

**Vasopressin in der Pathophysiologie von Stress, Angst und Kognition:
Verhaltensbiologische und molekular-genetische Untersuchungen am
HAB/LAB/NAB-Rattenmodell**

Dissertation
im Fachbereich Neurobiologie
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Elisabeth Frank

am 30. Juni 2006

„If you talk to god, that's a prayer.
If god talks back to you, that's schizophrenia.“

Oscar Cruz

Erstgutachter: Prof. Dr. Rainer Landgraf

Zweitgutachter: Prof. Dr. Gerd Schuller

Datum der mündlichen Prüfung: 21. November 2006

Kurzbeschreibung

Das Neuropeptid Vasopressin (AVP) ist zentral an der Ausprägung von Emotionalität, Kognition und der HPA-Achsen-Aktivität im Kontinuum von physiologischer Funktion bis hin zu pathophysiologischer Dysfunktion beteiligt. Vorliegende Studien untersuchen die Rolle des vasopressinergen Systems in der Vulnerabilität für und in der Genese von Psychopathologien an einem etablierten Rattenmodell für Angsterkrankungen sowie komorbid depressionsbezogene und dysfunktionale neuroendokrine Parameter.

Die verhaltensbiologische Charakterisierung zeigte dabei weitere Facetten des Tiermodells in der Reflexion von psychopathologischen Erscheinungsbildern wie Anhedonie sowie erhöhte Stressvulnerabilität und fehlregulierte Kognition im sozialen Kontext. Neben der Etablierung eines neuartigen Phänomens der HPA-Achsen-Regulierung im Zusammenhang mit der Bewältigung von sozialem Stress konnte die pathologisch überdurchschnittliche soziale Kognitionsleistung grundlegend auf das septale AVP-System zurückgeführt werden. Die Untersuchungen zur Ausprägung des im Rattenmodell vorliegenden psychopathologischen angst- und depressionsbezogenen Verhaltens bestätigten die zentrale Rolle anxiogenen AVPs. Während neuropeptiderge Kandidaten für die extrazelluläre Regulation des hypothalamischen AVP-Systems identifiziert werden konnten, war kein quantitativer Einfluss eines mutierten AVP-Gens *per se* in transgen gezüchteten Tieren wie auch in einer frei segregierenden F2-Generation nachzuweisen.

Kurzbeschreibung	i
I. Einleitung	1
Die Psychopathologie von Stress: Angststörungen und affektive Erkrankungen	1
Die HAB/LAB-Zucht	9
Das Nonapeptid Vasopressin (AVP)	12
II. Material und Methoden	14
Versuchstiere und Haltung.....	14
Verhaltenstests	15
<i>Elevated plusmaze</i> -Test (EPM).....	15
<i>Forced swim</i> -Test (FS)	15
Ultraschallvokalisations-Test (USV)	16
<i>Elevated platform</i> -Exposition (EPF).....	17
<i>Social Discrimination</i> -Test (SDis).....	18
<i>Social defeat</i> -Exposition (SD)	18
<i>Dark-light box</i> -Test (DaLi)	19
Verhalten im Heimkäfig.....	20
Trinkverhalten.....	21
Invasive Methoden.....	21
Blutgewinnung durch mehrfache Blutentnahme per Jugularvenenkatheter	21
Blutgewinnung aus Dekapitationsblut	22
Akute Substanzapplikation per Glasfaserkanüle	22
Implantation einer Führungskanüle	23
Mikrodialyse des <i>Nucleus paraventricularis</i> (PVN)	24
Analytik und Histologie	25
Histologische Lokalisationskontrolle.....	25
<i>In situ</i> -Hybridisierung (ISH)	26

Perfusion.....	28
Fos-Expression.....	28
ACTH- und CORT-Bestimmung über Radio-Immuno-Assays.....	29
AVP- und Oxytocin-Bestimmung.....	30
Genotypisierung.....	30
Statistik.....	32

III. Projekte **33**

A. Charakterisierung der HAB/LAB-Zucht **33**

1. Das soziale Gedächtnis von HAB- und LAB-Ratten: eine <i>social discrimination</i> -Studie.....	33
2. Neuroendokrine und neuronale Aktivität in HAB/LAB-Tieren in Reaktion auf <i>social defeat</i>	37
3. Trinkverhalten von HAB-/LAB-Ratten und Anhedonie im Zuckerkonsumtest.....	46
4. <i>In situ</i> -Hybridisierung und Immunohistochemie von AVP in HAB-, LAB-, F1- und NAB-Ratten.....	51
5. Intrazelluläre Einflüsse auf die AVP-Expression: CBF-A <i>in situ</i> -Hybridisierung im PVN von HAB- und LAB-Ratten.....	57
6. Extrazelluläre Einflüsse auf die AVP-Expression: Mikrodialyse von Neurotransmittern im PVN von HAB- und LAB-Ratten.....	62

B. Manipulation des AVP-Systems in HAB-, LAB- und NAB-Ratten **69**

1. Effekte der Manipulation des AVP-Systems im Septum auf das soziale Gedächtnis von HAB-, NAB- und LAB-Ratten.....	69
1. 1. Suppression des septalen AVP-Systems via <i>antisense</i> -Behandlung des BNST von HAB- und LAB-Ratten: Kognition und Angstverhalten.....	69
1. 2. Überexpression von V1a-Rezeptoren im Septum von NAB-Ratten: eine <i>social discrimination</i> -Studie.....	75
2. Effekte der Manipulation des AVP-Systems im PVN auf das Angstverhalten von HAB- und LAB-Ratten.....	81

2. 1. Suppression des hypothalamischen AVP Systems via <i>antisense</i> - Behandlung des PVN von HAB-Ratten.....	81
2. 2. Intracerebrale Gabe von AVP in LAB-Ratten: Angstverhalten sowie Validierung der <i>elevated platform</i>	85
2. 3. Überexpression von AVP im PVN von LAB-Ratten: Angstverhalten, neuroendokrine und physiologische Parameter	89
C. Zuchtprojekte.....	97
1. Zucht transgener HAB/LAB-Ratten durch <i>backcrossing</i>	97
2. Untersuchung einer kreuzgezüchteten F1- und frei segregierenden F2-Generation aus HAB- und LAB-Ratten	120
IV. Zusammenfassung	131
Abkürzungsverzeichnis.....	133
V. Literaturverzeichnis	134

I. Einleitung

Die Psychopathologie von Stress: Angststörungen und affektive Erkrankungen

Die Homöostase der physiologischen Prozesse seines Körpers ist die Überlebensgrundlage jedes Lebewesens. Ihre Aufrechterhaltung bzw. deren Wiedererlangen ist von so zentraler Bedeutung, dass die Evolution Organismen dafür mit einer großen Vielfalt an Systemen ausgestattet hat. Diese erlauben den Individuen, die Balance aller körpereigenen Prozesse in einem Rahmen zu halten, in dem Leben möglich ist. Die physiologische und/oder psychologische Reaktion des Körpers auf innere oder äußere Einflüsse, die die Homöostase bedrohen oder stören, wird als Stress bezeichnet. Die Stressreaktion erlaubt zumeist eine Beibehaltung oder Wiederherstellung der Homöostase und bewahrt den Körper vor Schaden (Tsigos und Chrousos, 2002). Der Begriff „Stress“ (engl.: Druck, Anspannung), entlehnt aus der Werkstoffkunde, wurde von Selye 1936 umschrieben, um in der Psychologie eine „unspezifische Reaktion des Körpers auf jegliche Anforderung“ zu benennen (Neylan, 1998). Nach Chrousos (1998) können Stressoren in drei Klassen eingeteilt werden: rein physiologische, physiologische mit psychologischer Komponente und psychologische Stressoren. Während erstere die physische Beeinträchtigung des Körpers bezeichnen, sind die beiden letzteren durch eine psychologische, zentralnervöse Bewertung eines körperbeeinträchtigenden bzw. den Körper nicht direkt tangierenden Stressors gekennzeichnet (Tsigos und Chrousos, 2002). Diesem anthropozentrischen Ansatz wurde eine alternative Klassifikation von Stressoren gegenübergestellt. So bezeichnen *real threats* („reale Gefährdungen“, d.h. systemische Stressoren wie Schmerz, Entzündungen oder Blutdruckveränderungen) Stressoren, die die Homöostase *de facto* beeinträchtigen. Im Gegensatz dazu rufen *predicted threats* („erwartete Gefährdungen“, d.h. neurogene Stressoren wie die Antizipation oder Rezeption von Gefahr) eine Aktivierung des Stresssystems ohne direkte physiologische Beeinträchtigung hervor (Details dazu in Engelmann et al. (2004)).

