatische Gleichgewicht zwischen negativer Rückkopplung und Reaktivität der HPA-Achse aufrecht zu erhalten (s. auch De Kloet et al., 1998). Wie Gesing et al. (2001) zeigen konnten, scheint sich die MR-Dichte im Hippokampus und anderen limbischen Regionen den verschiedenen Bedürfnissen schnell anpassen zu können. Das sympathische Nervensystem scheint auch hier wieder eine bedeutende Rolle zu spielen. Dies geschieht über die Modulation der Sensibilität der Nebennierenrinde für ACTH durch den sympatho-adrenomedullären Einfluss, der selbst über MR und GR modulierbar ist (Van den Berg et al., 1990; Rahmouni et al., 1998).

Unabhängig vom basalen Status der HPA-Achse konnte gezeigt werden, dass die hormonelle Reaktion auf eine stressvolle Erfahrung stressorspezifisch bei den Tieren ist, die im Vorfeld vier Wochen lang die Möglichkeit hatten ein Laufrad zu benutzen. Handelte es sich um einen Stressor mit starker physischer Komponente (erzwungenes Schwimmen, Einsperren, sozialer Konflikt), gab es keine Unterschiede in dem darauf folgenden Anstieg der ACTH-Plasmakonzentrationen zwischen den beiden Gruppen. Allerdings wurde eine deutlich stärker ausgeprägte Erhöhung der Corticosteron-Konzentrationen in den LR-Tieren gefunden. Die ACTH-Daten zeigen, dass, obwohl die Tiere erniedrigte CRH mRNA-Expression im PVN aufwiesen, bei ihnen ein normaler Anstieg an ACTH als Antwort auf diese potentiell lebensbedrohlichen Stressoren möglich ist. Somit ist ihre hypothalamisch-hypophysäre-Achse nicht behindert. Die negative Rückkopplungseffizienz scheint in den LR-Tieren normal zu sein (im Gegensatz zu den Befunden in einigen Ausdauersportlern (Duclos et al., 2001)), was durch den normalen Anstieg an ACTH

und die unveränderte Kapazität und Affinität der GRs in diesen Tieren deutlich wird. Die deutlich ausgeprägteren Anstiege an Corticosteron infolge dieser Stressoren stehen in Einklang mit den Befunden, dass die Nebennierenrinde in den LR-Tieren vergrößert und die TH mRNA-Expression im Nebennierenmark erhöht war. Weiterhin wurde berichtet, dass es zu einer erhöhten sympatho-adrenomedullären Aktivierung infolge eines Stressors mit physischer Komponente (Sothman et al., 1996; Koolhaas et al., 1997; Kjaer, 1998) und eines psychosozialen Stresses (Sinyor et al., 1983) kommt. Andere Studien an Ratten, die zur körperlichen Aktivität gezwungen wurden, zeigten, dass es zu verringerten ACTH- und unveränderten Corticosteron-Konzentrationen infolge eines Fußschockes oder erzwungenem Schwimmen kam (Watanabe et al., 1991, 1992; Dishman et al., 1998). Diese Ergebnisse unterstreichen die Theorie, dass erzwungene ausdauernde Bewegung (auf einem Laufband, in einem Laufrad eingesperrt) eher als chronisches Stressparadigma angesehen werden sollte, was somit auch zu völlig anderen Veränderungen der HPA-Achse führt, als wenn es sich um eine freiwillige Aktivität handeln würde.

Die in dieser Arbeit dargestellten LR-Tiere antworteten auf einen Stressor mit starker physischer Komponente mit einer gesteigerten Corticosteron-Sekretion zusammenfassend dadurch, dass ihre HPA-Achse sich an die erhöhten metabolischen Ansprüche während des Laufens angepasst hat. Trotz allem reagieren sie auf den Stress einer neuen Umgebung mit ganz anderen HPA-Achsen-Reaktionen. Vernachlässigt man die Präsenz eines Laufrades in einer neuen Umgebung, ist die Antwort von Plasma ACTH in den LR-Tieren deutlich geringer als in der Kontrollgruppe, was darauf hindeutet, dass die Neuheit einen geringeren Einfluss auf diese Tiere ausübt, was ebenfalls in den durchgeführten Verhaltensexperimenten deutlich wurde (s. 4.5). Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit humanen Studien, die von einer anxiolytischen Wirkung von Ausdauertraining berichten (Steptoe et al., 1989; Byrne & Byrne, 1993; zur Übersicht Salmon, 2001). In den Mäusen, die vorher ein Laufrad zur freien Verfügung hatten, schienen die Corticosteron-Plasmakonzentrationen davon abzuhängen, ob sie auch in ihrer neuen Umgebung ein funktionstüchtiges Laufrad zur Verfügung hatten. Bei Abwesenheit eines funktionstüchtigen Laufrades zeigten die Tiere vergleichbare Konzentration wie die Kontrolltiere, was über eine adrenokortikale Hyperreaktion, die generell in diesen Tieren beobachtet wurde, erklärt werden könnte. Hatten die LR-Tiere ein funktionsfähiges Laufrad in ihrer neuen Umgebung, zeigten sie signifikant

erniedrigte Corticosteron-Werte. Die Tiere nutzten dieses Laufrad während der Testzeit ausgiebig. Die Benutzung des Laufrades könnte als Übersprungshandlung der Tiere gedeutet werden, dennoch reduziert es den emotionalen Einfluss der neuen Umgebung deutlich. Ein vergleichbarer Effekt der Corticosteron-Sekretion wurde bei Ratten beobachtet, die ein Laufrad zur freien Verfügung hatten, nachdem sie einem Fußschock-Paradigma unterzogen worden waren (Starzec et al., 1983). Der genaue Mechanismus, der dieser verminderten Glucocorticoid-Reaktion zugrunde liegt, ist unbekannt, aber ein sympatho-adrenomedullärer Einfluss und ein lokaler adrenomedullärer Inhibitionsmechanismus könnten beteiligt sein.

4.2 Neurogenese

Der Hippokampus ist eine Region, in der aufgrund ihrer Funktion für Lern- und Gedächtnisprozesse neuronale Plastizitätsprozesse eine bedeutende Rolle spielen, und auch im erwachsenen Zustand noch neue Neuronen gebildet werden können (Gould et al., 1998; Kornack & Rakic, 1999). Um die funktionalen Auswirkungen dieser neugeborenen Neuronen zu ergründen, ist es wichtig zu untersuchen, wie die Zahl der neugebildeten Zellen bzw. Neuronen auf verschiedene physiologische Stimuli reagiert und sich in neuronale Kreisläufe integriert. Wie aus der Literatur bekannt ist, üben dabei verschiedene experimentelle Bedingungen verschiedene Einflüsse auf die Neurogenese aus. So haben tierexperimentelle Versuche gezeigt, dass positive Erlebnisse (erweiterte Umgebung oder die Möglichkeit ein Laufrad zu benutzen) die Neurogenese stimulieren (van Praag et al., 1999a), während negative (stressvolle) Erlebnisse einen hemmenden Einfluss ausüben (Cameron & Gould, 1994; Gould et al., 1997). Es gibt ebenfalls Hinweise darauf, dass ein Zusammenhang zwischen der Neurogenese-Rate und der Durchführung eines hippocampusabhängigen Lerntestes besteht (van Praag et al., 1999b; Gould et al., 1999; Shors et al., 2001).

Die normalerweise verwendete Methode zur Markierung neu generierter Neuronen im Gehirn ist die Injektion von 5'Bromo-2-deoxy-Uridin (BrdU). BrdU wird während der Zellteilung in die Tochterzellen inkorporiert und lässt sich mit Hilfe einer Antikörperfärbung mittels Immunhistochemie nachweisen. In den hier dargestellten Untersuchungen wurde eine endogene Markierung proliferierender Zellen mit Hilfe eines Antikörpers gegen das Epitop Ki-67 der Ribonukleotidreduktase, einem Protein, das an der DNA-Synthese beteiligt ist, durchgeführt. Als erstes wurde ein

Vergleich zwischen beiden Markern erstellt, und es zeigte sich, dass beide Marker die mitotisch aktiven Vorläuferzellen der subgranulären Zone des Gyrus dentatus, der subventrikulären Zone des lateralen Ventrikels und sich immer noch teilende Zellen entlang des rostralen Migrationsweges in Richtung Bulbus olfactorius (Riechkolben) anfärben (Abb. 27 + 28). In der granulären Zellschicht des Bulbus olfactorius zeigte sich 4-16 Wochen nach Injektion von BrdU eine positive Färbung von differenzierenden und ausgereiften granulären Neuronen. Eine Ki-67-Immunreaktivität (IR) ließ sich in dieser Region nicht nachweisen, was darauf schließen lässt, dass hier keine Proliferation, sondern nur Differenzierung stattfindet. Kee et al. (2002) haben in einer Studie an Ratten ebenfalls den Vergleich zwischen Ki-67 und BrdU mit Hilfe der Detektion via Immunhistochemie gezogen, und fanden ebenfalls heraus, dass die erzielten Ergebnisse vergleichbar sind.

Nachteilig bei der BrdU-Methode ist, dass die Art der Applikation (Injektion) eine potentiell stressvolle Prozedur ist, und Stress die Inkorporationsrate verändern kann (Gould et al., 1997, 1998). Es wurden auch andere Nebeneffekte beschrieben, wie zum Beispiel ein direkter Einfluss auf die Glucocorticoid-Sekretion der Nebennieren (Anisimov, 1994; Malendowicz et al., 1997) und durch BrdU hervorgerufene Mutationen in Zellen, die zu Abnormalitäten in dem sich entwickelnden Gewebe führen können (Anisimov, 1994; Kolb et al., 1999). Weitere Probleme stellen die Blut-Hirn-Schranke und andere metabolische Faktoren dar, denn diese können die Verfügbarkeit von BrdU im Gehirn herabsetzen (Cameron & McKay, 2001). Die hier aufgeführten Nachteile sind mit dem endogenen Marker Ki-67 nicht gegeben. Ein entscheidender Vorteil der BrdU-Methode ist allerdings, dass die Substitution einer endogenen DNA-Base, dem Thymidin, mit dem BrdU-Analogon zu einer sicheren und spezifischen Markierung von sich teilenden Zellen führt, und dies auch in differenzierten Zellen nachweisbar ist (Gratzner, 1982). Diese Inkorporation ist über sehr lange Zeit verfolgbar, wie Untersuchungen zur Migration oder Überlebensrate von Zellen in post-mortem Gewebe zwei Jahre nach der Injektion zeigen konnten (Eriksson et al., 1998).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Ki-67 eine Alternative für den Nachweis proliferierender Zellen darstellt, solange die Zellen nicht über einen längeren Zeitraum beobachtet werden sollen. Untersuchungen an Wildpopulationen zeigten, im Gegensatz zu Labortieren, eine deutliche Einflussnahme durch Einfangen, Handhabung und Injektion des BrdUs auf die Proliferationsrate (Boonstra

et al., 2001). Aus diesem Grund stellt für Untersuchungen an Wildtieren und, wegen der oben aufgeführten Nebenwirkungen auch beim Menschen, Ki-67 eine willkommene Alternative dar.

Wie eingangs erwähnt, üben physiologische Stimuli und diverse andere Faktoren einen deutlichen Einfluss auf die Neurogenese-Rate im Hippokampus aus. Eine Erniedrigung der Proliferationsrate zeigte sich nach durchgeführten Stressparadigmen mit einer psychologischen Komponente, wie erzwungenes Schwimmen (s. Abb. 29), Konfrontation mit einem Predator (s. Abb. 29) (Tanapat et al., 1998) und soziale Konfliktsituationen (Gould et al., 1997). Es zeigte sich, dass stressvolle Erfahrungen, die mit dem Hippokampus in Zusammenhang stehen, zu einer Veränderung der Neurogenese-Aktivität führten, wohingegen physische Stressoren wie Kälte oder Ether zu keinen Veränderungen führten (Bilang-Bleuel et al., in Vorbereitung). Ein positives Ereignis wie eine erweiterte Umgebung (Kempermann et al., 1997) mit der wichtigsten Komponente des freien Zuganges zu einem Laufrad (s. Abb. 29) (van Praag et al., 1999a), hippokampusabhängige Lerntests (van Praag et al., 1999b; Gould et al., 1999) und LTP (Derrick et al., 2000) führen hingegen zu einer Erhöhung der Neurogenese-Rate.

Die negativen Einflüsse von Stressoren werden den verstärkt zirkulierenden Glucocorticoiden zugeschrieben, denn es wurde gezeigt, dass eine einzige Injektion von Corticosteron die Neurogenese-Rate verringerte, während Adrenalektomie sie erhöhte (Cameron & Gould, 1994). Glucocorticoide können allerdings nicht der alleinige Mediator sein, denn in den in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen zeigte sich, dass die LR-Tiere eine erhöhte Ki-67-IR und eine zumindest zeitweilige Erhöhung des Plasma-Corticosterons aufwiesen. Das freiwillige Laufen übt allerdings auch Einfluss auf andere Systeme aus, die ihrerseits wiederum Einfluss auf die Neurogenese nehmen. So wird zum Beispiel durch freiwillige körperliche Aktivität eine Erhöhung der Serotonin (5-HT)-Biosynthese im Gehirn ausgelöst (Chaouloff et al., 1985; Linthorst et al., 1996; Weicker & Strüder, 2001). In Bezug auf die Neurogenese zeigte sich, dass die Aktivierung der 5-HT_{1A}-Rezeptoren (Jacobs et al., 1998) oder die Gabe von Antidepressiva (Malberg et al., 2000; Bilang-Bleuel, in Vorbereitung) zu einer Erhöhung, und die Inhibierung der 5-HT-Synthese oder die Läsion von 5-HT-Neuronen in den Raphekernen zu einer Erniedrigung der Proliferationsrate führten (Brezun & Daszuta, 1999).