Zu den wichtigsten „Stresskontrollsystemen“ des Körpers gehört neben dem Sympathikus-Nebennierenmark-System, mit Adrenalin als Effektor, die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (*hypothalamus-pituitary-adrenocortical-axis*; HPA-Achse), mit Cortisol

als Endglied (Abb. 1; Herman et al., 1996; Klinke und Silbernagel, 2000; Tsigos und Chrousos, 2002; de Kloet et al., 2005).

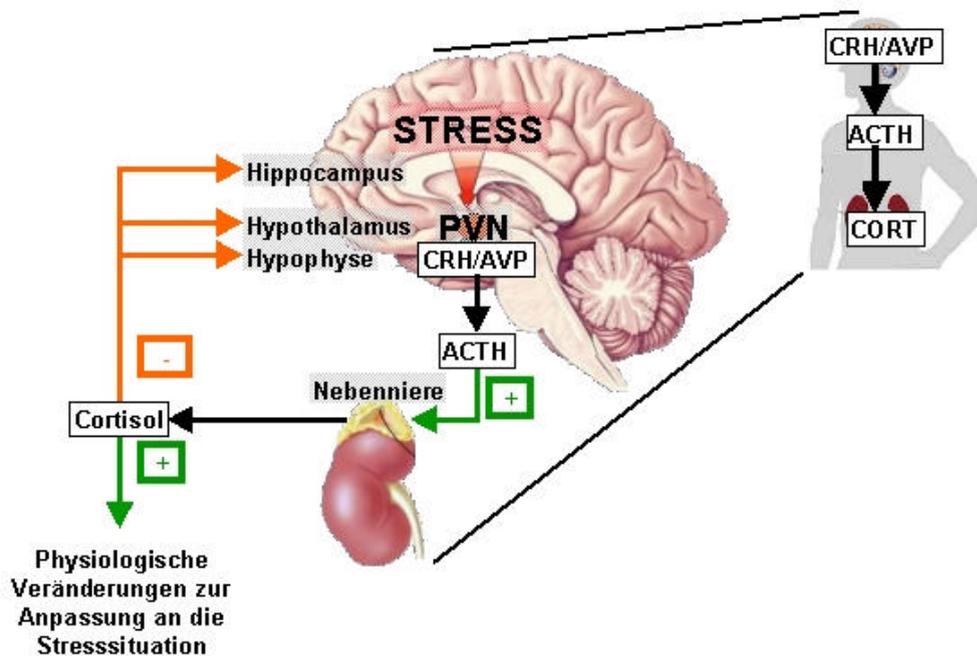


Abbildung 1. Schematischer Überblick über Lage und Funktion der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse.
ACTH Adrenocorticotropin; AVP Arginin-Vasopressin; CRH *Corticotropin releasing* Hormon; PVN paraventriculärer Nucleus des Hypothalamus.

Als Integrationsort der zentralnervösen Verarbeitung von Stress und als zentrales Steuerelement der HPA-Achse fungiert der *Nucleus paraventricularis* (PVN) im Hypothalamus (Herman et al., 2002). Das an den 3. Ventrikel angrenzende, paarig angelegte Kerngebiet vermittelt im Rahmen der neuroendokrinen Stressantwort die Verbindung zu den peripheren Organen (Nebennieren, Herz-Kreislaufsystem etc.). Der PVN wird auf Grund der Größe seiner Zellen in mehrere Subregionen unterteilt (Kiss et al., 1991). Insbesondere die parvozelluläre und magnozellanuläre Region wird cytoarchitektonisch und funktionell unterschieden (Herman et al., 2002). Die unmittelbare Aktivierung der HPA-Achse erfolgt vorwiegend durch die parvozellulären Neuronen, die dabei jedoch mit allen anderen Bereichen des PVN interagieren (Charmandari et al., 2005). In deren Somata werden u.a. die beiden Peptide *Corticotropin releasing*-Hormon (CRH) und Arginin-Vasopressin (AVP) exprimiert. In Vesikeln zu den Axonterminalen in der *Eminentia mediana* der Hypophyse transportiert, werden die *releasing*-Hormone dort in das hypophysäre Pfortadersystem sezerniert. Durch die Stimulation von corticotropen Zellen in der Adenohypophyse führt die CRH/AVP-Ausschüttung zur Sekretion des primären peripheren Stresshormons, dem adrenocorticotropen Hormon (ACTH), in den Blutkreislauf (Herman et al., 1996; Klinke und Silbernagel, 2000; Tsigos und Chrousos, 2002; de Kloet et al., 2005). Während CRH sowohl für die basale als auch für die stress-induzierte ACTH-Sekretion grundlegend ist, hat AVP alleine nur geringe

sekretorische Kapazität, vielmehr wirkt es vorwiegend synergistisch zum CRH (Whitnall, 1993; Keck et al., 2005a). Die CRH/AVP-Ausschüttung erfolgt in einem stressorabhängigen Verhältnis. So wird AVP vor allem bei chronischem Stress vermehrt koexprimiert und kosezerniert, was u.a. eine hohe Plastizität der physiologischen Stressreaktion erlaubt (Herman et al., 2002).

Die magnozellulären Neuronen des PVN dienen vorwiegend der Steuerung des Hypothalamus-Neurohypophysen-Systems. Durch die Freisetzung von AVP und Oxytocin über die Neurohypophyse in den Blutkreislauf werden Blutosmolalität und Blutdruck durch ersteres sowie Geburtswehen und Laktation durch letzteres reguliert. Außerdem wurde gezeigt, dass sie die Sekretion von ACTH durch parakrine *en passant*-Effekte in der *Eminentia mediana* modulieren können (Engelmann et al., 2004; de Kloet et al., 2005).

Ein erhöhter Gehalt von ACTH im Blut wiederum führt letztendlich zu einer vermehrten Freisetzung des Effektors der HPA-Achse, dem Nebennierenrindenhormon Corticosteron (CORT, bei der Ratte vorwiegend) bzw. Cortisol (beim Menschen vorwiegend). Das Steroidhormon erlaubt eine rasche Adaptation an die Stresssituation über diabetogene, katabole und lipolytische sowie immunsuppressive Mechanismen (Klinke und Silbernagel, 2000; de Kloet et al., 2005). Eine äußerst wichtige Funktion kommt CORT auch als Mediator der negativen Rückkopplung auf die HPA-Achse zu. Seine lipophilen Eigenschaften ermöglichen eine ungehinderte Passage der Blut-Hirn-Schranke und der Zellmembranen (Klinke und Silbernagel, 2000). Durch Bindung an zytoplasmatische Mineralo- und Glucocorticoidrezeptoren kann CORT, nach Translokation in den Zellkern, auf die Transkription der DNA in zentralnervösen Strukturen Einfluss nehmen. Durch die unterschiedliche Sensitivität der Rezeptoren für CORT und eine entsprechende zentralnervöse Verteilung wird eine plastische Reaktion auf unterschiedliche Stressoren garantiert (Tsigos und Chrousos, 2002). Die negative Rückkopplung von CORT wirkt auf alle Ebenen der HPA-Achse, insbesondere auf die inhibitorischen Strukturen des limbischen Systems, und führt zu einer raschen Terminierung der Stressantwort (Kovacs et al., 2000; Korte, 2001). Folglich ermöglicht die HPA-Achse dem Organismus, in der komplexen Verschaltung von zentraler Verarbeitung und peripherer neuroendokriner Aktivierung, einen Stressor zu verarbeiten, ihn zu bewältigen oder an ihn zu adaptieren. Schließlich kann sich das Individuum durch diese komplexe Regulation vom Stress erholen und Homöostase wiederhergestellt werden (Keck et al., 2005a).

Ebenso wichtig wie die physiologische Reaktion der Körperfunktionen ist die Verhaltensreaktion des Individuums. In Reaktion auf Stresssituationen im Rahmen von Nahrungssuche, Prädation, Territorialverhalten, Partnerwahl, Hierarchie-Etablierung etc. wird das Verhalten von Wirbeltieren weitgehend von zwei widerstreitenden Emotionen bestimmt: Mut/Neugierde und Angst/Vermeidung. Beide haben sich im Laufe der Evolution als überlebenswichtige, grundlegende Emotionen herausgebildet. So wären Tiere ohne Neugierde nicht in der Lage, neue, Überlebensvorteile bietende Areale zu erforschen, wie Tiere ohne Angst zur leichten Beute würden. In der Phylognese der Säuger – und damit auch des Menschen – hat sich insbesondere ängstliches Verhalten sehr differenziert entwickelt und genetisch fixiert, so dass jedem Individuum ein gewisser Verhaltensspielraum im Rahmen der genetischen Prädisposition zu eigen ist (Fuchs und

Gould, 2000). Diese individuelle Veranlagung zu mehr oder weniger ängstlichem Verhalten wird im Laufe der Ontogenese situationsabhängig epigenetisch von Umweltfaktoren beeinflusst und geprägt. Somit ist der Organismus, basierend auf einer filigranen Interaktion von Genen und Umwelt, an die Bewältigung von Stresssituationen hervorragend angepasst und kann im Zusammenspiel von Physiologie und Verhalten die innere Homöostase aufrechterhalten und das Überleben sichern (Charmandari et al., 2005).

Neben der Steuerung der HPA-Achse agiert der PVN zentralnervös über parakrine, autokrine und/oder juxtakrine Effekte innerhalb des Hypothalamus auch als Modulator des zur Stressreaktion gehörenden Verhaltens (Engelmann et al., 2004; Landgraf, 2006). Parallel zur Ausschüttung in der Hypophyse wird AVP im Bereich des PVN freigesetzt. Durch Diffusion über mehr oder minder lange Strecken werden Neuronen in umgebenden Gehirnstrukturen in ihrer Aktivität moduliert. Diese parakrinen Effekte beeinflussen somit indirekt Verhaltensparameter, welche sowohl in Einklang als auch unabhängig von der peripheren Wirkung von AVP sein können (Watts, 1996; Ludwig und Pittman, 2003; Landgraf und Neumann, 2004; Keck et al., 2005a). Ebenso sind autokrine Effekte im PVN selbst wirksam (Engelmann et al., 2004; Landgraf, 2006). So zeigten Wotjak et al. (1996), dass im PVN freigesetztes AVP eine autoinhibitorische Wirkung auf den PVN und damit die HPA-Achse sowie das Verhalten ausübt. Diese könnte u.a. auf dendritischer Freisetzung von AVP innerhalb des PVN beruhen (Ludwig et al., 2002; Ludwig und Pittman, 2003; de Kloet et al., 2005; Landgraf, 2006).

Trotz fein abgestimmter Stressbewältigungsmechanismen und -strategien kann es durch Umwelteinflüsse oder genetische Faktoren bzw. durch deren Interaktion zu Fehlregulierungen der Homöostase-Systeme und zu pathologischen Veränderungen des Verhaltens kommen (Ursin und Olf, 1993; Koolhaas et al., 1999). Während viele Umweltfaktoren identifiziert sind, die zu übermäßigem und für das Individuum nicht mehr kompensierbarem Stress führen, sind die Interaktionen von Genen und Stress bei der Genese von Psychopathologien nach wie vor weitgehend unklar (Ursin und Olf, 1993; Botstein und Risch, 2003).

Eine solche pathophysiologische Dysfunktion der HPA-Achse wurde u.a. bei Angststörungen (generalisierte Angststörung, Panikstörung, Posttraumatische Belastungsstörung, Phobien) und affektiven Erkrankungen (Depression, Manie) gezeigt (Aldenhoff, 1997; Holsboer, 2000; de Kloet et al., 2005). Als ein sehr sensibler Test zur Untersuchung der HPA-Achsen-Reaktivität hat sich der kombinierte Dexamethason (DEX)/CRH-Test erwiesen (Heuser et al., 1994). In gesunden Probanden ist dabei die HPA-Achsen-Aktivität nach der Gabe des Glucocorticoidrezeptor-Agonisten DEX supprimiert und kann durch die periphere Verabreichung von CRH nicht stimuliert werden. Bei Depressions- und auch Angstpatienten wurde jedoch auf Grund der CRH-Stimulation – trotz normaler basaler HPA-Achsen-Aktivität – ein pathologischer Anstieg des ACTH- und CORT-Gehalts nach vorangegangener DEX-Suppression gemessen (Heuser et al., 1994; Ising et al., 2005). Insbesondere auf diesen Erkenntnissen beruht die Annahme, dass die zentralnervösen Strukturen, die die HPA-Achsen-Aktivität steuern (unter ihnen das CRH- und AVP-

System des PVN) in die Ätiologie und Symptomatologie von Angsterkrankungen und Depression involviert sind (Scott und Dinan, 1998; Hokfelt et al., 2000; Keck et al., 2005a).

Angsterkrankungen und Depression haben eminent destruktive Auswirkungen sowohl auf persönliche als auch soziale Belange und Lebenssituationen. Nicht nur mindern diese Erkrankungen Produktivität und Lebensqualität, sie erhöhen auch die Mortalität u.a. durch eine erhöhte Suizidrate (Ustun et al., 2004). Bis zu 15% der Weltbevölkerung erkrankt im Laufe des Lebens mindestens einmal an Depression (Doris et al., 1999; Pickar und Rubinow, 2001). In einer *global burden of disease*-Studie der WHO liegt die unipolare Depression im Jahr 2000 weltweit, mit Ausnahme von Afrika, auf Platz 1 bis 5 in der Liste der durch Krankheit beeinträchtigten oder verlorenen Lebensjahre (*disability-adjusted life years*) (Ustun et al., 2004).

Die ersten erfolgreichen Psychopharmaka gegen Angsterkrankungen erschienen Anfang der 50er Jahre auf dem Arzneimittelmarkt. Dass bereits 1951 in der amerikanischen Tagespresse vor den Gefahren und den starken Nebenwirkungen der Barbiturate gewarnt wurde, tat der Euphorie über die „Heilung durch Psychopharmaka“ keinen Abbruch. So verkaufte alleine Hoffmann-La Roche 1978 vom Benzodiazepin-Agonisten Diazepam unter dem Handelsnamen „Valium“ annähernd 2,3 Milliarden Tabletten; genug für die medikamentöse Versorgung der halben Weltbevölkerung (Tone, 2005). Noch heute erfolgen bis zu 30-50% der Verordnungen von Psychopharmaka ohne psychiatrische, sondern alleine auf Grund somatischer Diagnosen (Laux et al., 2000). Innerhalb weniger Jahre wurden diverse Transmittersysteme zur psychopharmakologischen Intervention identifiziert, darunter die monoaminergen Neurotransmittersysteme von Serotonin, Noradrenalin und Dopamin sowie die Aminosäuresysteme von γ -amino-Buttersäure (GABA) und Glutamat (Laux et al., 2000; Förstl et al., 2006).