Ein weiterer Zusammenhang lässt sich auch zu Wachstumsfaktoren herstellen, deren Synthese durch ausdauernde körperliche Aktivität erhöht wird. Dies wurde zum Beispiel für IGF (*insulin like growth factor*)-I nachgewiesen (Carro et al., 2000). In Bezug auf die Neurogenese zeigte sich, dass die systemische Gabe von IGF-I vergleichbare Effekte wie ausdauernde Bewegung ausübte (Carro et al., 2000; Trejo et al., 2001). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass auch die für neuronales Überleben und Differenzierungsprozesse sowie für synaptische Plastizität verantwortlichen neurotrophen Faktoren BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) und NGF (*nerve growth factor*) nach körperlicher Aktivität im Hippokampus und dem zerebralen Kortex erhöht waren (BDNF: Neeper et al., 1995, 1996; Russo-Neustadt et al., 1999, 2000; NGF: Pham et al., 1999; Ickes et al., 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ausdauernde körperliche Aktivität über verschiedene Faktoren Einfluss auf die Neurogenese ausübt und die gefundene Erhöhung der Proliferationsrate auf einem Zusammenspiel dieser Faktoren basiert.

4.3 Schlafstudien

Das Schlaf-Wach-Verhalten in Säugetieren ist hauptsächlich durch die zirkadiane Rhythmik des SCN bestimmt. Das Muster in den untersuchten Mäusen stimmt mit dem anderer Studien überein (Edgar et al., 1991; Franken et al., 1999). Mäuse sind polyphasische Schläfer und nachtaktive Tiere, und schlafen somit hauptsächlich während der Hellphase und sind in der Dunkelphase aktiv. Laufen in einem Laufrad verändert signifikant das Schlaf-Wach-Verhalten. Zu Beginn der Dunkelperiode ist die Laufradaktivität am höchsten, und die Tiere sind die meiste Zeit wach, was mehr oder weniger auf Kosten aller Schlafstadien geht, wenn man sie mit der Kontrollgruppe vergleicht. Obwohl die Gesamtsumme an non-REMS (*rapid eye movement sleep*) keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen aufwies, zeigten die LR-Tiere weniger, dafür aber länger andauernde non-REMS-Episoden. Dies deutet auf eine erhöhte Schlafkonsolidierung in den LR-Mäusen hin. Diese Mäuse wiesen weniger REMS auf, der von einer geringeren Anzahl an REMS-Episoden abgeleitet werden kann, und somit zu einer verringerten Initiierung dieses Schlafstadiums führte. Andere Studien, die auch den Einfluss eines Laufrades auf den Schlaf untersucht haben, lieferten vergleichbare Ergebnisse. Eine Studie an Ratten zeigte, dass es eine negative Korrelation zwischen der zurückgelegten Distanz und der Gesamtmenge an REMS während der Dunkelperiode gab

(Hanagasioglu & Borbely, 1982). Eine andere Studie zeigte, dass Mäuse, die ein Laufrad zur freien Verfügung hatten, ihren Schlaf auf die Hellphase konzentrierten, und ihre Wachphase während der Dunkelheit hatten (Edgar et al., 1991). Eine dritte Studie zeigte, dass Mäuse, die ein Laufrad zur freien Verfügung hatten, eine niedrigere Summe an non-REMS und REMS insbesondere während der Nacht aufwiesen, und dass dies zu einer Reduktion der Schlafepisoden führte (Welsh et al., 1988). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass freiwillige körperliche Aktivität die Amplitude des zirkadianen Schlaf-Wach-Verhaltens erhöhte, und somit die Schlaferhaltung verbesserte, und dass dies gleichzeitig zu einer Erniedrigung des REMS in Nagetieren führte.

Die gefundenen Effekte des Laufens in einem Laufrad auf den Schlaf hängen wahrscheinlich mit den physiologischen (neuroendokrinen, autonomen und metabolischen) Folgen der ausdauernden körperlichen Aktivität zusammen. Eine erhöhte sympathische Aktivität könnte hier eine Rolle spielen, denn in Untersuchungen an Ausdauersportlern wurde gezeigt, dass intensive Bewegung zu einer erhöhten Katecholamin-Konzentration im Urin führte (Netzer et al., 2001), und dies mit einer Suppression des REMS einherging (Kupfer et al., 1985; Netzer et al., 2001). Die vergrößerten Nebennieren und die verkleinerten Thymi sind ebenfalls ein Hinweis darauf, dass die HPA-Achse aktiviert war, was auch den Schlaf verändern kann. Wie bereits gezeigt wurde, erhöht eine zentrale Gabe von CRH in Tieren die Wachphasen auf Kosten des non-REMS und der SWA (*slow wave activity*). Ebenso wurde ein Effekt von ACTH auf das Wachstadium gefunden (zur Übersicht Opp, 1995). In Menschen führte die Gabe von CRH ebenso wie die von ACTH zu einer Verringerung des SWS (*slow wave sleep*) und des REMS, während Cortisol eine Suppression auf den REMS ausübte, den SWS aber erhöhte (zur Übersicht Friess et al., 1995). Dies könnte mit einer Inhibierung der CRH- und ACTH-Synthese, ausgelöst durch das Cortisol, zusammenhängen.

Eine soziale Konfliktsituation bedeutet sowohl für einen Menschen als auch für ein Tier Stress, der zu einer robusten neuroendokrinen Antwort führt. Eine Erhöhung der Katecholamine, ACTH und Corticosteron im Blutplasma wurde in Nagetieren direkt nach einem sozialen Konflikt nachgewiesen, was auf eine Aktivierung sowohl des sympathischen Nervensystems als auch der HPA-Achse schließen lässt (Koolhaas et al., 1997). Die Konzentrationen von ACTH und Corticosteron, die in den vorliegenden Untersuchungen nach einer 15minütigen Konfliktsituation gefunden

wurden, waren relativ hoch. Auf der Ebene des ACTHs zeigte sich dabei kein Unterschied, allerdings waren die Plasmawerte von Corticosteron signifikant erhöht in den Tieren, die vier Wochen ein Laufrad zur freien Verfügung hatten, im Vergleich zu Kontrolltieren (s. auch 4.1).

Eine soziale Konfliktsituation beeinflusst auch das Schlaf-Wach-Verhalten. Generell zeigte sich eine Reduzierung des Wachstadiums zu Gunsten einer Erhöhung des non-REMS und pre-REMS mit einer Verzögerung von 2 h. Eine Spektralanalyse des EEG während des non-REMS zeigte, dass die SWA nach einem sozialen Konflikt anstieg, und es somit zu einer Vertiefung der non-REMS-Intensität kam. Der Einfluss auf den REMS war allerdings unterschiedlich in beiden Gruppen. Während die Mäuse ohne Laufrad-Zugang einen Anstieg des REMS parallel mit den anderen Schlafstadien im zweiten 2 h-Intervall zeigten, war bei den Tieren mit Zugang eine leichte selektive Reduktion des REMS zu beobachten. Letzteres scheint mit einer verspäteten Initiierung des REMS und einer geringeren Anzahl von Episoden zusammenzuhängen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Stress zu einem verspäteten Eintritt des Schlafes führt, und dass der genaue Effekt von der Art des Stressors abhängig ist. In einer Studie wurde gezeigt, dass 1 h sozialer Konflikt zu einem andauernden Anstieg des non-REMS mit einer Verspätung von 2 h und einer sofortigen Zunahme der SWA führte (Meerlo & Turek, 2001). Die Auswirkungen auf den non-REMS in der hier vorliegenden Studie zeigten die gleichen Effekte in beiden Gruppen schon nach einer 15minütigen Stresssituation. Einen Unterschied zwischen beiden Studien gibt es allerdings in Bezug auf den REMS. Während Meerlo und Turek (2001) von einer vorübergehenden Suppression des REMS mit einem späteren Anstieg sprechen, zeigten die Kontrollmäuse einen direkten Anstieg des REMS. Das kann einmal mit der Dauer des Stressors (1 h vs. 15 min) zusammenhängen, aber auch mit der Durchführung des Stressparadigmas (ohne vs. mit Trennung nach dem ersten Angriff eines der beiden Tiere). In diese Richtung weist auch, dass Meerlo und Turek (2001) deutlich höhere Corticosteron-Werte fanden. Die LR-Mäuse in der hier dargestellten Studie hingegen zeigten eine Reduktion des REMS bei signifikant erhöhten Corticosteron-Werten.

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass freiwilliges Laufen in einem Laufrad den Schlaf in männlichen Mäusen moduliert. Es kam zu einer merklichen Verlängerung der Dauer der einzelnen Schlafepisoden, was darauf hindeutet, dass körperliche Aktivität einen positiven Einfluss auf die Qualität des

Schlafes ausübt. In Einklang mit humanen Studien (Kupfer et al., 1985; Netzer et al., 2001) wurde eine Reduzierung des REMS festgestellt, und infolge eines sozialen Stresses wurde der Anstieg an REMS durch die ausdauernde körperliche Aktivität umgekehrt. Die Ergebnisse stehen in Kontrast zu den Veränderungen des Schlafes, die unter pathologischen Konditionen zu finden sind. So führte zum Beispiel ein chronischer milder Stress in Ratten zu einer Verringerung der Schlafepisdendauer (Willner et al., 1992) und einem Anstieg der Anzahl der REMS-Episoden (Grønli et al., 2002). Es ist bekannt, dass eine Depression zu verschiedenen Veränderungen des Schlafes führt. So wurde gezeigt, dass es zu einer Fragmentierung des Schlafes und erhöhtem REMS kommt (Kupfer, 1995). Im Gegenzug führen hierbei die meisten Antidepressiva zu einer Verringerung des REMS, was auch einer der therapeutischen Effekte sein könnte (zur Übersicht Winokur et al., 2001).

Versucht man einen Zusammenhang zwischen körperlich aktiven Mäusen und Menschen gegenüber chronisch gestressten Ratten und depressiven Patienten herzustellen, scheinen auch hier die Glucocorticoide eine entscheidende Rolle zu spielen. Chronisch gestresste Ratten und depressive Patienten zeigten eine Erniedrigung der Glucocorticoid-Sensibilität (Reul et al., 1993; Modell et al., 1997), die durch die Gabe von Antidepressiva normalisiert werden konnte. Da die Schlafqualität in Sportlern erhöht ist, scheint hier auch ein Grund des Anti-Stress-Effektes von ausdauernder Bewegung zu liegen.

4.4 Vergleich zu Antidepressiva

Wie bereits angedeutet, scheint regelmäßige Ausübung von Sport einen anxiolytischen und antidepressiven Effekt auszuüben. Aus diesem Grund wurde ein Vergleich verschiedener physiologischer und neuroendokriner Parameter unter Basalbedingungen durchgeführt. Hierfür wurde den Mäusen das Antidepressivum Tianeptin über vier Wochen verabreicht, und ein Vergleich zu einer Gruppe von Tieren, die die Möglichkeit hatten vier Wochen freiwillig ein Laufrad zu benutzen, durchgeführt. Bei Tianeptin handelt es sich um ein trizyklisches Molekül, das die Wiederaufnahme von Serotonin in die präsynaptischen Endigungen verstärkt, aber trotzdem vergleichbare klinische und tierexperimentelle Effekte wie Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer ausübt (Gesing & Reul, in Vorbereitung). Weiterhin reduziert Tianeptin, wie auch Antidepressiva anderer Klassen, die HPA-Achsen-Aktivität (Brady et al., 1991; Reul et al., 1993, 1994). Da aus klinischen Studien

bekannt ist, dass gerade die Kombination von Antidepressivum und Sport zu wirkungsvolleren Ergebnissen führte, wurde auch diese Kombination miteinbezogen. CRH und das CRH-Rezeptor-System scheinen eine wichtige Rolle bei der Depression zu spielen, weshalb Untersuchungen an diesem System in den verschiedenen Vorbehandlungen ebenfalls unter basalen Bedingungen durchgeführt wurden. Es handelt sich hierbei um preliminäre Untersuchungen, die einer Vertiefung bedürfen.