Insbesondere der Einsatz von Antidepressiva, die auf die monoaminerge Transmission wirken, allen voran selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer, zeigte und zeigt deutliche klinische Erfolge (Vaswani et al., 2003). Dennoch steht außer Frage, dass, auch wenn der Begriff des klinischen "non-responder"-Patienten nicht genau umrissen ist, 10-30 % aller Depressions-Patienten nicht oder nur ungenügend auf die momentan verfügbaren Medikationsmöglichkeiten ansprechen. Zusätzlich entwickeln 10-15 % eine Chronifizierung der Erkrankung (Pickar und Rubinow, 2001; Moller, 2004; Levinson, 2005a). Eine adäquate Medikation wird zusätzlich durch das gleichzeitige Auftreten mehrerer Symptommatiken bzw. Krankheiten erschwert (Pollack, 2005). So weisen mehr als zwei Drittel aller angstkranken Patienten eine oder mehrere weitere Störungen aus dem Formenkreis der Angsterkrankungen auf (Lieb, 2005). Auch haben Angstpatienten ein fünffach erhöhtes Risiko für die Ausbildung komorbider affektiver Erkrankungen (Kessler et al., 2001), wobei Depression fast ausschließlich sekundär zu einer Angsterkrankung auftritt (Regier et al., 1998; Lieb, 2005).

Bis heute fehlen zuverlässige Indikatoren für die Diagnostik insbesondere komorbider Krankheitsbilder und die Prognostik effektiver Therapieansätze. Neben der Betrachtung der persönlichen Krankengeschichte sowie des Umfelds des Patienten wurden viele biologische Marker,

wie Transmittermetaboliten, Transmitterstoffwechsellenzyme, neuroendokrine Parameter und neurophysiologische Parameter vorgeschlagen (Moller, 2004). Mit dem Fortschritt in der genetischen Methodik rückte die Pharmakogenetik mit dem Ziel einer exakteren Diagnostik und individuell besser angepasster Therapieansätze in den Mittelpunkt vieler Forschungsansätze (Pickar und Rubinow, 2001).

Dass Angststörungen und Depression eine genetische Grundlage haben, wurde bereits früh vor allem durch Zwillingsstudien erkannt (Smoller und Finn, 2003). Das drei- bis fünffach erhöhte Risiko für Familienangehörige eines Patienten wurde für eine Vielzahl psychopathologischer Erkrankungen gezeigt (Levinson, 2005a; Merikangas und Low, 2005). Dies gilt auch für das Risiko zur komorbiden Erkrankung an Angststörungen und Depression (Lieb et al., 2002).

In der letzten Dekade wurden bedeutende Fortschritte in der Erforschung insbesondere der genetischen Grundlagen von Angststörungen und Depression gemacht, die zu zielgerichteten Entwicklungen neuer pharmakologischer Behandlungsansätze führten. Trotz dieser größeren Mannigfaltigkeit von Medikamenten basieren die Wirkmechanismen der momentan auf dem Markt befindlichen Psychopharmaka nach wie vor weitgehend auf der oben beschriebenen relativ kleinen Auswahl an Neurotransmittersystemen. Dies mag ein Grund sein, warum neue Psychopharmaka zumeist zwar besser verträglich, aber nicht unbedingt wirksamer als ihre Vorgänger sind (Nash und Nutt, 2005).

Für viele vererbte Krankheiten wurden Proteine und deren Veränderungen identifiziert, die für die Verursachung des jeweiligen Krankheitsbildes verantwortlich sind. Aus deren Erforschung stammt fast das gesamte Wissen über die diesen Erkrankungen zugrunde liegenden biologischen Mechanismen und deren genetische Grundlagen (Merikangas et al., 2002). Jedoch ist selbst die klinische Variabilität von monogenetisch determinierten Krankheiten nur teilweise durch mutationsbedingte genotypische Heterogenität zu erklären. So beruht die Ausprägung des gesamten Erscheinungsbildes einer Störung zusätzlich auf modifizierenden Genen und Umweltfaktoren. Auch epigenetische Einflüsse, wie DNA-Methylierung durch z.B. parentales *imprinting*, werden vermehrt als entscheidende protektive oder pathogene Modifikatoren in der Vererbung von mentalen Erkrankungen diskutiert (Sadock und Sadock, 2005). Ebenso wurde kürzlich von Paramutation bei Mäusen berichtet, der phänotypischen Ausprägung eines paramutierbaren Allels, basierend auf der zygotischen Weitergabe von parentalen RNA-Molekülen (Rassoulzadegan et al., 2006).

Die Identifizierung der grundlegenden Gene, der Modulatoren sowie deren Interaktionen untereinander und mit Umwelteinflüssen ist die zukünftige Herausforderung für die pharmakogenetische Forschung. Bisher wurden dazu vor allem sequenzbasierte Ansätze angewandt, bei denen kodierende Gen- und/oder Promotorregionen auf Grund einer Peptidsequenzveränderung oder anderer Hinweise zur näheren Untersuchung ausgewählt wurden. Seit kurzem können und werden verstärkt genombasierte Untersuchungen durchgeführt, die die Identifizierung von Allelen auch außerhalb von kodierenden Regionen erlauben, die bei ersterem Vorgehen zwangsläufig übersehen werden (Botstein und Risch, 2003). Mit diesem neueren und weniger hypothesengeleiteten Ansatz werden chromosomale Regionen identifiziert, die in statistisch signifikantem Zusammenhang

mit einer bestimmten klinischen Manifestation stehen. Dies wird z. B. über «*Linkage Analyse*», einer Assoziationsstudie von Phänotyp und Genotyp per Mikrosatelliten-Markierung über das ganze Genom hinweg, realisiert. Derartige Methoden setzen keine Kenntnisse der Funktion der Gene voraus. Dieser Hypothese folgend sollten so zunächst vor allem die seltenen Mutationen, die zu einem hohen Erkrankungsrisiko führen, identifiziert werden können. Anschließend sollten die zahlreicheren genetischen Veränderungen zu finden sein, die nur geringe Auswirkungen auf das klinische Erscheinungsbild haben (Botstein und Risch, 2003).

Erschwert wird diese Art der genetischen Analyse von Krankheitsbildern jedoch durch die Heterogenität der Individuen, komplexe nicht-mendelsche Vererbung, Fehldiagnosen oder phänotypische Überschneidungen, die zu einem Einschluss gesunder oder anderweitig erkrankter Personen in die Patientengruppe führen. Auch bei zu großen Gruppengrößen kann diese Methode in Humanstudien versagen (Merikangas et al., 2002).

So haben z. B. bisherige Studien für psychiatrische Erkrankungen nicht wie erhofft einige wenige Kandidatengene zum Vorschein gebracht, sondern vielmehr eine große Anzahl aus einem weiten Spektrum von biologischen Wirkmechanismen und Stoffwechselkreisläufen. Ein Grund mag insbesondere für Psychopathologien in deren weltweit hoher Prävalenz und gleichzeitiger Mannigfaltigkeit liegen. So ist es kaum verwunderlich, dass nicht einige wenige Gene in Zusammenhang mit psychiatrischen Störungen identifiziert werden konnten, sondern es sich um komplexe genetische Erkrankungen mit komplexen Krankheitsbildern handelt (Pickar und Rubinow, 2001). Dennoch bieten genomweite Assoziationsstudien Hoffnung für die Erforschung von komplex-genetischen Krankheiten. Allerdings werden für das humane Genom zwischen 1,4 und 15 Millionen Einzelbasenpaar-Variationen (*single nucleotide*-Polymorphismen, SNP) berichtet bzw. angenommen, so dass die Wahrscheinlichkeit von erfolgreicher Genotyp-Phänotyp-Zuordnung selbst bei größtem Mitteleinsatz und Beschränkung auf eine ethnische Gruppe verschwindend gering sein dürfte (Botstein und Risch, 2003).

Ein Kompromiss zwischen umfassender Identifizierung von beteiligten Genen und dem dazu nötigen Mitteleinsatz ist daher die hypothesenfreie, genomweite Untersuchung von hoch-selektierten Individuen, die einen klar abgrenzbaren Phänotyp aufweisen. Dort gefundene Zusammenhänge zwischen Phänotyp und Genotyp können dann hypothesengeleitet in gen- bzw. sequenzbasierten Studien an weniger selektierten oder frei segregierenden Populationen weiter betrachtet werden.

Dennoch sind grundlegende Verhaltensreaktionen sowie neurochemische und molekular-genetische Parameter beim Menschen nach wie vor schwer zugänglich und nur in geringem, ethisch vertretbarem Maße kontrollierbar und manipulierbar. So ist die Forschung an Tiermodellen zur Simulation von Vorgängen im menschlichen Organismus unverzichtbar. Voraussetzung dafür ist die Annahme, dass die psychologischen wie physiologischen Parameter der Tiere – insbesondere der nicht-primaten Säugetiere – denen des Menschen vergleichbar sind. Auch wenn es nicht zweifelsfrei gezeigt werden kann, dass Tiere z.B. dasselbe Angstempfinden wie Menschen aufweisen, so sind doch in geeigneten Tiergruppen viele hoch konservierte physiologische und Verhaltensparameter mit

denen des Menschen zumindest analog (Ohl, 2005). Als besonders geeignete Versuchstiere haben sich innerhalb der Säugetiere die Nager herausgestellt. Sie weisen nicht nur eine hohe Vergleichbarkeit durch ihre phylogenetische Nähe zum menschlichen Organismus auf, sondern bieten auch auf Grund ihrer Größe und kurzen Generationsdauer große Vorteile in Haltung und Zucht (Sprott und Ramirez, 1997). Insbesondere die Kontrolle der Umwelteinflüsse ist bei der Untersuchung von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen unabdingbar und am Tiermodell Nager möglich. Um die molekular-genetischen Grundlagen von Angst, Depression sowie der HPA-Achse zu studieren, gibt es zwei grundlegende Forschungsmodelle: (1) basierend auf einem bekannten Genotyp werden die Auswirkungen auf den Phänotyp untersucht (*functional genomics*) oder (2) ein extremer Phänotyp wird auf die zugrunde liegende Genetik hinterfragt (*behavioral genomics*; Plomin und Crabbe, 2000).

Die klassische Strategie für ersteres ist die Erzeugung eines *knockout*-Tieres. Durch das gezielte Ausschalten eines Gens und damit des daraus resultierenden Genprodukts sind vor allem am Tiermodell Maus bisher große Fortschritte erzielt worden. Insbesondere die Entwicklung von konditionalen *knockout*-Tieren, die entweder räumlich oder zeitlich begrenzte Genexpressionsveränderungen zur Folge haben, hat dazu beigetragen, die gängigen Probleme im klassischen *knockout*-Modell (Kompensation der Gen-Deletion u.ä.) zu umgehen (Gerlai, 1996). Als weitere Möglichkeit der Gen-Manipulation bieten sich die Unterdrückung der Genexpression mit *antisense*-Technik (Plomin und Crabbe, 2000) oder die Überexpression eines Genprodukts durch die Anwendung adeno-assoziiierter Viren als 'Genfähren' an (Lightman et al., 2002).

Für den zweiten Forschungsansatz, das Studium eines auffälligen Phänotyps, erfolgt die Untersuchung an Tieren, die entweder bestehenden Zuchten entnommen werden oder als Nachkommen mit unspezifischen Genmutationen erzeugt wurden oder aber gezielt auf Extreme in ihrem Verhalten gezüchtet wurden (Ramos und Mormede, 1998). Insbesondere durch letztere Methode werden viele Nachteile der *knockout*-Strategie umgangen, wie z.B. Kompensationsmechanismen oder letale Mutationen, die zu Trugschlüssen bezüglich der Geneigenschaften führen können (Gerlai, 1996). Auf der zellulären Ebene können dann hypothesengeleitete *in situ*-Hybridisierungen oder hypothesenfreie *microarray*-Analysen zur Bestimmung der Genaktivität durchgeführt werden (Lightman et al., 2002). Die Assoziation von Genen bzw. DNA-Sequenzen und Phänotypen kann über hypothesengeleitete Marker-Studien erfolgen und zur Auffindung von Genloci bzw. Polymorphismen (*Quantitative trait loci*, QTL) führen, die zur Variabilität eines quantitativ erfassbaren, komplexen Verhaltens beitragen (Turri et al., 1999; Landgraf und Wigger, 2003). Eine weitere Möglichkeit, den dem Phänotyp zugrunde liegenden Genotyp zu untersuchen, ist das Studium von kreuzgepaarten F2-Generationen in einer Korrelationsanalyse von genetischen Markern und dem gezeigten Verhalten dieser Tiere (*LOD score*-Analyse; Greenberg et al., 1998).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war das Studium der verhaltensbiologischen, neuroendokrinen sowie molekular-genetischen Grundlagen von Stress, angst- und depressionsbezogenem Verhalten sowie Kognition als auch deren Interaktionen. Der Fokus lag dabei

auf dem zentralen neuronalen Steuerelement der HPA-Achse – dem PVN – und einem seiner Haupteffektorpeptide – dem AVP. Unter Anwendung von verhaltensbiologischen, pharmakologischen, molekularen sowie genetischen Methoden erfolgten alle Untersuchungen an einem gut etablierten und validierten Tiermodell für Angsterkrankungen und komorbide Depression – den HAB/LAB-Ratten.

Die HAB/LAB-Zucht

Grundsätzlich stellen Tiermodelle experimentelle Paradigmen dar, die es erlauben, in einer Spezies spezifische Phänomene zu untersuchen, die auch in einer anderen Spezies auftreten. Für deren Entwicklung und Evaluierung wurden verschiedene Richtlinien vorgeschlagen. Für die adäquate Abbildung humaner Erkrankungen in einem Tiermodell werden heute insbesondere drei Kriterien gefordert (McKinney, 2001):

- (1) Die Reaktionen oder Symptome sollten zwischen Patienten und den Individuen des Tiermodells vergleichbar sein (*face validity*),
- (2) unter pharmakologischer Behandlung sollten sich im Tiermodell gleiche Effekte wie in der Behandlung von Patienten zeigen (*predictive validity*) und
- (3) das zugrunde liegende Prinzip sollte im Tiermodell dasselbe wie in Patienten sein (*construct/etiological validity*).

Hinzu kommt nach Hitzemann (2000) bei der Modellierung vererbbarer Krankheiten das Kriterium, dass (4) das Erkrankungsrisiko im Tiermodell einen dem Menschen vergleichbaren genetischen Anteil haben sollte (*genetic validity*).

Zur Untersuchung von angst- und depressionsbezogenen Psychopathologien wurde in den letzten Jahren am Max-Planck-Institut (MPI) für Psychiatrie in München ein Rattenmodell etabliert, das auf der bidirektionalen Selektion von Tieren mit extrem ausgeprägtem bzw. wenig ausgeprägtem Angstverhalten beruht (Liebsch et al., 1998b; Landgraf und Wigger, 2002; 2003). Bestimmt wird das Zuchtkriterium in einem der am besten etablierten, nicht-konditionierten Angsttests, dem *elevated plusmaze*-Test (Abb. 2; Pellow et al., 1985; Carobrez und Bertoglio, 2005). Indem dieser Test für die Ratte auf dem Konflikt zwischen angeborener Angst vor aversiven, unbekanntem Arealen und der Neugierde/dem Mut zu deren Erkundung beruht, dient die Aufenthaltsdauer in der aversiven Umgebung als indirektes Maß für ängstliches Verhalten. Ängstliche Tiere (*high anxiety-related behavior*, HAB) verbringen dort durchschnittlich weniger als 5 % der Versuchsdauer, wenig ängstliche Tiere (*low anxiety-related behavior*, LAB) mehr als 50 %. Kommerziell erwerbbar Wistar-Auszuchttratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) weisen im Verhältnis dazu in diesem Test ein intermediäres, annähernd normalverteiltes Angstverhalten (*normal anxiety-related behavior*, NAB) mit durchschnittlich 30 % Verweildauer in der aversiven Umgebung auf (Wigger et al., 2004).