Die Tiere mit Antidepressiva-Medikation liefen im Durchschnitt mehr (8 km vs. 6 km pro Nacht), weshalb ein sedierender Effekt, wie er bei einigen Antidepressiva auftritt, ausgeschlossen werden konnte. Es zeigte sich, dass das Laufrad (LR), Antidepressiva (AD) oder die Kombination Laufrad und Antidepressiva (LR + AD) keinen Effekt auf das generelle Körpergewicht ausübte. Auf Ebene der Fettverteilung führte die Gabe von AD zu keinem zusätzlichen Effekt auf das durch die Laufradaktivität verringerte peritoneale Fettgewebe (s. 4.1). Der Trinkkonsum war durch die Gabe des Antidepressivums oder des Laufrades deutlich erhöht. Die Thymusgröße war bei diesen Untersuchungen nicht unterschiedlich zwischen allen vier Gruppen, was im Gegensatz zu den vorherigen Untersuchungen stand, die eine signifikante Verkleinerung der Thymi in den LR-Tieren ergab. Dieser Unterschied lässt sich durch die deutlich größere n-Zahl in den ersten Untersuchungen erklären. Auf der Ebene der Nebennieren zeigte sich, dass Antidepressiva-Gabe zu keinen Veränderungen sowohl der Größe, des links/rechts Unterschiedes und der Größe von Mark und Rinde führte. Es bestätigte sich, dass die Benutzung eines Laufrades verantwortlich für die gefundenen Veränderungen auf Ebene der Nebennieren war (siehe 4.1). Die Untersuchungen der basalen Morgenkonzentrationen von Plasma ACTH und Plasma Corticosteron ergaben, dass ACTH bei allen vier Gruppen vergleichbare Konzentrationen aufwies, was im Gegensatz zu den vorher dargestellten Untersuchungen steht, allerdings wurde dort das signifikante Niveau nur knapp überschritten. Die Corticosteron-Konzentrationen wiesen hingegen in der ANOVA-Analyse einen Effekt des Laufrades auf, der bei Betrachtung der Gruppen untereinander nur bei der Kombination LR + AD im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant war. Dies deutet darauf hin, dass die zusätzliche Gabe von Tianeptin einen synergistischen Effekt auf die Empfindlichkeit der Nebennierenrinde auf ACTH ausübt. Dies könnte mit Änderungen im sympatho-adrenomedullären System zusammenhängen (s. unten).

Wie bereits in der Einleitung beschrieben (s. 1.5), werden anxiogene und anxiolytische Reaktionen über die CRH-Rezeptoren 1 und 2 (R1 und R2) vermittelt. Auf Ebene der beiden Rezeptoren zeigte sich kein Effekt der Bedingungen, zumindest nicht unter basalen Bedingungen und in den untersuchten Hirnregionen. Die CRH mRNA-Konzentrationen im PVN waren durch die Verfügbarkeit eines Laufrades erniedrigt. Die Gabe von AD unter basalen Bedingungen übte keinen Effekt auf die CRH-Expression aus. Dies steht im Gegensatz zu anderen tierexperimentellen Untersuchungen, die eine Erniedrigung der CRH mRNA-Expression im PVN infolge Antidepressiva-Gabe zeigten (Brady et al., 1991). Allerdings wurden diese Untersuchungen an einer anderen Spezies mit einem anderen Antidepressivum durchgeführt (Ratten und Imipramin), was bekanntermaßen zu unterschiedlichen Befunden führen kann. Generell lässt sich sagen, dass unter stressvollen Bedingungen oder der Symptomatik der Depression CRH mRNA im PVN erhöht exprimiert wird (Raadsheer et al., 1993, 1994). Die Erniedrigung der CRH mRNA infolge ausdauernder Bewegung ist unter 4.1 bereits diskutiert worden. Des Weiteren wurde die Expression von Urocortin mRNA in seinem Hauptbildungsort, dem Edinger-Westphalkern untersucht, und es zeigte sich weder ein Effekt durch LR noch durch AD. Der Edinger-Westphalkern unterhält u. a. UCN-Projektionen zu Motoneuronen des caudalen Hirnstamms und dem spinalen Cord, weshalb er bei Prozessen der motorischen Kontrolle und der sensormotorischen Integration beteiligt zu sein scheint (Bittencort et al., 1999). Dies erlangt allerdings scheinbar eher unter stressvollen Bedingungen Bedeutung. Die mRNA-Expression von UCN II und UCN III wurde ebenfalls in diesen Tieren untersucht, allerdings war das Signal zu schwach um eine Aussage treffen zu können. Hier sind weitere Untersuchungen von Bedarf.

Wie schon vorher angedeutet, ist die sympathische Aktivität des Nebennierenmarks ein positiver Modulator der Sensibilität der Nebennierenrinde für ACTH (Jasper & Engeland, 1994). Die LR-Tiere zeigten ebenso wie die LR + AD-Tiere eine Erhöhung der TH mRNA-Expression sowohl im Nebennierenmark als auch im Locus coeruleus (LC). Der Grund für die erhöhte Expression im Nebennierenmark könnte die episodische sympatho-adrenomedulläre Aktivierung, die in diesen Tieren vonstatten geht, sein (Kjaer, 1998; Iellamo, 2001). Es scheint sich hier um adaptive Prozesse zu handeln, die zur Auffüllung der Adrenalinressourcen führen (Hamelink et al., 2002).

Die höchste Dichte an noradrenergen Zellkörpern im Gehirn ist im LC lokalisiert (zur Übersicht Holets, 1990). Efferente noradrenerge Projektionen übt der LC auf eine Vielzahl von Regionen aus (u. a. auf den zerebralen Kortex, Thalamus, Hypothalamus, Hippokampus, Amygdala, BNST und Nucleus accumbens). Den größten afferenten Input erhält der LC über den Nucleus paragigantuscellularis und den Nucleus prepositus hypoglossi (beide sind in der rostralen Medulla lokalisiert, zur Übersicht Bremner et al., 1996). Dadurch, dass der Nucleus paragigantuscellularis den Haupteinfluss auf den LC ausübt, gleichzeitig aber auch die periphere sympathische Aktivität kontrolliert, scheint es eine Parallelregulierung des zentralen und peripheren sympathischen Systems zu geben (Aston-Jones et al., 1986, 1991; Pagliari & Peyrin, 1995). Dies würde erklären, warum sowohl in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks als auch in den noradrenergen Neuronen des LC eine erhöhte Expression der TH mRNA nach ausdauernder körperlicher Aktivität beobachtet werden konnte. Es sollte allerdings bemerkt werden, dass es ein genereller Befund in trainierten Versuchsubjekten ist, dass sie unter Ruhebedingungen eine reduzierte sympathische Aktivität zu Gunsten einer erhöhten parasympathischen kardiovaskulären Regulation aufweisen (Winder et al., 1978; Duncan et al., 1985; Meredith et al., 1990; Sothman et al., 1996).

Brady und Kollegen (1991) wiesen einen Effekt von Langzeit-Applikation von Antidepressiva auf das autonome Nervensystem nach. Sie zeigten in Ratten, dass die Langzeit-Gabe von Imipramin zu einer erniedrigten Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA-Expression im Locus coeruleus führte. Diese Befunde lassen darüber spekulieren, dass die Kombination von LR + AD einen synergistischen Effekt auf den sympatho-adrenomedullären Einfluss ausübt, so dass es tatsächlich zu einer spezifischen Erniedrigung des Plasma Corticosterons unter morgendlichen Ruhebedingungen kommt. Zusammengefasst lässt sich somit sagen, dass die gefundene Erhöhung der TH mRNA-Expression in den LR-Tieren nur scheinbar im Gegensatz zu einem erniedrigten sympatho-adrenomedullären Einfluss steht, denn die Tyrosinhydroxylase ist zwar das limitierende Enzym der Noradrenalin- und Adrenalin-Synthese, gibt aber keinen endgültigen Aufschluss über die tatsächliche sympathische Aktivität.

Wie bereits angedeutet, steht der Hypothalamus bzw. die corticotropen Neuronen des PVN mit den noradrenergen Neuronen des LC in Verbindung (Valentino et al., 1992). Er scheint eine zentrale Integrationsstelle von durch Stress

hervorgerufenen autonomen, Verhaltens- und anxiogenen Effekten zu sein (Valentino et al., 1993), und es gibt Hinweise darauf, dass es einen positiven Rückkopplungsmechanismus zwischen dem LC und dem PVN gibt (Petrov et al., 1993). CRH scheint in einer Dosis-Wirkungs-Korrelation Einfluss auf die Feuerungsrate der noradrenergen Neuronen im LC zu nehmen. Die Aktivität der noradrenergen Neuronen scheint durch Art und Umfang eines Stressors kontrolliert zu werden. Es wurde gezeigt, dass sowohl die lokale Gabe von CRH als auch Stress zu einem Anstieg von cAMP in den noradrenergen Neuronen des LC führte, verbunden mit einer Aktivierung der Tyrosinhydroxylase-Aktivität und somit mit einem Anstieg der Noradrenalin-Synthese (Olianas et al., 1993). Im Gegenzug unterhält der LC aber auch Projektionen zu der parvozellulären Region des PVN, und Noradrenalin übt dort einen stimulatorischen Einfluss auf die Sekretion von CRH aus (Calogero et al., 1988; Plotsky et al., 1989). Dass der LC eine bedeutende Rolle in affektiven Störungen wie Angst und Depression spielt, zeigt sich darin, dass depressive Patienten generell permanent erhöhte Noradrenalin-Spiegel aufweisen, und einige Antidepressiva die TH mRNA-Expression und die spontane Aktivität von LC-Neuronen herabsetzen, und somit auch mitbeteiligt sein könnten, an der erniedrigten Gen-Expression von CRH. Das könnte einer der antidepressiven Effekte dieser Medikamente sein (Nestler et al., 1990; Valentino & Curtis, 1991; Brady et al., 1991).

Die Betrachtung eines weiteren Aspektes lässt ebenfalls spekulieren, dass zumindest eine phasisch erhöhte NA-Synthese einen positiven Einfluss auf den Organismus ausübt. Befunde von Sorg & Magistretti (1992) deuten darauf hin, dass eine erhöhte Feuerungsrate noradrenerger Neuronen des LC zu einer Erhöhung der Nutzung von Glucose führt. Die lokale zerebrale Glucosenutzung ist ein Index für funktionale neurogene Aktivität. Das Ausmaß an regionalem Glucose-Gehirnmetabolismus und regionalem zerebralen Blutfluss scheint auch in der Depression und ihrer Remission eine bedeutende Rolle zu spielen. Der frontale Kortex ist eine Region, die in Kognitionsprozesse, bei motorischem Verhalten und bei psychiatrischen Erkrankungen involviert ist. Es gibt zwar sehr gegensätzliche Ansichten darüber, ob eine Depression zu einer erniedrigten (Baxter et al., 1989; Kennedy et al., 2001; Ketter et al., 2001) oder einer erhöhten (Kling et al., 1986; Brody et al., 2001) metabolischen Aktivität im präfrontalen Kortex führt, allerdings wurde bei einer Remission infolge einer Antidepressiva-Medikation von einer

Normalisierung (Erhöhung bzw. Erniedrigung) berichtet (Baxter et al., 1989; Kennedy et al., 2001; Ketter et al., 2001). Diese gegensätzlichen Befunde scheinen auf methodischen Unterschieden zu basieren.

Ausdauernde körperliche Aktivität führt neben einer Erhöhung des zerebralen Blutflusses zu einer Erhöhung der extrazellulären Glucose-Konzentrationen (Ide et al., 2000; Bequet et al., 2001) und zu einem erhöhten regionalen zerebralen Glucose-Metabolismus besonders im Motorkortex und im Striatum (Vissing et al., 1996; Ide & Secher, 2001; McCloskey et al., 2001). So könnte auch der Einfluss auf den Glucose-Metabolismus einen weiteren Grund für die antidepressiven Effekte von Sport darstellen.

Zusammenfassend lässt sich somit folgern, dass der antidepressive Effekt von ausdauernder körperlicher Aktivität u. a. darauf zurückzuführen ist, dass es zu zeitlich begrenzten Aktivitätsänderungen verschiedener Neurotransmitter-Systeme (NA, 5-HT), des CRH-(Rezeptor)-Systems, des Glucose-Metabolismus und diverser Interaktionen zwischen diesen Ereignissen kommt.

4.5 Verhaltensstudien

Es gibt diverse Hinweise in der Literatur, dass ausdauernde körperliche Aktivität zu Veränderungen im stressbezogenen Verhalten und der Emotionalität führt. Gerade in Humanstudien wird auf einen anxiolytischen Effekt durch ausdauerndes Training hingewiesen (Byrne & Byrne, 1993; zur Übersicht Salmon, 2001). In den hier durchgeführten Verhaltensuntersuchungen (*modified hole board*, *open field*, *elevated plus-maze* und *dark/light box*) wurde deutlich, dass, wie auch schon bei den Untersuchungen zu verschiedenen Stressmodellen, der Kontext des angewendeten Testes von großer Bedeutung war, und die Tests nicht einzeln bewertet werden können, da sie einzeln betrachtet widersprüchliche Interpretationen zulassen.

Im 10minütigen Versuchsdurchlauf des *modified hole board* (mHb, zur Übersicht Ohl et al., 2001), das eine komplexe ethologische Verhaltensphänotypisierung der Tiere ermöglicht, zeigten sich bei den Kontrolltieren vergleichbare Resultate wie in einer Studie von Ohl et al. (2001), die ebenfalls mit C57BL/6N Mäusen durchgeführt wurde. Im Vergleich dazu zeigte sich bei den LR-Tieren, dass die Latenz bis zum ersten Eintritt auf das Board stark erhöht war. Des Weiteren konnte eine tendenziell erhöhte Latenz bis zum ersten Besuch eines Loches und bis zum ersten Linienübertritt beobachtet werden. Diese anfängliche

Inaktivität der Tiere wird normalerweise als erhöhte Ängstlichkeit gedeutet. Kontrovers dazu ist, dass die LR-Tiere auf dem Board mehr *rearings* (sich auf die Hinterbeine stellen) als die Kontrolltiere vollführten, was als weniger ängstlich gedeutet wird. Da das mHb einen sehr komplexen multidimensionalen Test darstellt, wurden selektive unidimensionale Verhaltensuntersuchungen durchgeführt.

Das EPM ist ein validierter Test, um das Verhalten der Tiere in einer unkonditionierten Konfliktsituation zu untersuchen, denn Nagetiere haben Angst vor Höhen, explorieren aber instinktiv eine neue Umgebung, um eventuelle Gefahren rechtzeitig zu erkennen (Handley & Mithani, 1984; zur Übersicht Hogg, 1996). In diesem Test hielten sich die LR-Tiere bedeutend länger und häufiger auf den offenen Armen und am Ende dieser Arme auf, während die Kontrolltiere die geschlossenen Arme bevorzugten und seltener die offenen Arme explorierten. Das Verhalten der LR-Tiere wird allgemein als weniger ängstlich gedeutet. Im Gegensatz zum mHb konnte im EPM gezeigt werden, dass beide Gruppen (LR-Tiere und Kontrolltiere) sich in ihrer anfänglichen Aktivität wenig unterschieden, dafür aber einen deutlichen Unterschied im angstbezogenen Verhalten zeigten. Andere Studien an C57BL/6 Mäusen zeigten, dass diese im EPM ebenfalls weniger ängstlich im Gegensatz zu Kontrolltieren reagierten, wenn sie vorher in einer erweiterten Umgebung gehalten worden waren (Chapillon et al. 1999). In einer erweiterten Umgebung wird das Laufrad als eine der wichtigsten Komponenten angesehen, wie sich auch in Untersuchungen zur Neurogenese-Rate und zum Lernverhalten zeigte (van Praag et al., 1999b).

Im ebenfalls durchgeführten *dark/light box*-Test (Crawley & Goodwin, 1980; zur Übersicht Hascoet et al., 2001) zeigten sich vergleichbare Befunde. Bei diesem Test wird die Ängstlichkeit dadurch gemessen, wie lange und wie oft ein Tier sich in einem dunklen bzw. hellen Kompartiment aufhält, da Nagetiere generell das Licht scheuen, aber aufgrund eines angeborenen explorativen Dranges in eine Konfliktsituation gebracht werden. Es konnte beobachtet werden, dass die LR-Tiere weniger ängstlich waren, da sie das helle Kompartiment schneller und ausdauernder als die Kontrollen explorierten. Entsprechend den Ergebnissen des EPMS könnte auch hier gefolgert werden, dass die LR-Tiere weniger ängstlich reagierten. In diesem Test zeigte sich ebenfalls kein Unterschied zwischen beiden Gruppen in der anfänglichen Aktivität.

Um die Lokomotion der Tiere und vor allem die Habituation an eine neue Umgebung zu untersuchen, wurden Mäuse nach vierwöchiger Benutzung eines

Laufrades für 30 min im *open field* getestet (Hall, 1934; zur Übersicht Crawley, 1985). Habituation wird als elementare Form des Lernens bezeichnet und äußert sich in der Regel in einer ausbleibenden oder verringerten Reaktion auf einen bedeutungslosen und somit als ungefährlich eingestuften Stimulus (Chapillon & Roulet, 1996). Das heißt, je schneller ein Tier sich an eine neue Umgebung gewöhnt hat, desto eher wird es auch in die ungeschützten Areale eines Versuchsaufbaus gehen, um gerichtet die gesamte Fläche zu explorieren. Vergleichbar mit den Resultaten aus dem mHb zeigte sich, dass die LR-Tiere eine anfängliche Verhaltensinhibition aufwiesen, denn die Latenzen, bis sie das Zentrum und einen bekannten und unbekanntem Stimulus explorierten, war signifikant erhöht im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Aus diesem Grund war auch die Anzahl der Eintritte in das Zentrum der LR-Tieren im ersten 10 Minuten-Intervall erniedrigt. Im zweiten Zeitintervall waren die LR-Tiere deutlich aktiver, während die KO-Tiere deutlich weniger explorierten. Im dritten 10 Minuten-Intervall zeigten beide Gruppen ein vergleichbares exploratives Verhalten. Es erscheint demnach so, als ob die LR-Tiere eine veränderte Strategie zur Erkundung einer unbekanntem Umgebung aufwiesen (s. auch Abb. 45).

Im Vergleich mit der Literatur zeigte sich beim *open field*-Test, dass sehr unterschiedliche Ergebnisse zu finden waren, die vom Design des Testes (Testapparatur, Dauer, Tageszeit, Lichtverhältnisse) und von der Art der physischen Aktivität (freiwillig oder erzwungen) abhingen. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass freiwillige Benutzung eines Laufrades im Gegensatz zu erzwungenem Lauf- und Schwimmtraining zu einer verringerten Aktivität im *open field* führte (Weber & Lee, 1968). Pham et al. (1999) zeigten ebenfalls, dass Tiere, die in einer erweiterten Umgebung (mit Laufrad) gehalten wurden, eine verringerte Aktivität im *open field* aufwiesen. Dishman et al. (1996) zeigten hingegen in Ratten, dass erzwungenes Laufbandtraining zu einer Erniedrigung führte, während freiwillige Nutzung eines Laufrades in einer Erhöhung der Aktivität resultierte. Hoffman et al. (1987) zeigten in spontan hypertensiven Ratten, dass das hyperexplorative Verhalten der Tiere durch freiwilliges Laufen in einem Laufrad erniedrigt war, und sie tendenziell weniger aggressiv waren. Die hier vorliegenden Befunde deuten ebenfalls darauf hin, dass die Impulsivität in den LR-Tieren erniedrigt war.

Es konnte also gezeigt werden, dass die LR-Tiere in den Testparadigmen, die einen weniger aversiven Stimulus darstellten (*open field* und mHb), erhöhte Latenzen

aufwiesen, was generell als erhöhte Ängstlichkeit und Emotionalität gedeutet wird. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse des EPMS und der *dark/light box*. In diesen Tests, die einen aversiveren Stimulus für das Tier darstellen, reagierten die LR-Tiere deutlich weniger ängstlich als die Kontrolltiere, hier war ihre Emotionalität herabgesetzt. Diese Unterschiede in den einzelnen Tests könnten aber auch mit einer veränderten Explorationsstrategie oder einer abgestuften Verhaltensänderung, ausgelöst durch ausdauernde körperliche Aktivität, erklärt werden. Erhielten die LR-Tiere einen weniger starken breitgefächerten Stimulus (*mHb* und *open field*) reagierten sie weniger impulsiv, d. h. sie reagierten nicht mit einer stressstimulierten Aktivität, wie es die Kontrolltiere taten. Dieses Verhalten wurde gerade bei C57BL/6 Mäusen beschrieben. Die anfängliche Inaktivität könnte auch eventuell als „überlegteres Handeln“ gedeutet werden. In diese Richtung weisen auch die meisten im *open field* gefundenen Ergebnisse anderer Gruppen, die von einer erniedrigten Impulsivität der Tiere berichten (Hoffmann et al. 1987; Pham et al. 1999). Die erniedrigte Impulsivität könnte durch Änderungen im serotonergen System zustande gekommen sein (s. unten).

Um diese Unterschiede in der Emotionalität und dadurch bedingte Verhaltensänderungen deutlicher werden zu lassen, benötigen die Tiere eventuell einen stärkeren Stimulus. In den selektiven Tests wie dem EPM oder der *dark/light box* zeigte sich deutlich eine Veränderung beziehungsweise Erniedrigung des Angstverhaltens. In diese Richtung weisen auch diverse Humanstudien, die generell von einem besseren und angstreduzierteren Umgang mit stressvollen Ereignissen, ausgelöst durch regelmäßige sportliche Aktivität, ausgehen (Brooke & Long, 1987; Roth et al., 1989; Steptoe et al., 1989, 1998).

Der anfänglichen Verhaltensinhibition könnten neben der veränderten Explorationsstrategie auch systemische Veränderungen zu Grunde liegen. So konnten Gross et al. (2002) zeigen, dass Mäuse mit deaktiviertem 5-HT_{1A}-Rezeptor unter anderem eine neue Umgebung mit einer erhöhten Latenz explorierten, und auch die Futteraufnahme in einer neuen Umgebung mit einem signifikanten Zeitversatz stattfand, bei Reaktivierung dieses Rezeptors hoben sich diese Effekte auf. Der 5-HT_{1A}-Rezeptor wird, wie auch der 5-HT_{1B}-Autorezeptor, durch ausdauernde körperliche Aktivität desensibilisiert (Seguin et al., 1998; Dwyer & Browning, 2000; Chennaoui et al., 2000). Gleichzeitig führt ausdauernde Bewegung zu einer Erhöhung der 5-HT-Synthese durch eine Erhöhung der Tryptophan-

Konzentration im Gehirn (Chaouloff et al., 1986) und zu einer erhöhten Sekretion von 5-HT (Meeusen et al., 1996; Linthorst et al., 1996). Eine erhöhte Verfügbarkeit von Serotonin im synaptischen Spalt in bestimmten Arealen des Gehirns ist eine der Wirkungen der meisten Antidepressiva. Das sympathische Nervensystem scheint ebenfalls einen Einfluss auf die Impulsivität auszuüben. So wurde gezeigt, dass ausdauernde körperliche Aktivität zu physiologischen Veränderungen führte und die sympathische Aktivität herabgesetzt war, was einen besseren Umgang mit emotionalen Stressoren ermöglichte (Peronnet & Szabo, 1990).

Generell lassen die Ergebnisse aus den unterschiedlichen Verhaltenstests darauf schließen, dass die anfängliche Verhaltensinhibition in den Tests, die einen weniger aversiven Stimulus darstellten, nicht auf einer erhöhten Ängstlichkeit beruht, sondern über eine verminderte Impulsivität, und somit über eine verringerte Emotionalität, erklärt werden kann, denn in den durchgeführten selektiveren Angsttests deutete das Verhalten der Tiere auf einen besseren Umgang mit dieser neuen angstvollen Situation hin. Abschließend kann gesagt werden, dass die Verhaltensänderungen in den LR-Tieren abgestuft moduliert waren, d. h. Kontextabhängig, wie auch die gefundenen Ergebnisse der Plasmakonzentrationen von ACTH und Corticosteron nach der Durchführung verschiedener Stressparadigmen (s. 3.2.1.2) zeigten.

4.6 Schlussbetrachtung

Wie bereits in der Einleitung dargestellt wurde, führt freiwillige körperliche Aktivität zu diversen Veränderungen in einem Organismus. Das generelle Ziel dieser Arbeit war es, den fundamentalen Status der HPA-Achse und ihrer Regulation unter basalen und stressinduzierenden Bedingungen nach vierwöchigem freiwilligen Benutzen eines Laufrades in männlichen C57BL/6N Mäusen zu untersuchen. Weiterhin wurden in diesen Tieren Untersuchungen zum basalen und stressinduzierten Schlaf, zur Neurogenese, zum Einfluss des sympathischen Nervensystems, zu Angst und Emotionalität sowie ein Vergleich mit Antidepressiva behandelten Tieren durchgeführt. Wichtig zu beachten ist, dass es sich um eine freiwillige Aktivität handelt, denn anhand in der Literatur beschriebener Ergebnisse lässt sich ableiten, dass ein erzwungenes und restriktives Training zu ganz anderen HPA-Achsen-Adaptationen führt, da es eher einem chronischen Stress als einer freiwilligen Handlung gleicht.

Es wurde schon häufiger nachgewiesen, dass ausdauernde körperliche Aktivität zu anxiolytischen und antidepressiven Effekten bei depressiven Patienten führt und zu einer Stimmungsanhebung in Kontrollprobanden (Steptoe et al., 1989; Byrne & Byrne, 1993; Salmon, 2001; Dimeo et al., 2001). Die genauen zugrunde liegenden neurobiologischen Mechanismen dieser Effekte sind bis heute noch unklar, aber Parallelen zu den Wirkmechanismen von Antidepressiva existieren. Sowohl Sport als auch Antidepressiva führen bei Patienten zu einer Verbesserung der Symptome von Angststörungen und Depression, erleichtern den Umgang mit Stress und stabilisieren das vegetative Nervensystem (Steptoe et al., 1989; Byrne & Byrne, 1993; Salmon, 2001). In Bezug auf emotionale Prozesse konnte in den hier dargestellten Verhaltensuntersuchungen gezeigt werden, dass ausdauernde Bewegung zu einer Angstreduktion und gleichzeitiger Stabilisierung führte. Dies steht in Übereinstimmung mit humanen Studien, die zeigten, dass aerobe Bewegung zu einer psychischen Stabilisierung gemäß der psychiatrischen Klassifizierung führte (Bahrke & Morgan, 1978; Roth, 1989; Rejeski et al., 1992; Steptoe et al., 1998).

Die meisten depressiven Patienten zeigen deutliche Veränderungen in der Regulation ihrer HPA-Achse, und die heutige Meinung geht dahin, dass eine Normalisierung des neuroendokrinen Systems die Ursache für die Remission von der depressiven Symptomatik ist (zur Übersicht Steckler et al., 1999; Reul et al., 2000a; Reul & Holsboer, 2002). Tierstudien haben gezeigt, dass Langzeitbehandlung mit Antidepressiva zu einer reduzierten HPA-Achsen-Reaktion auf einen milden psychologischen Stressor, wie einer neuen Umgebung, führte, aber keinen Einfluss auf stärkere Stressoren, wie dem erzwungenen Schwimmen, ausübte (Gesing et al., 2000). Es wird deutlich, dass es Parallelen gibt zwischen den Effekten von Antidepressiva und freiwilliger Bewegung in Bezug auf Milderung der durch Stress ausgelösten hormonellen Reaktionen. Sowohl Antidepressiva als auch freiwillige ausdauernde körperliche Aktivität führten zu einer Reduzierung der CRH mRNA-Konzentrationen im PVN.