In den letzten Jahren wurden die HAB-Tiere nach den oben genannten Kriterien sowohl pharmakologisch (Liebsch et al., 1998a; Keck et al., 2003; Welt et al., 2006), verhaltensbiologisch

(Liebsch et al., 1998a; 1998b; Henniger et al., 2000; Ohl et al., 2001; Salome et al., 2002; Frank et al., 2006) als auch physiologisch (Liebsch et al., 1998a; Salome et al., 2004; Wigger et al., 2004; Keck et al., 2005b) als ein adäquates Tiermodell für Angsterkrankungen und komorbide Depression etabliert (Landgraf und Wigger, 2002; 2003).

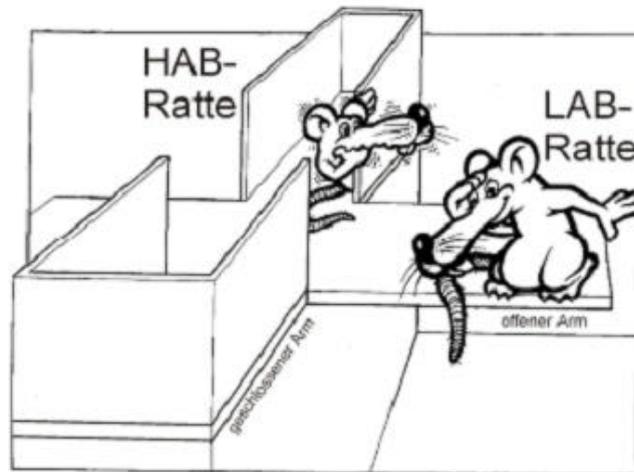


Abbildung 2. *Elevated plusmaze*-Test.

Schematische Darstellung der Testvorrichtung. Die kreuzförmige Apparatur bestand aus zwei geschlossenen Armen mit Seitenwänden und zwei offenen Armen ohne Wände, die durch eine zentrale Plattform miteinander verbunden waren.

HAB- und LAB-Ratten repräsentieren die dem Selektionskriterium entsprechende charakteristische Aufenthaltswahrscheinlichkeit der beiden Linien des Tiermodells auf der Testvorrichtung.

So zeigten Liebsch et al. (1998a), dass HAB-Tiere auf Grund der Gabe des bei Angst-Patienten anxiolytisch wirkenden Tranquilizers Diazepam eine 20-fach erhöhte Exploration des offenen Arms aufwiesen, wohingegen LAB-Tiere eine nur schwache Verhaltensveränderung zeigten. Die chronische Behandlung mit dem klinisch etablierten Antidepressivum Paroxetin über das Trinkwasser der Tiere bewirkte eine aktivere Stressbewältigung bei HAB-Tieren, hatte jedoch keinen Effekt bei LAB-Tieren (Keck et al., 2003). Während lokomotorische und basale physiologische Parameter der HAB-Tiere keine Unterschiede zu LAB-Tieren aufwiesen (Liebsch et al., 1998a; Ohl et al., 2001), zeigten erstere eine größere Vulnerabilität und Stressreaktion auf sowohl milde, starke, nicht-soziale wie auch soziale Stressoren. So erwiesen sich HAB-Tiere in einer Reihe von Angsttests (neben EPM, *open field*-, *open arm*-, *modified holeboard*- und *dark light box*-Test) als auch im Verhalten im Heimkäfig meist sehr viel ängstlicher als LAB-Tiere (Henniger et al., 2000; Ohl et al., 2001; Salome et al., 2002; Salome et al., 2004). Die forcierte Niederlage im Kampf gegen einen dominanten Artgenossen (*social defeat*), führte bei HAB-Tieren zu Immobilität und passiver Stressbewältigung im Gegensatz zu eher aggressiven, aktiven LAB-Tieren (Frank et al., 2006). Unterschiede zwischen den beiden Linien in neuroendokrinen Parametern in Reaktion auf milde Stressoren wurden mehrfach gezeigt (Liebsch et al., 1998a; Landgraf et al., 1999; Salome et al., 2004;

Neumann et al., 2005a; Salome et al., 2006). Dass bei HAB-Tieren eine pathologische neuroendokrine Fehlregulierung vorliegt, wie sie von Depressions-Patienten beschrieben ist (Holsboer 1999), konnten Keck et al. (2002) in Anwendung des DEX/CRH-Tests zeigen. Die Nicht-Suppression der HPA-Achse durch DEX-Vorbehandlung in HABs wurde dabei durch chronische Gabe von Paroxetin normalisiert. Neben der Validierung des Tiermodells konnte gezeigt werden, dass es sich beim Angstverhalten der HAB-Tiere um ein lebensalterunabhängiges Phänomen handelt (Wigger et al., 2001). Das extreme Verhalten beider Linien wurde auch durch chronisch milden und sozialen Stress im Adultalter nicht verändert (Neumann et al., 2005b; Zhukov et al., unveröffentlicht).

Dass die Prädisposition zu extremer (Nicht-)Ängstlichkeit genetisch determiniert und unabhängig von postnatalen maternalen Einflüssen ist, konnte durch eine *cross fostering*-Studie gezeigt werden. Auch zeigten sich in kreuzgezüchteten F1-Tieren intermediäre Phänotypen unabhängig von maternalen oder paternalen Einflüssen (Wigger et al., 2001). Dennoch weisen beide Linien eine Plastizität der genetischen Prädisposition auf, so dass prä- oder postnataler Stress zu intermediären, den NAB-Ratten vergleichbaren Phänotypen führte (Neumann et al., 2005b; Bosch et al., 2006).

In der Untersuchung der regulierenden Faktoren der HPA-Achse – CRH und AVP im PVN – zeigte sich eine erhöhte Aktivität des AVP-Systems in Zusammenhang mit der Prädisposition zu erhöhter Ängstlichkeit der HAB-Tiere. Während die basale Bindungskapazität des AVP V1a-Rezeptors zwischen den Linien nicht unterschiedlich war, wurde insbesondere bereits basal sowohl eine erhöhte Expression von AVP-mRNA als auch eine erhöhte Freisetzung von AVP im PVN von HAB-Ratten gezeigt (Keck et al., 2002; Wigger et al., 2004). Diese konnte durch chronische Paroxetin-Behandlung auf ein Normalniveau reduziert werden (Keck et al., 2003). Ferner führte die Applikation eines AVP V1a-Rezeptor-Antagonisten nicht nur zu einer aktiveren Stressbewältigungsstrategie und weniger depressivem Verhalten bei HAB-Tieren, sie normalisierte auch deren vorher pathologische Reaktion im DEX/CRH-Test (Keck et al., 2002; Wigger et al., 2004). In der Untersuchung des CRH-Systems zeigten Wigger et al. (2004) unter basalen Bedingungen eine erhöhte CRH-Expression im *bed nucleus* der *stria terminalis* (BNST) sowie des CRH2-Rezeptors im PVN und ventromedialen Hypothalamus. Die Applikation des hochaffinen, nicht-peptidergen CRH1-Rezeptor-Antagonisten R121919 reduzierte die CORT-Sekretion beider Linien, aber das Angstverhalten nur in HABs (Keck et al., 2001). Auf Grund der Wirksamkeit von selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmern im klinischen Einsatz und der antidepressiven Wirkung von Paroxetin auf HAB-Tiere studierten Keck et al. (2005b) die hippocampale Serotoninausschüttung und Rezeptorexpression. Während unbehandelte HABs bei Stress eine erhöhte Serotonin-Ausschüttung im dorsalen Hippocampus zeigten, wurde diese bei LABs und Paroxetin-behandelten Tieren beider Linien kaum verändert. Basal zeigten sich keine Unterschiede. Auch erwies sich die Serotoninrezeptor-Expression in der CA1-Region des Hippocampus in Vehikel- oder Paroxetin-behandelten HABs niedriger als in den jeweiligen LAB-Ratten. Eine derart erniedrigte Rezeptordichte wurde auch in *post mortem*-Studien von Depression-Patienten gezeigt (Lopez-Figueroa et al., 2004).