Parallelen zeigen sich auch in Bezug auf den Schlaf. Während ausdauernde Bewegung zu einer Verbesserung der Schlafqualität führt, denn eine Verlängerung der einzelnen Schlafepisoden und eine Reduzierung des REMS konnte in Übereinstimmung mit humanen Studien festgestellt werden, führt Depression zu einer Fragmentierung des Schlafes mit einem Anstieg an REMS (Kupfer, 1995). Im

Gegenzug bewirken hierbei die meisten Antidepressiva eine Verringerung des REMS (Winokur et al., 2001).

Mittlerweile gibt es erste Untersuchungen, um die durch körperliche Aktivität ausgelösten Effekte auf genetischer und transkriptioneller Ebene zu entschlüsseln. So wurden zum Beispiel die Effekte von ausdauernder Bewegung auf das Gen-Expressionsprofil im Hippokampus von Ratten untersucht. Tong et al. (2001) zeigten, dass 44 der getesteten Gene auf- und 44 abreguliert waren im Vergleich zu Kontrolltieren. Etwa die Hälfte der Gene, die vermehrt gefunden wurden, sind assoziiert mit neuronaler Signaltransduktion und neuronalen Plastizitätsprozessen. Auch hier lässt sich wieder eine Verbindung herstellen, denn Stress führt zu einer Erniedrigung der neuronalen Plastizitätsprozesse, während sowohl Bewegung als auch Antidepressiva sie erhöhen (Gould et al., 1997, 2000; van Praag et al., 1999a; Cotman & Berchthold, 2002).

Im Hinblick auf all diese Parallelen lässt sich spekulieren, dass die antidepressiven und anxiolytischen Effekte sowohl von Sport, als auch von Antidepressiva, überlappende neurobiologische Mechanismen beinhalten, durch die eine dämpfende Wirkung auf die HPA-Achsen-Responsibilität gegenüber einem emotionalen Stress ausgelöst wird. Vielleicht ist es sogar möglich, durch die Erkenntnisse, die mit Hilfe intensiver Erforschung der neurobiologischen Grundlagen der durch ausdauernde körperliche Aktivität ausgelösten Veränderungen gewonnen werden, neue Ausgangspunkte für Antidepressiva und Anxiolytika der Zukunft zu finden.

Referenzen

- Aguilera G, Millan MA, Hauger RL, Catt KJ** (1987) Corticotropin-releasing factor receptors: distribution and regulation in brain, pituitary, and peripheral tissues. *Ann N Y Acad Sci* 512: 48-66.
- Aguilera G** (1994) Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol* 15: 321-350.
- Allen DL, Harrison BC, Maass A, Bell ML, Byrnes WC, Leinwand LA** (2001) Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol* 90: 1900-1908.
- Altman J, Das GD** (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124: 319-335.
- Anisimov VN** (1994) The sole DNA damage induced by bromodeoxyuridine is sufficient for initiation of both aging and carcinogenesis in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 719: 494-501.
- Antipas AJ, Madison DM, Ferraro JS** (1990) Circadian rhythms in the short-tailed shrew, *Blarina brevicauda*. *Physiol Behav* 48: 255-260.
- Aston-Jones G, Ennis M, Pieribone VA, Nickell WT, Shipley MT** (1986) The brain nucleus locus coeruleus: restricted afferent control of a broad efferent network. *Science* 234: 734-737.
- Aston-Jones G, Shipley MT, Chouvet G, Ennis M, van Bockstaele E, Pieribone V, Shiekhatter R, Akaoka H, Drolet G, Astier B** (1991) Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology. *Prog Brain Res* 88: 47-75.
- Bahrke MS, Morgan WP** (1978) Anxiety reduction following exercise and meditation. *Cognit Ther Res* 2: 323-333.
- Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE, Koob GF, Vale WW, Lee KF** (2000) Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nature Genetics* 24: 410-414.
- Banasr M, Hery M, Brezun JM, Daszuta A** (2001) Serotonin mediates oestrogen stimulation of cell proliferation in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 14: 1417-1424.
- Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, Oppliger RA, Gisolfi CV** (1979) Maximal oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. *J Appl Physiol* 47: 1278-1283.
- Behan DP, De Souza EB, Lowry PJ, Potter E, Sawchenko P, Vale WW** (1995) Corticotropin releasing factor (CRF) binding protein: a novel regulator of CRF and related peptides. *Front Neuroendocrinol* 16: 362-382.
- Bequet F, Gomez-Merino D, Berthelot M, Guezennec CY** (2001) Exercise-induced changes in brain glucose and serotonin revealed by microdialysis in rat hippocampus: effect of glucose supplementation. *Acta Physiol Scand* 173: 223-230.
- Berchtold NC, Kesslak JP, Pike CJ, Adlard PA, Cotman CW** (2001) Estrogen and exercise interact to regulate brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein expression in the hippocampus. *Eur J Neurosci* 14: 1992-2002.
- Berlin JA, Colditz GA** (1990) A meta-analysis of physical activity in the prevention of coronary heart disease. *Am J Epidemiol* 132: 612-628.

- Bittencourt JC, Vaughan J, Arias C, Rissman RA, Vale WW, Sawchenko PE** (1999) Urocortin expression in rat brain: evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. *J Comp Neurol* 415: 285-312.
- Bobély AA, Neuhaus HU** (1989) Sleep-deprivation: effects on sleep and EEG in the rat. *J Comp Physiol* 133: 71-87.
- Boonstra R, Galea L, Matthews S, Wojtowicz JM** (2001) Adult neurogenesis in natural populations. *Can J Physiol Pharmacol* 79: 297-302.
- Brady LS, Whitfield Jr. HJ, Fox RJ, Gold PW, Herkenham M** (1991) Long-term antidepressant administration alters corticotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase, and mineralocorticoid receptor gene expression in rat brain. Therapeutic implications. *J Clin Invest* 87: 831-837.
- Brant DH, Kavanau JL** (1964) Unrewarded exploration and learning of complex mazes by wild and domestic mice. *Nature* 204: 267-269.
- Bremner JD, Krystal JH, Southwick SM, Charney DS** (1996) Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: I. Preclinical studies. *Synapse* 23: 28-38.
- Brezun JM, Daszuta A** (1999) Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience* 89: 999-1002.
- Britten RJ, Kohne DE** (1968) Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms. *Science* 161: 529-540.
- Brody AL, Saxena S, Stoessel P, Gillies LA, Fairbanks LA, Alborzian S, Phelps ME, Huang SC, Wu HM, Ho ML, Ho MK, Au SC, Maidment K, Baxter LR, Jr.** (2001) Regional brain metabolic changes in patients with major depression treated with either paroxetine or interpersonal therapy: preliminary findings. *Arch Gen Psychiatry* 58: 631-640.
- Brooke ST, Long BC** (1987) Efficiency of coping with a real-life stressor: a multimodal comparison of aerobic fitness. *Psychophysiology* 24: 173-180.
- Brown DC, Gatter KC** (1990) Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 17: 489-503.
- Bugnon C, Bloch B, Lenys D, Gouget A, Fellmann D** (1979) Comparative study of the neuronal populations containing beta-endorphin, corticotropin and dopamine in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 14: 43-48.
- Burden VR, White BD, Dean RG, Martin RJ** (1993) Activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is elevated in rats with activity-based anorexia. *J Nutr* 123: 1217-1225.
- Byrne A, Byrne DG** (1993) The effect of exercise on depression, anxiety and other mood states: a review. *Journal of Psychosomatic Research* 37: 565-574.
- Calogero AE, Gallucci WT, Chrousos GP, Gold PW** (1988) Catecholamine effects upon rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion in vitro. *J Clin Invest* 82: 839-846.
- Cameron HA, Gould E** (1994) Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* 61: 203-209.
- Cameron HA, McKay RD** (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435: 406-417.
- Carro E, Nunez A, Busiguina S, Torres-Aleman I** (2000) Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *Journal of Neuroscience* 20: 2926-2933.

- Chaouloff F, Elghozi JL, Guezennec Y, Laude D** (1985) Effects of conditioned running on plasma, liver and brain tryptophan and on brain 5-hydroxytryptamine metabolism of the rat. *Br J Pharmacol* 86: 33-41.
- Chaouloff F, Kennett GA, Serrurier B, Merino D, Curzon G** (1986) Amino acid analysis demonstrates that increased plasma free tryptophan causes the increase of brain tryptophan during exercise in the rat. *J Neurochem* 46: 1647-1650.
- Chapillon P, Roullet P** (1996) Use of proximal and distal cues in place navigation by mice changes during ontogeny. *Dev Psychobiol* 29: 529-545.
- Chapillon P, Manneche C, Belzung C, Caston J** (1999) Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. *Behav Genet* 29: 41-46.
- Chen EC, Brzyski RG** (1999) Exercise and reproductive dysfunction. *Fertil Steril* 71: 1-6.
- Chennaoui M, Grimaldi B, Fillion MP, Bonnin A, Drogou C, Fillion G, Guezennec CY** (2000) Effects of physical training on functional activity of 5-HT_{1B} receptors in rat central nervous system: role of 5-HT-moduline. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 361: 600-604.
- Coleman MA, Garland T, Jr., Marler CA, Newton SS, Swallow JG, Carter PA** (1998) Glucocorticoid response to forced exercise in laboratory house mice (*Mus domesticus*). *Physiol Behav* 63: 279-285.
- Collier G, Leshner AI** (1967) An invariant in mouse running wheel behavior. *Psychonom Sci* 8: 9-10.
- Contarino A, Dellu F, Koob GF, Smith GW, Lee KF, Vale W, Gold LH** (1999) Reduced anxiety-like and cognitive performance in mice lacking the corticotropin-releasing factor receptor 1. *Brain Res* 835: 1-9.
- Cooper JJ, Nicol CJ** (1991) Stereotypic behavior affects environmental preferences in bank voles, *Chlethrionomys glareolus*. *Anim Behav* 41: 971-977.
- Cooper JJ, Nicol CJ** (1996) Stereotypic behavior in wild caught and laboratory bred bank voles (*Clethrionomus glareolus*). *Anim Welfare* 5: 245-257.
- Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM** (1989) Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 32: 777-785.
- Coste SC, Kesterson RA, Heldwein KA, Stevens SL, Heard AD, Hollis JH, Murray SE, Hill JK, Pantely GA, Hohimer AR, Hatton DC, Phillips TJ, Finn DA, Low MJ, Rittenberg MB, Stenzel P, Stenzel-Poore MP** (2000) Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nature Genetics* 24: 403-409.
- Cotman CW, Berchtold NC** (2002) Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* 25: 295-301.
- Crawley J, Goodwin FK** (1980) Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 13: 167-170.
- Crawley JE** (1985) Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 9: 37-44.
- Cunningham ET, Jr., Sawchenko PE** (1991) Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. *Trends Neurosci* 14: 406-411.
- Dallman MF, Akana SF, Cascio CS, Darlington DN, Jacobson L, Levin N** (1987) Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. *Rec Prog Horm Res* 43: 113-173.

- Dallman MF, Levin N, Cascio CS, Akana SF, Jacobson L, Kuhn RW** (1989) Pharmacological evidence that the inhibition of diurnal adrenocorticotropin secretion by corticosteroids is mediated via type I corticosterone-preferring receptors. *Endocrinology* 124: 2844-2850.
- Dallman MF, Akana SF, Levin N, Walker CD, Bradbury MJ, Suemaru S, Scribner KS** (1994) Corticosteroids and the control of function in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Ann N Y Acad Sci* 746: 22-31.
- Dautzenberg FM, Hauger RL** (2002) The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol Sci* 23: 71-77.
- Davis C** (1997) Eating disorders and hyperactivity: a psychobiological perspective. *Can J Psychiatry* 42: 168-175.
- De Bellis MD, Gold PW, Geraciotti TD, Jr., Listwak SJ, Kling MA** (1993) Association of fluoxetine treatment with reductions in CSF concentrations of corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin in patients with major depression. *Am J Psychiatry* 150: 656-657.
- de Goeij DC, Kvetnansky R, Whitnall MH, Jezova D, Berkenbosch F, Tilders FJ** (1991) Repeated stress-induced activation of corticotropin-releasing factor neurons enhances vasopressin stores and colocalization with corticotropin-releasing factor in the median eminence of rats. *Neuroendocrinol* 53: 150-159.
- de Kloet ER, Reul JM** (1987) Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. *Psychoneuroendocrinol* 12: 83-105.
- de Kloet ER** (1991) Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. *Front Neuroendocrinol* 12: 95-164.
- de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M** (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews* 19: 269-301.
- de Kock LL, Rohn I** (1971) Observations on the use of the exercise-wheel in relation to the social rank and hormonal conditions in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*), and the Norway lemming (*Lemmus lemmus*). *Z Tierpsychol* 29: 180-195.
- De Souza EB** (1995) Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinol* 20: 789-819.
- Derrick BE, York AD, Martinez JL, Jr.** (2000) Increased granule cell neurogenesis in the adult dentate gyrus following mossy fiber stimulation sufficient to induce long-term potentiation. *Brain Res* 857: 300-307.
- Dimeo F, Bauer M, Varahram I, Proest G, Halter U** (2001) Benefits from aerobic exercise in patients with major depression: a pilot study. *Br J Sports Med* 35: 114-117.
- Dishman RK, Bunnell BN, Youngstedt SD, Yoo HS, Mougey, EH, Meyerhoff JL** (1998) Activity wheel running blunts increased plasma adrenocorticotrophin (ACTH) after footshock and cage-switch stress. *Physiology & Behavior* 63: 911-917.
- Dishman RK, Renner KJ, White-Welkley JE, Burke KA, Bunnell BN** (2000) Treadmill exercise training augments brain norepinephrine response to familiar and novel stress. *Brain Res Bull* 52: 337-342.
- Duclos M, Corcuff JB, Pehourcq F, Tabarin A** (2001) Decreased pituitary sensitivity to glucocorticoids in endurance-trained men. *Eur J Endocrinol* 144: 363-368.

- Duncan JJ, Farr JE, Upton SJ, Hagan RD, Oglesby ME, Blair SM** (1985) The effects of aerobic exercise on plasma catecholamines and blood pressure in patients with mild hypertension. *JAMA* 204: 2609-2613.
- Dunn J, Scheving L, Millet P** (1972) Circadian variation in stress-evoked increases in plasma corticosterone. *Am J Physiol* 223: 402-406.
- Dwyer D, Browning J** (2000) Endurance training in Wistar rats decreases receptor sensitivity to a serotonin agonist. *Acta Physiol Scand* 170: 211-216.
- Ebihara S, Tsuji K** (1976) Strain differences in the mouse's wheel-running behavior. *Jpn Psychol Res* 18: 20-29.
- Edgar DM, Dement WC** (1991) Regularly scheduled voluntary exercise synchronizes the mouse circadian clock. *Am J Physiol* 261: R928-R933.
- Edgar DM, Martin CE, Dement WC** (1991) Activity feedback to the mammalian circadian pacemaker: influence on observed measures of rhythm period length. *J Biol Rhythms* 6: 185-199.
- Enevoldsen LH, Stallknecht B, Fluckey JD, Galbo H** (2000) Effect of exercise training on in vivo lipolysis in intra-abdominal adipose tissue in rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology & Metabolism* 279: E585-E592.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH** (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4: 1313-1317.
- Festing MF** (1977) Wheel activity in 26 strains of mouse. *Lab Anim* 11: 257-258.
- File SE, Wardill AG** (1975) Validity of head dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacologia* 44: 53-59.
- Franken P, Malafosse A, Tafti M** (1999) Genetic determinants of sleep regulation in inbred mice. *Sleep* 22: 155-169.
- Franklin KBJ, Paxinos G**, *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, 1996
- Friess E, Wiedemann K, Steiger A, Holsboer F** (1995) The hypothalamic-pituitary-adrenocortical system and sleep in man. *Adv Neuroimmunol* 5: 111-125.
- Gesing A, Bilang-Bleuel A, Droste SK, Linthorst AC, Holsboer F, Reul JM** (2001) Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels: involvement of corticotropin-releasing hormone. *J Neurosci* 21: 4822-4829.
- Gielen S, Schuler G, Hambrecht R** (2001) Exercise training in coronary artery disease and coronary vasomotion. *Circulation* 103: E1-E6.
- Gillies GE, Linton EA, Lowry PJ** (1982) Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature* 299: 355-357.
- Gispén WH, Wiegant VM, Greven HM, de Wied D** (1975) The induction of excessive grooming in the rat by intraventricular application of peptides derived from ACTH: structure-activity studies. *Life Sci* 17: 645-652.
- Goodrick CL** (1978) Effect of voluntary wheel exercise on food intake, water intake, and body weight for C57BL/6J mice and mutations which differ in maximal body weight. *Physiol Behav* 21: 345-351.
- Gould E** (1994) The effects of adrenal steroids and excitatory input on neuronal birth and survival. *Ann N Y Acad Sci* 743: 73-92.
- Gould E, Cameron HA** (1996) Regulation of neuronal birth, migration and death in the rat dentate gyrus. *Dev Neurosci* 18: 22-35.
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E** (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *Journal of Neuroscience* 17: 2492-2498.

- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E** (1998) Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 3168-3171.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ** (1999) Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2: 260-265.
- Gould E, Tanapat P, Rydel T, Hastings N** (2000) Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. *Biol Psychiatry* 48: 715-720.
- Gratzner HG** (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218: 474-475.
- Gross C, Zhuang X, Stark K, Ramboz S, Oosting R, Kirby L, Santarelli L, Beck S, Hen R** (2002) Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* 416: 396-400.
- Grønli J, Murison R, Bjorvatn B, Portas C, Ursin R** (2002) Sleep/wake effect after chronic mild stress in rats. *J Sleep Res* 11 (Suppl. 1): 87.
- Hall CS** (1934) Emotional behavior in the rat: I Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol* 18: 385-403.
- Hamelink C, Tjurmina O, Damadzic R, Young WS, Weihe E, Lee HW, Eiden LE** (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a sympathoadrenal neurotransmitter involved in catecholamine regulation and glucohomeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 461-466.
- Hammond GL, Smith CL, Paterson NA, Sibbald WJ** (1990) A role for corticosteroid-binding globulin in delivery of cortisol to activated neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 71: 34-39.
- Hammond GL, Smith CL, Underhill DA** (1991) Molecular studies of corticosteroid binding globulin structure, biosynthesis and function. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 40: 755-762.
- Hanagasioglu M, Borbely AA** (1982) Effect of voluntary locomotor activity on sleep in the rat. *Behav Brain Res* 4: 359-368.
- Handley SL, Mithani S** (1984) Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 327: 1-5.
- Hara Y, Battey J, Gainer H** (1990) Structure of mouse vasopressin and oxytocin genes. *Brain Res Mol Brain Res* 8: 319-324.
- Hardman AE** (1996) Exercise in the prevention of atherosclerotic, metabolic and hypertensive diseases: a review. *J Sports Sci* 14: 201-218.
- Harri M, Lindblom J, Malinen H, Hyttinen M, Lapveteläinen T, Eskola S, Helminen HJ** (1999) Effect of access to a running wheel on behavior of C57BL/6J mice. *Laboratory Animal Science* 49: 401-405.
- Hascoet M, Bourin M, Dhonnchadha BA** (2001) The mouse light-dark paradigm: a review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25: 141-166.
- Herman JP, Schäfer MKH, Young EA, Thompson R, Douglass J, Akil H, Watson SJ** (1989) Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *J Neurosci* 9: 3072-3082.
- Heuser I, Yassouridis A, Holsboer F** (1994) The combined dexamethasone/CRH test: a refined laboratory test for psychiatric disorders. *J Psychiatr Res* 28: 341-356.
- Heuser IJ, Schweiger U, Gotthardt U, Schmider J, Lammers CH, Dettling M, Yassouridis A, Holsboer F** (1996) Pituitary-adrenal-system regulation and psychopathology during amitriptyline treatment in elderly depressed patients and normal comparison subjects. *Am J Psychiatry* 153: 93-99.

- Hobson JA** (1999) Neural control of sleep. In: Regulation of sleep and circadian rhythm (Zee PC, Turek FW, eds), pp 81-110. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Hoffmann P, Thoren P, Ely D** (1987) Effect of voluntary exercise on open-field behavior and on aggression in the spontaneously hypertensive rat (SHR). *Behav Neural Biol* 47: 346-355.
- Hogg S** (1996) A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 54: 21-30.
- Holsboer F, Gerken A, Stalla GK, Muller OA** (1987) Blunted aldosterone and ACTH release after human CRH administration in depressed patients. *Am J Psychiatry* 144: 229-231.
- Holsboer F** (1989) Psychiatric implications of altered limbic-hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity. *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci* 238: 302-322.
- Holsboer F, Barden N** (1996) Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocr Rev* 17: 187-205.
- Horne JA** (1981) The effects of exercise upon sleep: a critical review. *Biol Psychol* 12: 241-290.
- Hsu SY, Hsueh AJ** (2001) Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat Med* 7: 605-611.
- Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH, Granholm AC** (2000) Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Experimental Neurology* 164: 45-52.
- Ide K, Schmalbruch IK, Quistorff B, Horn A, Secher NH** (2000) Lactate, glucose and O₂ uptake in human brain during recovery from maximal exercise. *J Physiol* 522 Pt 1: 159-164.
- Ide K, Secher NH** (2000) Cerebral blood flow and metabolism during exercise. *Prog Neurobiol* 61: 397-414.
- Idelman S** (1978) The structure of the mammalian adrenal cortex. In: General, comparative and clinical endocrinology of the adrenal cortex (Jones IC, Henderson IW, eds), pp 1-180. New York: Academic Press.
- Iellamo F** (2001) Neural mechanisms of cardiovascular regulation during exercise. *Auton Neurosci* 90: 66-75.
- Ingle DJ** (1938) The time for the occurrence of cortico-adrenal hypertrophy in rats during continued work. *Am J Physiol* 124: 627-630.
- Jasper MS, Engeland WC** (1994) Splanchnic neural activity modulates ultradian and circadian rhythms in adrenocortical secretion in awake rats. *Neuroendocrinol* 59: 97-109.
- Jonsdottir IH** (2000) Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: neuropeptides and their interaction with exercise and immune function. *Immunol Cell Biol* 78: 562-570.
- Kabbaj M, Piazza PV, Simon H, Lemoal M, Maccari S** (1995) Opposite effects on hippocampal corticosteroid receptors induced by stimulation of beta and alpha 1 noradrenergic receptors. *Neuroscience* 66: 539-545.
- Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM** (2002) The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods* 115: 97-105.
- Kelley AE** (1993) Locomotor activity and exploration. *Methods in behavioral Pharmacology* 10: 499-517.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH** (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386: 493-495.

- Kennedy SH, Evans KR, Kruger S, Mayberg HS, Meyer JH, McCann S, Arifuzzman AI, Houle S, Vaccarino FJ** (2001) Changes in regional brain glucose metabolism measured with positron emission tomography after paroxetine treatment of major depression. *Am J Psychiatry* 158: 899-905.
- Ketter TA, Kimbrell TA, George MS, Dunn RT, Speer AM, Benson BE, Willis MW, Danielson A, Frye MA, Herscovitch P, Post RM** (2001) Effects of mood and subtype on cerebral glucose metabolism in treatment-resistant bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 49: 97-109.
- Kishimoto T, Pearce RV, Lin CR, Rosenfeld MG** (1995) A sauvagine/corticotropin-releasing factor receptor expressed in heart and skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1108-1112.
- Kishimoto T, Radulovic J, Radulovic M, Lin CR, Schrick C, Hooshmaand F, Hermanson O, Rosenfeld MG, Spiess J** (2000) Deletion of *Crh2* reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nature Genet* 24: 415-419.
- Kjær M** (1992) Regulation of hormonal and metabolic responses during exercise in humans. *Exerc Sport Sci Rev* 20: 161-184.
- Kjaer M** (1998) Adrenal medulla and exercise training. *European Journal of Applied Physiology & Occupational Physiology* 77: 195-199.
- Kling AS, Metter EJ, Riege WH, Kuhl DE** (1986) Comparison of PET measurement of local brain glucose metabolism and CAT measurement of brain atrophy in chronic schizophrenia and depression. *Am J Psychiatry* 143: 175-180.
- Kolb B, Pedersen B, Ballermann M, Gibb R, Whishaw IQ** (1999) Embryonic and postnatal injections of bromodeoxyuridine produce age-dependent morphological and behavioral abnormalities. *J Neurosci* 19: 2337-2346.
- Koob GF, Heinrichs SC** (1999) A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. *Brain Research* 848: 141-152.
- Koolhaas JM, Meerlo P, De Boer SF, Strubbe JH, Bohus B** (1997) The temporal dynamics of the stress response. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 775-782.
- Koolhaas JM, De Boer SF, De Rutter AJ, Meerlo P, Sgoifo A** (1997) Social stress in rats and mice. *Acta Physiol Scand Suppl* 640: 69-72.
- Kornack DR, Rakic P** (1999) Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5768-5773.
- Kornack DR, Rakic P** (2001) The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4752-4757.
- Kramer JM, Plowey ED, Beatty JA, Little HR, Waldrop TG** (2000) Hypothalamus, hypertension, and exercise. *Brain Res Bull* 53: 77-85.
- Kubitz KA, Landers DM, Petruzzello SJ, Han M** (1996) The effects of acute and chronic exercise on sleep. A meta-analytic review. *Sports Med* 21: 277-291.
- Kupfer DJ, Sewitch DE, Epstein LH, Bulik C, McGowen CR, Robertson RJ** (1985) Exercise and subsequent sleep in male runners: failure to support the slow wave sleep-mood-exercise hypothesis. *Neuropsychobiology* 14: 5-12.
- Lambert GW, Jonsdottir IH** (1998) Influence of voluntary exercise on hypothalamic norepinephrine. *J Appl Physiol* 85: 962-966.
- LaPerriere A, Ironson G, Antoni MH, Scheiderman N, Klimas N, Fletcher MA** (1994) Exercise and psychoneuroimmunology. *Med Sci Sports Exerc* 26: 182-190.
- Latchman DS** (2002) Urocortin. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 907-910.
- Leshner AI** (1971) The adrenals and the regulatory nature of running wheel activity. *Physiol Behav* 6: 551-558.