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass die anxiolytische bzw. antidepressive Behandlung der Tiere nur Effekte auf das Verhalten und die Physiologie von HAB-Ratten hatte, nicht jedoch oder nur in geringem Maße auf LAB-Ratten. So ist zu vermuten, dass diese anxiolytischen und antidepressiven Behandlungen nur in pathologisch veränderten Systemen (HAB) einen Effekt haben, nicht aber in intakten Systemen, wie auch in klinischen Studien beobachtet wurde (Keck et al., 2005b).

In Sequenzierungsstudien der aus vorangegangenen Untersuchungen in Zusammenhang mit Angst und Depression hervorgegangenen Hauptkandidatengene CRH, AVP, Oxytocin und des AVP V1a-Rezeptors konnten Murgatroyd et al. (2004) SNPs lediglich in der Sequenz des AVP-Gens bzw. seiner Promotorregion identifizieren. In weiteren Untersuchungen erwies sich der SNP A(-1276)G in der Promotorregion des AVP-Gens mit Bindungskapazität für den CBF-A-Repressor als möglicher verantwortlicher intrazellulärer Faktor der Expressionsunterschiede von AVP im PVN zwischen HABs und LABs. So zeigten Murgatroyd et al (2004) durch *in vitro*-Experimente, dass CBF-A zu einem Transkriptionsarrest der AVP mRNA in LAB-, nicht aber HAB-Tieren führte. Weiter hat sich herausgestellt, dass alle untersuchten HAB-Tiere für das mutierte sowie alle LAB-Tiere für das Wildtyp-AVP-Allel homozygot sind. In einer normalen Wistar-Rattenpopulation lag es in 3 aus 100 Tieren heterozygot vor, trat also mit einer Häufigkeit von 1,5 % auf. Diese Tiere zeigten auch vermehrt ängstliches Verhalten auf der *elevated plusmaze* (EPM) (Murgatroyd et al., 2004).

Das Nonapeptid Vasopressin (AVP)

AVP wird durch posttranslationale Modifikationen aus einem Vorläuferprotein, das außerdem Neurophysin II und ein Glycoprotein enthält, gebildet. Die Erstbeschreibung erfolgte durch Du Vigneaud et al. (1953). Wie bereits einleitend dargelegt, erfolgt die Synthese von AVP im Hypothalamus in den parvozellulären Neuronen des PVN vorwiegend zur Aktivierung der HPA-Achse, in den magnozellulären Neuronen des PVN und des *Nucleus supraopticus* (SON) hingegen vor allem zur Steuerung der Osmoregulation. Außerdem projizieren parvozelluläre, vasopressinerge Neuronen in den Hirnstamm und das Rückenmark (de Wied et al., 1993). Auch im *Nucleus suprachiasmaticus* finden sich AVP-Neuronen, die zur circadianen Rhythmik beitragen (Reghunandanan und Reghunandanan, 2006). Außerhalb des Hypothalamus wurden vasopressinerge Zellen in der medialen Amygdala und im BNST gefunden. Diese innervieren hauptsächlich limbische Strukturen, so das laterale Septum, die laterale Habenula, die mediale Amygdala und den ventralen Hippocampus (Griebel und Gal, 2005). Oftmals koexprimieren vasopressinerge Neuronen weitere Neurotransmitter (Hokfelt et al., 2000). Gebunden wird AVP an die Rezeptorsubtypen (R) V1a, V1b und V2. Während der V1bR peripher vorwiegend der Stimulation der Sekretion von ACTH in der Adenohypophyse dient, vermittelt der V2R, an der Niere lokalisiert, vorwiegend den antidiuretischen Effekt von AVP und der V1aR, an Blutgefäßen und Leber gelegen, dessen vasokonstriktorischen Effekt. Zentralnervös weit verbreitet findet sich vor allem der V1aR sowie V1bR (Tribollet et al., 1988; Ostrowski et al., 1992; Griebel und Gal, 2005). Beginnend mit dem Jahr 1965 wurde die Rolle

von AVP in Lern- und Gedächtnisprozessen für viele Bereiche gezeigt, insbesondere durch Studien an den AVP-defizitären Brattleboro-Ratten (de Wied et al., 1993; Engelmann et al., 1996). Eine weitere sehr wichtige Rolle kommt AVP im Sozialverhalten zu. Dies wurde sowohl im Zusammenhang mit Lern- und Gedächtnisprozessen, dem Sexualverhalten wie auch mit aggressiven Interaktionen berichtet (Landgraf et al., 1995; Ferguson et al., 2002; Bielsky et al., 2004; Lim und Young, 2004; Wersinger et al., 2004; Bielsky et al., 2005; Ferris et al., 2006). Der Einfluss von AVP auf die Stressreaktion, auf Angststörungen und Depression wurde in den letzten Dekaden sowohl in Human- als auch Tierstudien gezeigt (Gold et al., 1978; Raskind et al., 1978; Landgraf, 2006). In depressiven Patienten wurden neben einer Erhöhung der Zellzahl von CRH-exprimierenden Zellen im PVN auch vermehrt AVP-(ko)exprimierende Zellen gefunden (Raadsheer et al., 1994; Purba et al., 1996). Gesunde Probanden haben erhöhte AVP-Plasmakonzentration nach Behandlung mit anxiogenem Cholezystokinin (Abelson 2001). In Tierexperimenten wurde einerseits eine erhöhte AVP-Expression im PVN vor allem nach chronischem und/oder sozialem Stress gezeigt (De Goeij et al., 1992; Wotjak et al., 1996; Albeck et al., 1997; Nakase et al., 1998) und andererseits, dass ein erhöhtes Angstverhalten sowie eine verstärkte HPA-Achsen-Aktivität mit dem AVP-Gehalt im PVN zusammenhängen (Appenrodt et al., 1998; Bhattacharya et al., 1998; Landgraf et al., 1998; Wigger et al., 2004). Auch im Septum hat sich AVP in verschiedenen Studien als anxiogen erwiesen (Landgraf et al., 1995; Engelmann et al., 1996; Liebsch et al., 1996). Des Weiteren wurde die anxiolytische wie antidepressive Wirkung von V1aR- und V1bR-Antagonisten sowie eine veränderte Emotionalität und HPA-Achsen-Aktivität in AVP Rezeptor-*knockout*-Tieren berichtet (Griebel et al., 2002; Guillon et al., 2004; Tanoue et al., 2004; Wersinger et al., 2004).

Basierend auf den molekularbiologischen und genetischen Unterschieden des AVP-Systems im HAB/LAB-Rattenmodell war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, durch gezielte Manipulationen dieses Systems deren Auswirkungen sowohl auf das Verhalten, die HPA-Achse, die Kognition als auch auf das Expressionsmuster von AVP selbst zu studieren.

Folgende Fragestellungen sollten dabei bearbeitet werden:

- (1) Zeigen Tiere mit genetischer Prädisposition zu hyperängstlichem Verhalten und einer damit einhergehenden Veränderung im AVP-System neben komorbid depressionsähnlichem Verhalten auch andere pathologische Phänotypen, die Psychopathologien widerspiegeln?
- (2) Kann das angst- und depressionsbezogene Verhalten sowie die Kognition von HAB-, LAB- und NAB-Ratten durch Manipulation des AVP-Systems im PVN und Septum auf molekulargenetischer Ebene beeinflusst werden?
- (3) Erklärt die Mutation im AVP-Gen von HAB-Ratten in transgenen Tieren bzw. einer frei segregierenden F2-Generation hinreichend das hyperängstliche als auch das komorbid depressionsähnliche Verhalten der Tiere?