- Levenson CW, Moore JB** (1998) Response of rat adrenal neuropeptide Y and tyrosine hydroxylase mRNA to acute stress is enhanced by long-term voluntary exercise. *Neurosci Lett* 242: 177-179.
- Levin BE, Sullivan AC** (1987) Glucose, insulin and sympathoadrenal activation. *J Auton Nerv Syst* 20: 233-242.
- Lewis K, Li C, Perrin MH, Blount A, Kunitake K, Donaldson C, Vaughan J, Reyes TM, Gulyas J, Fischer W, Bilezikjian L, Rivier J, Sawchenko PE, Vale WW** (2001) Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7570-7575.
- Li C, Vaughan J, Sawchenko PE, Vale WW** (2002) Urocortin III-immunoreactive projections in rat brain: partial overlap with sites of type 2 corticotrophin-releasing factor receptor expression. *J Neurosci* 22: 991-1001.
- Liebsch G, Landgraf R, Engelmann M, Lorsch P, Holsboer F** (1999) Differential behavioural effects of chronic infusion of CRH 1 and CRH 2 receptor antisense oligonucleotides into the rat brain. *J Psychiatr Res* 33: 153-163.
- Linthorst AC, Flachskamm C, Holsboer F, Reul JM** (1996) Activation of serotonergic and noradrenergic neurotransmission in the rat hippocampus after peripheral administration of bacterial endotoxin: involvement of the cyclooxygenase pathway. *Neuroscience* 72: 989-997.
- Lovenberg TW, Chalmers DT, Liu CG, Desouza EB** (1995) CRF(2 alpha) and CRF(2 beta) receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology* 136: 4139-4142.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. 265-275.
- Maccari S, Mormède P, Piazza PV, Simon H, Angelucci L, Le Moal M** (1992) Hippocampal type I and type II corticosteroid receptors are modulated by central noradrenergic systems. *Psychoneuroendocrinol* 17: 103-112.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS** (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20: 9104-9110.
- Malendowicz LK, Nussdorfer GG, Trejer M** (1997) Effect of 5-bromo-2'-deoxyuridine on the proliferative activity of thymus and regenerating adrenal cortex. *Life Sci* 61: 641-643.
- McCloskey DP, Adamo DS, Anderson BJ** (2001) Exercise increases metabolic capacity in the motor cortex and striatum, but not in the hippocampus. *Brain Res* 891: 168-175.
- Mech JA** (1994) Environmental enrichment and exploration. *Lab Anim* 28: 38-41.
- Meerlo P, Turek FW** (2001) Effects of social stimuli on sleep in mice: non-rapid-eye-movement (NREM) sleep is promoted by aggressive interaction but not by sexual interaction. *Brain Res* 907: 84-92.
- Meeusen R, Thorre K, Chaouloff F, Sarre S, De Meirleir K, Ebinger G, Michotte Y** (1996) Effects of tryptophan and/or acute running on extracellular 5-HT and 5-HIAA levels in the hippocampus of food-deprived rats. *Brain Res* 740: 245-252.
- Meijer OC, de Kloet ER** (1998) Corticosterone and serotonergic neurotransmission in the hippocampus: functional implications of central corticosteroid receptor diversity. *Crit Rev Neurobiol* 12: 1-20.
- Meinkoth J, Wahl G** (1984) Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal Biochem* 138: 267-284.

- Meredith IT, Jennings GL, Esler MD, Dewar EM, Bruce AM, Fazio VA, Korner PI** (1990) Time course of the antihypertensive and autonomic effects of regular endurance exercise in human subjects. *J Hypertens* 8: 859-866.
- Michelson D, Galliven E, Hill L, Demitrack M, Chrousos G, Gold P** (1997) Chronic imipramine is associated with diminished hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsivity in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 2601-2606.
- Modell S, Yassouridis A, Huber J, Holsboer F** (1997) Corticosteroid receptor function is decreased in depressed patients. *Neuroendocrinol* 65: 216-222.
- Morimoto K, Tan N, Nishiyasu T, Sone R, Murakami N** (2000) Spontaneous wheel running attenuates cardiovascular responses to stress in rats. *Pflugers Arch* 440: 216-222.
- Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman C** (1995) Exercise and brain neurotrophins. *Nature* 373: 109.
- Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW** (1996) Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Research* 726: 49-56.
- Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, Vale W** (1984) Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226: 1342-1344.
- Nestler EJ, McMahon A, Sabban EL, Tallman JF, Duman RS** (1990) Chronic antidepressant administration decreases the expression of tyrosine hydroxylase in the rat locus coeruleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7522-7526.
- Netzer NC, Kristo D, Steinle H, Lehmann M, Strohl KP** (2001) REM sleep and catecholamine excretion: a study in elite athletes. *Eur J Appl Physiol* 84: 521-526.
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS** (1995) Regulation of BDNF and trkb mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* 15: 7539-7547.
- Ohl F, Oitzl MS, Fuchs E** (1998) Assessing cognitive functions in tree shrews: visuo-spatial and spatial learning in the home cage. *Journal of Neuroscience Methods* 81: 35-40.
- Ohl F, Fuchs E** (1999) Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew. *Brain Research Cognitive Brain Research*. 7: 379-387.
- Ohl F, Sillaber I, Binder E, Keck ME, Holsboer F** (2001b) Differential analysis of behavior and diazepam-induced alterations in C57BL/6N and BALB/c mice using the modified hole board test. *J Psychiatr Res* 35: 147-154.
- Ohl F, Holsboer F, Landgraf R** (2001a) The modified hole board as a differential screen for behavior in rodents. *Behav Res Methods Instrum Comput* 33: 392-397.
- Olianas MC, Loi V, Lai M, Mosca E, Onali P** (1993) Corticotropin-releasing hormone stimulates adenylyl cyclase activity in the retinas of different animal species. *Regul Pept* 47: 127-132.
- Opp M** (1995) Corticotropin-releasing hormone involvement in stressor-induced alterations in sleep and in the regulation of waking. *Neuroimmunol* 5: 127-143.
- Pacak K, Palkovits M, Yadid G, Kvetnansky R, Kopin IJ, Goldstein DS** (1998) Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol* 275: R1247-R1255.

- Pagliari R, Peyrin L** (1995) Physical conditioning in rats influences the central and peripheral catecholamine responses to sustained exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 71: 41-52.
- Parkes DG, Weisinger RS, May CN** (2001) Cardiovascular actions of CRH and urocortin: an update. *Peptides* 22: 821-827.
- Pedersen BK, Hoffman-Goetz L** (2000) Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiological Reviews* 80: 1055-1081.
- Perlman RL, Chalfie M** (1977) Catecholamine release from the adrenal medulla. *Clin Endocrinol Metab* 6: 551-576.
- Pernow J, Schwieler J, Kahan T, Hjelmdahl P, Oberle J, Wallin BG, Lundberg JM** (1989) Influence of sympathetic discharge pattern on norepinephrine and neuropeptides Y release. *Am J Physiol* 257: H866-H872.
- Peronnet F, Szabo A** (1990) 7. Sympathetic Response to acute psychosocial stressors in humans: Linkage to physical exercise and Training. pp 172-217.
- Perrin M, Donaldson C, Chen R, Blount A, Berggren T, Bilezikjian L, Sawchenko P, Vale W** (1995) Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2969-2973.
- Perrin MH, Donaldson CJ, Chen R, Lewis KA, Vale WW** (1993) Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor. *Endocrinology* 133: 3058-3061.
- Petrov T, Krukoff TL, Jhamandas JH** (1993) Branching projections of catecholaminergic brainstem neurons to the paraventricular hypothalamic nucleus and the central nucleus of the amygdala in the rat. *Brain Res* 609: 81-92.
- Pham TM, Ickes B, Albeck D, Soderstrom S, Granholm AC, Mohammed AH** (1999) Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. *Neuroscience* 94: 279-286.
- Plotsky PM, Cunningham ET, Jr., Widmaier EP** (1989) Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endocr Rev* 10: 437-458.
- Raadsheer FC, Hoogendijk WJ, Stam FC, Tilders FJ, Swaab DF** (1994) Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinol* 60: 436-444.
- Raadsheer FC, van Heerikhuize JJ, Lucassen PJ, Hoogendijk WJ, Tilders FJ, Swaab DF** (1995) Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in the paraventricular nucleus of patients with Alzheimer's disease and depression. *Am J Psychiatry* 152: 1372-1376.
- Rahmouni K, Barthelmebs M, Imbs JL, De Jong W** (1998) Brain mineralocorticoid receptor and blood pressure control in the conscious normotensive rat. *Arch Mal Coeur Vaiss* 91: 1009-1012.
- Rakic P** (2002) Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nat Rev Neurosci* 3: 65-71.
- Rejeski WJ, Thompson A, Brubaker PH, Miller HS** (1992) Acute exercise: buffering psychosocial stress responses in women. *Health Psychol* 11: 355-362.
- Reul JM, de Kloet ER** (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117: 2505-2511.

- Reul JM, van den Bosch FR, de Kloet ER** (1987) Relative occupation of type-I and type-II corticosteroid receptors in rat brain following stress and dexamethasone treatment: functional implications. *Journal of Endocrinology* 115: 459-467.
- Reul JM, Tonnaer JA, de Kloet ER** (1988) Neurotrophic ACTH analogue promotes plasticity of type I corticosteroid receptor in brain of senescent male rats. *Neurobiol Aging* 9: 253-260.
- Reul JM, Soder M, Holsboer F** (1992) The hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) system and anti-depressive drug (AD) action. *Clinical Neuropharmacology* 15 Suppl 1 Pt A: 584A-585A.
- Reul JM, Stec I, Soder M, Holsboer F** (1993) Chronic treatment of rats with the antidepressant amitriptyline attenuates the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Endocrinology* 133: 312-320.
- Reul JM, Labeur MS, Grigoriadis DE, De Souza EB, Holsboer F** (1994) Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis changes in the rat after long-term treatment with the reversible monoamine oxidase-A inhibitor moclobemide. *Neuroendocrinol* 60: 509-519.
- Reul JM, Bilang-Bleuel A, Droste S, Linthorst AC, Holsboer F, Gesing A** (2000a) New mode of hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis regulation: significance for stress-related disorders. *Z Rheumatol* 59 Suppl 2: II/22-II/25.
- Reul JM, Gesing A, Droste S, Stec IS, Weber A, Bachmann C, Bilang-Bleuel A, Holsboer F, Linthorst AC** (2000b) The brain mineralocorticoid receptor: greedy for ligand, mysterious in function. *Eur J Pharmacol* 405: 235-249.
- Reul JM, Holsboer F** (2002) Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Curr Opin Pharmacol* 2: 23-33.
- Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, Kunitake KS, Vaughan J, Arias CA, Hogenesch JB, Gulyas J, Rivier J, Vale WW, Sawchenko PE** (2001) Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2843-2848.
- Rivier C, Vale W** (1983a) Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature* 305: 325-327.
- Rivier C, Vale W** (1983b) Interaction of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin on adrenocorticotropin secretion in vivo. *Endocrinology* 113: 939-942.
- Roth DL** (1989) Acute emotional and psychophysiological effects of aerobic exercise. *Psychophysiology* 26: 593-602.
- Russo-Neustadt A, Beard RC, Cotman CW** (1999) Exercise, antidepressant medications, and enhanced brain derived neurotrophic factor expression. *Neuropsychopharmacology* 21: 679-682.
- Russo-Neustadt AA, Beard RC, Huang YM, Cotman CW** (2000) Physical activity and antidepressant treatment potentiate the expression of specific brain-derived neurotrophic factor transcripts in the rat hippocampus. *Neuroscience* 101: 305-312.
- Salmon P** (2001) Effects of physical exercise on anxiety, depression, and sensitivity to stress: a unifying theory. *Clin Psychol Rev* 21: 33-61.
- Sapolsky RM, McEwen BS** (1985) Down-regulation of neural corticosterone receptors by corticosterone and dexamethasone. *Brain Res* 339: 161-165.

- Sawchenko PE, Swanson LW, Vale WW** (1984) Corticotropin-releasing factor: co-expression within distinct subsets of oxytocin-, vasopressin-, and neurotensin-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the male rat. *J Neurosci* 4: 1118-1129.
- Sawchenko PE, Swanson LW** (1985) Localization, colocalization, and plasticity of corticotropin-releasing factor immunoreactivity in rat brain. *Federation Proceedings* 44: 221-227.
- Scatchard G** (1949) The attractions of proteins for small ions and molecules. *Ann N Y Acad Sci* 51.
- Schmidt KN, Gosselin LE, Stanley WC** (1992) Endurance exercise training causes adrenal medullary hypertrophy in young and old Fischer 344 rats. *Horm Metab Res* 24: 511-515.
- Seckl JR, Fink G** (1992) Antidepressants increase glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in rat hippocampus *in vivo*. *Neuroendocrinol* 55: 621-626.
- Seguin L, Liscia P, Guezennec Y, Fillion G** (1998) Effects of moderate and intensive training on functional activity of central 5-HT_{1B} receptors in the rat substantia nigra. *Acta Physiol Scand* 162: 63-68.
- Selye H** (1946) The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Clin Endocrinol* 6: 117-230.
- Selye H** (1985) The nature of stress. *Basal Facts* 7: 3-11.
- Seward JP, Pereboom AC** (1955) A note on the learning of 'spontaneous' activity. *Am J Psychol* 68: 139-142.
- Sherwin CM** (1998) Voluntary wheel running: a review and novel interpretation. *Anim Behav* 56: 11-27.
- Shores MM, White SS, Veith RC, Szot P** (1999) Tyrosine hydroxylase mRNA is increased in old age and norepinephrine uptake transporter mRNA is decreased in middle age in locus coeruleus of Brown-Norway rats. *Brain Res* 826: 143-147.
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E** (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410: 372-376.
- Sinyor D, Schwartz SG, Peronnet F, Brisson G, Seraganian P** (1983) Aerobic fitness level and reactivity to psychosocial stress: physiological, biochemical, and subjective measures. *Psychosom Med* 45: 205-217.
- Skelton KH, Nemeroff CB, Knight DL, Owens MJ** (2000) Chronic administration of the Triazolobenzodiazepine alprazolam produces opposite effects on corticotropin-releasing factor and urocortin neuronal systems. *J Neurosci* 20: 1240-1248.
- Smith CL, Hammond GL** (1992) Hormonal regulation of corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the male rat. *Endocrinology* 130: 2245-2251.
- Solberg LC, Horton TH, Turek FW** (1999) Circadian rhythms and depression: effects of exercise in an animal model. *Am J Physiol* 276: R152-R161.
- Sorg O, Magistretti PJ** (1991) Characterization of the glycogenolysis elicited by vasoactive intestinal peptide, noradrenaline and adenosine in primary cultures of mouse cerebral cortical astrocytes. *Brain Res* 563: 227-233.
- Sothmann MS, Buckworth J, Claytor RP, Cox RH, White-Welkley JE, Dishman, RK.** (1996) Exercise training and the cross-stressor adaptation hypothesis. *Exercise & Sport Sciences Reviews* 24: 267-287.

- Stallknecht B, Kjær M, Ploug T, Maroun L, Ohkuwa T, Vinten J, Mikines KJ, Galbo H** (1990) Diminished epinephrine response to hypoglycemia despite enlarged adrenal medulla in trained rats. *Am J Physiol* 259: R998-R1003.
- Starzec JJ, Berger DF, Hesse R** (1983) Effects of stress and exercise on plasma corticosterone, plasma cholesterol and aortic cholesterol levels in rats. *Psychosom Med* 45: 219-226.
- Steckler T, Holsboer F** (1999) Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion. *Biological Psychiatry* 46: 1480-1508.
- Steptoe A, Edwards S, Moses J, Mathews A** (1989) The effects of exercise training on mood and perceived coping ability in anxious adults from the general population. *J Psychosom Res* 33: 537-547.
- Steptoe A, Kimbell J, Basford P** (1998) Exercise and the experience and appraisal of daily stressors: a naturalistic study. *J Behav Med* 21: 363-374.
- Stewart CC** (1898) Variations in daily activity produced by alcohol and by barometric pressure and diet with a description of recording methods. *Am J Physiol* 1: 40-56.
- Takahashi LK** (2001) Role of CRF(1) and CRF(2) receptors in fear and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 627-636.
- Tanapat P, Galea LA, Gould E** (1998) Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *Int J Dev Neurosci* 16: 235-239.
- Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK, Blanquet V, Steckler T, Holsboer F, Wurst W** (1998) Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nature Genet* 19: 162-166.
- Tong L, Shen H, Perreau VM, Balazs R, Cotman CW** (2001) Effects of exercise on gene-expression profile in the rat hippocampus. *Neurobiol Dis* 8: 1046-1056.
- Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I** (2001) Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 21: 1628-1634.
- Turek FW** (1994) Circadian rhythms. *Recent Prog Horm Res* 49: 43-90.
- Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J** (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213: 1394-1397.
- Valentino RJ, Curtis AL** (1991) Antidepressant interactions with corticotropin-releasing factor in the noradrenergic nucleus locus coeruleus. *Psychopharmacol Bull* 27: 263-269.
- Valentino RJ, Page M, van Bockstaele E, Aston-Jones G** (1992) Corticotropin-releasing factor innervation of the locus coeruleus region: distribution of fibers and sources of input. *Neuroscience* 48: 689-705.
- Valentino RJ, Foote SL, Page ME** (1993) The locus coeruleus as a site for integrating corticotropin-releasing factor and noradrenergic mediation of stress responses. *Ann N Y Acad Sci* 697: 173-188.
- Van de Weerd HA, Baumans V, Koolhaas JM, Van Zutphen LF** (1994) Strain specific behavioural response to environmental enrichment in the mouse. *J Exp Anim Sci* 36: 117-127.
- Van den Berg DTWM, de Kloet ER, Van Dijken HH, De Jong W** (1990) Differential central effects of mineralocorticoid and glucocorticoid agonists and antagonists on blood pressure. *Endocrinol* 126: 118-124.
- van Gaalen MM, Stenzel-Poore MP, Holsboer F, Steckler T** (2002) Effects of transgenic overproduction of CRH on anxiety-like behaviour. *Eur J Neurosci* 15: 2007-2015.

- Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RKW, Li H-Y, Arias C, Prins GS, Perrin M, Vale W, Sawchenko PE** (2000) Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol* 428: 191-212.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH** (1999a) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neuroscience* 2: 266-270.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH** (1999b) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 13427-13431.
- Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C, Rivier J, Sawchenko PE, Vale W** (1995) Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 378: 287-292.
- Vazquez DM, Van Oers H, Levine S, Akil H** (1996) Regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNAs in the hippocampus of the maternally deprived infant rat. *Brain Res* 731: 79-90.
- Vissing J, Andersen M, Diemer NH** (1996) Exercise-induced changes in local cerebral glucose utilization in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 729-736.
- von Bardeleben U, Stalla GK, Muller OA, Holsboer F** (1988) Blunting of ACTH response to human CRH in depressed patients is avoided by metyrapone pretreatment. *Biol Psychiatry* 24: 782-786.
- von Bardeleben U, Holsboer F** (1988) Human corticotropin releasing hormone: clinical studies in patients with affective disorders, alcoholism, panic disorder and in normal controls. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 12 Suppl: S165-S187.
- Watanabe T, Morimoto A, Sakata Y, Wada M, Murakami N** (1991) The effect of chronic exercise on the pituitary-adrenocortical response in conscious rats. *J Physiol* 439: 691-699.
- Watanabe T, Morimoto A, Sakata Y, Tan N, Morimoto K, Murakami N** (1992) Running training attenuates the ACTH responses in rats to swimming and cage-switch stress. *J Appl Physiol* 73: 2452-2456.
- Weicker H, Struder HK** (2001) Influence of exercise on serotonergic neuromodulation in the brain. *Amino Acids* 20: 35-47.
- Welsh DK, Richardson GS, Dement WC** (1988) Effect of running wheel availability on circadian patterns of sleep and wakefulness in mice. *Physiol Behav* 43: 771-777.
- Weninger SC, Peters LL, Majzoub JA** (2000) Urocortin expression in the Edinger-Westphal nucleus is up-regulated by stress and corticotropin-releasing hormone deficiency. *Endocrinology* 141: 256-263.
- Whitnall MH, Mezey E, Gainer H** (1985) Co-localization of corticotropin-releasing factor and vasopressin in median eminence neurosecretory vesicles. *Nature* 317: 248-250.
- Williams AM, Nguyen ML, Morilak DA** (1997) Co-localization of alpha1D adrenergic receptor mRNA with mineralocorticoid and glucocorticoid receptor mRNA in rat hippocampus. *J Neuroendocrinol* 9: 113-119.
- Willner P, Muscat R, Papp M** (1992) Chronic mild stress-induced anhedonia. a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 16: 525-534.

- Winder WW, Hagberg JM, Hickson RC, Ehsani AA, McLane JA (1978)** Time course of sympathoadrenal adaptation to endurance exercise training in man. *J Appl Physiol* 45: 370-374.
- Winokur A, Gary KA, Rodner S, Rae-Red C, Fernando AT, Szuba MP (2001)** Depression, sleep physiology, and antidepressant drugs. *Depression Anxiety* 14: 19-28.
- Wittling W, Block A, Schweiger E, Genzel S (1998)** Hemisphere asymmetry in sympathetic control of the human myocardium. *Brain Cogn* 38: 17-35.
- Wittling W (2001)** Brain asymmetry in the control of the stress response. In: *Emotional behavior and its disorders* (Gainotti G, ed), pp 207-233. Elsevier Science B.V.
- Zee PC, Turek FW (1999)** Introduction to sleep and circadian rhythm. In: *Regulation of sleep and circadian rhythm* (Zee PC, Turek FW, eds), pp 1-18. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Zobel AW, Yassouridis A, Frieboes RM, Holsboer F (1999)** Prediction of medium-term outcome by cortisol response to the combined dexamethasone-CRH test in patients with remitted depression. *Am J Psychiatry* 156: 949-951.
- Zobel AW, Nickel T, Kunzel HE, Ackl N, Sonntag A, Ising M, Holsboer F (2000)** Effects of the high-affinity corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist R121919 in major depression: the first 20 patients treated. *J Psychiatr Res* 34: 171-181.

Danken möchte ich an dieser Stelle

Herrn Prof. Dr. Dr. F. Holsboer dafür, dass er mir die Durchführung meiner Untersuchungen am Max-Planck-Institut für Psychiatrie ermöglicht hat.

Herrn Prof. Dr. R. Landgraf für seine Bereitschaft mich als Erstgutachter zu betreuen.

Herrn Prof. Dr. G. Neuweiler von der Ludwig-Maximilians-Universität für seine Bereitschaft die Aufgabe des Zweitgutachters zu übernehmen.

Herrn Dr. J.M.H.M. Reul, Leiter der Arbeitsgruppe Neuropsychopharmakologie und Betreuer meiner Arbeit. Er hat mir durch seinen Enthusiasmus und seine Fähigkeit „über den Tellerrand zu schauen“ tiefe Einblicke in die Zusammenhänge der Neurobiologie und der Wissenschaft im Allgemeinen gegeben. Er war immer offen für meine Ideen und gab Hilfestellung bei deren Umsetzung.

Frau Dr. A.C.E. Linthorst dafür, dass sie mir immer hilfsbereit zur Seite gestanden hat, dies besonders bei Statistikfragen.

Frau Dr. M. Lancel für die gute Zusammenarbeit, denn ohne sie wären die Schlafuntersuchungen nicht möglich gewesen.

Frau Dr. F. Ohl für die gute ideenreiche Zusammenarbeit bei der Planung und Durchführung der Verhaltensstudien. Insbesondere Elke Binder, die mich bei der Durchführung der Verhaltensuntersuchungen tatkräftig unterstützte und immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Frau Dr. A. Gesing, die mir mit viel Geduld und guter Laune in meiner Anfangszeit half, mich sowohl im Labor als auch im gesamten Institut zurecht zu finden.

Sabine Ulbricht dafür, dass sie immer zur Stelle war und mir hilfreich zur Seite stand, auch wenn es nicht „brannte“.

Frau Dr. A. Bilang-Bleuel dafür, dass sie mich in die Welt der Neurogenese und der Mikroskop-Fotografie eingeweiht hat.

Marjolein Beekman und Frau Dr. R. Peñalva dafür, dass sie mir bei allen aufkommenden Fragen und Problemen hilfreich zur Seite gestanden haben.

Meinem „Allround-Assistenten“ Martin Schweizer, der es immer schaffte mit seinem sonnigen Gemüt und viel Geduld aus einer schlechten Laune eine gute zu machen.

Ferner allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppen Reul und Linthorst, die mich während der letzten drei Jahre begleitet haben, und mit denen ich viel Spaß und abwechslungsreiche Momente erleben durfte.

Nicht zuletzt ganz herzlich meinen Eltern, ohne deren Geduld und Unterstützung diese Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

26.11.1972	geboren in Frankfurt am Main
1979-1983	Grundschule Geschwister Scholl in Niddatal-Assenheim
1983-1992	Gymnasium St. Lioba in Bad Nauheim
1993-1995	Grundstudium der Biologie an der Johann Wolfgang von Goethe Universität in Frankfurt
1995-1999	Hauptstudium der Biologie an der Universität Rostock
1998-1999	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe „Umweltphysiologie“ an der Universität Rostock mit dem Thema „Wirkungen niederfrequenter elektromagnetischer Felder auf die Phagozytose in murinen Knochenmarksmakrophagen“
1999-2003	Promotionsarbeit in der Arbeitsgruppe „Neuro- psychopharmakologie“ zum Thema „Untersuchungen zu Änderungen der Hypothalamus-Hypophysen- Nebennierenrinden-Achse, des Schlafes und des Verhaltens bei Mäusen unter basalen und stressinduzierenden Bedingungen nach freiwilliger Benutzung eines Laufrades“

Veröffentlichungen

S. Droste, D.G. Weiss, M. Simkó: Influence on phagocytosis, intracellular transport, TPA-stimulation and free radical production in mouse bone marrow-derived macrophages after exposure to electromagnetic fields. Eur J Cell Biol Suppl. 49: 275 (1999)

J.M.H.M. Reul, A. Gesing, S. Droste, I.S.M. Stec, A. Weber, C. Bachmann, A. Bilanz-Bleuel, Florian Holsboer, Astrid C.E. Linthorst: The brain mineralocorticoid receptor: greedy for ligand, mysterious in function. Eur J Pharmacol 405: 235-249 (2000)

J.M.H.M. Reul, A. Bilanz-Bleuel, S. Droste, A.C.E. Linthorst, F. Holsboer, A. Gesing: New mode of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis regulation: significance for stress-related disorders. Z Rheumatol 59: Suppl 2: 22-25 (2000)

A. Gesing, A. Bilanz-Bleuel, S.K. Droste, A.C.E. Linthorst, F. Holsboer, J.M.H.M. Reul: Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels: involvement of corticotropin-releasing hormone. J Neurosci 21(13): 4822-4829 (2001)

M. Simko, S. Droste, R. Kriehuber, D.G. Weiss: Stimulation of phagocytosis and free radical production in murine macrophages by 50 Hz electromagnetic fields; Eur J Cell Biol 80(8): 562-566 (2001)