II. Material und Methoden

Versuchstiere und Haltung

Alle in vorliegender Arbeit verwendeten HAB- und LAB-Ratten wurden am Max-Planck-Institut für Psychiatrie gezüchtet. Kommerziell erwerbbar Wistar-Auszuchttratten (*normal anxiety-related behavior*, NAB) stammten von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) und wurden mehr als 2 Wochen vor Beginn des Experiments angeliefert. Alle Tiere wurden bis zu den Experimenten in den Tierhaltungsräumen des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie unter Standardbedingungen gehalten (12 h-Hell/Dunkel-Rhythmus, Licht-An um 6:00 Uhr, 21 ± 2 °C Raumtemperatur, ca. 55 % Luftfeuchtigkeit, freier Zugang zu Wasser und Standard-Zuchtfutter). Tiere, die im Verlauf der Arbeit als HAB oder LAB bezeichnet werden, haben in der Standard-*elevated plusmaze*-Testung, im Alter von zehn Wochen, die erforderlichen Kriterien erfüllt, wobei HAB-Ratten weniger als 10% der Versuchszeit und LAB-Ratten mehr als 40% der Versuchszeit auf den offenen Armen der *elevated plusmaze* verbracht haben (Liebsch et al., 1998b). Soweit nicht anders angegeben, wurden die Versuchstiere am Tag 21-24 nach ihrer Geburt von der Mutter getrennt, in Gruppen von 2-5 Tieren gehalten und wiesen ein Adultgewicht von 340 ± 15 g auf, das zwischen den verglichenen Gruppen nicht unterschiedlich war.

In allen Experimenten wurden die Versuchstiere unterschiedlicher Linien oder Behandlungsgruppen in gemischter Reihenfolge und verblindet unter Verwendung einer Kodierung getestet. Die Versuche fanden, wenn nicht anders angegeben, zwischen 9 und 13 Uhr statt.

Verhaltenstests

Elevated plusmaze -Test (EPM)

Der *elevated plusmaze* (EPM)-Test basiert auf der unkonditionierten Verhaltensreaktion des Tieres in einer Konfliktsituation zwischen angeborener Neugierde zur Exploration neuer Areale und der ebenso angeborenen Angst vor erleuchteten und erhöhten Flächen (Pellow et al., 1985; Liebsch et al., 1998b). Die EPM bestand aus vier kreuzförmig angeordneten Plattformen (50 x 10 cm), die 73 cm über dem Boden angebracht waren (Abb. 2). Zwei gegenüberliegende Arme dieses Kreuzes hatten an den Seiten jeweils 38 cm hohe graue Wände (geschlossene Arme), wohingegen die Kreuzungszone (10 x 10 cm; Plattform) und die beiden weiteren Arme keinerlei seitliche Begrenzung hatten (offene Arme, OA) (Abb. 1). Des Weiteren wurden die geschlossenen Arme mit Rotlicht (durchschnittlich 30 lx), die OA zur Verstärkung des Aversivitäts-Unterschieds (Pereira et al., 2005) mit Weißlicht (durchschnittlich 150 lx) beleuchtet. Die gesamte Konstruktion wurde von einem grau-braunen Vorhang umgeben und vor jeder Testung sorgfältig mit detergenthaltigem Wasser gesäubert. Das Versuchstier wurde bei Testbeginn auf die zentrale Plattform mit Blickrichtung in einen geschlossenen Arm auf die EPM gesetzt und das Verhalten für 5 min unter Zuhilfenahme einer Kamavorrichtung, die über der EPM angebracht war, aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte zeitgleich mit oder nach der Testung mittels Videoanalyse durch einen geübten Beobachter und ein Computerprogramm (PLUSMAZE, Scheidemann, Deutschland). Dabei wurden folgende Parameter erhoben bzw. automatisch errechnet:

- Verweildauer in den jeweils offenen bzw. geschlossenen Armen (beide Vorderpfoten und Schultergürtel in einem der offenen bzw. geschlossenen Arme),
- prozentual in den OA verbrachte Zeit (relativ zur in allen Armen verbrachten Zeit),
- Anzahl der Eintritte in die offenen bzw. geschlossenen Arme (beide Vorderpfoten und Schultergürtel in einem offenen bzw. geschlossenen Arm),
- prozentuale Anzahl der Eintritte in die OA (relativ zu den Eintritten in alle Arme),
- Anzahl der vollen Eintritte in die OA (ganzer Körper (bis Schwanzwurzel) in einem OA).

Der inverse Hauptparameter zur quantitativen Erfassung des Angstverhaltens ist die prozentual in den OA verbrachte Zeit (%Zeit auf den OA). Als Maß für Lokomotion wurde auf der EPM außerdem die Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme validiert (Pellow et al., 1985; Hogg, 1996; Liebsch et al., 1998b).

Forced swim-Test (FS)

Der *forced swim*-Test (FS) ist für die Ratte ein sowohl stark physischer wie auch psychischer Stressor, in dem eine eher aktive oder passive Stressbewältigungsstrategie als Indikator für depressionsähnliches Verhalten gilt (Porsolt et al., 1979; Liebsch et al., 1998b). Die Testungen fanden

in einem zylindrischen Plexiglastank (50 cm hoch, 30 cm Durchmesser) statt, der mit Wasser (22 °C) bis auf etwa 35 cm gefüllt war (Abb. 3). Das Versuchstier wurde für 10 min ins Wasser gegeben und das Verhalten mit einer Videokamera aufgezeichnet. Nach der Testung wurde das Tier mit einem Handtuch getrocknet.

Folgende Parameter wurden mit dem Computerprogramm EVENTLOG (Event recorder V1.0, R. Henderson, Deutschland, 1986) von einem geübten Beobachter erhoben:

- *struggling*-Dauer (starkes Bewegen der vier Extremitäten; Kletterbewegung),
- *swimming*-Dauer (ruhiges Schwimmen und Tauchen),
- *floating*-Dauer (immobiles „Sich-treiben-lassen“; leichte Steuerbewegungen unberücksichtigt),
- Latenz bis zum ersten floating.

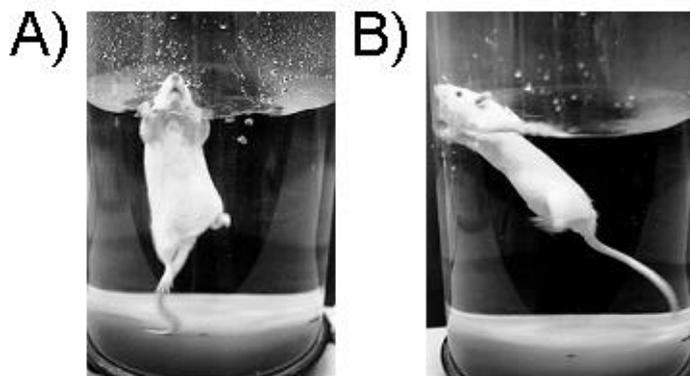


Abbildung 3.
Forced swim-Test.
Versuchsdurchführung des Tests in einem zylindrischen Plexiglastank, der mit Wasser (22 °C) gefüllt war. Repräsentative Abbildung der (A) aktiven (*struggling*) und (B) passiven (*floating*) Stressbewältigungsstrategie der Ratten.

Die *struggling*-Dauer wurde als Maß für aktives Fluchtverhalten, die *floating*-Dauer als passiver, depressionsähnlicher Verhaltensparameter (*behavioral despair*) betrachtet. Die Latenz zum ersten *floating* war Indikator des Einsetzens einer passiven Stressbewältigungsstrategie (Porsolt et al., 1979; Liebsch et al., 1998b).

Ultraschallvokalisations-Test (USV)

Um Angstparameter in Jungtieren zu messen, wurden Vokalisations-Laute von 11 Tage alten Ratten im Ultraschallbereich (40 kHz) während einer 5-minütigen Einzelseparation von der Mutter untersucht. Lokomotionsunabhängig weisen ängstlichere Jungtiere eine höhere Ruffrequenz auf (Fish et al., 2004; Brunelli, 2005). Mit Hilfe eines Richtmikrofons (Mini-3 Bat-Detector, Ultrasound Advice, Großbritannien), das sich ca. 15 cm über einer Glaspetrishale (Abb. 4; Durchmesser 15 cm, durch ein Wasserbad auf konstant 19 °C gekühlt; Shair et al., 2003)) befand, wurden die Ultraschallvokalisations-Laute in das humane Hörspektrum projiziert, mit einem Recorder (Sony WM-DC, Japan) aufgezeichnet und später von einem geübten Experimentator als Rufe pro 5-minütiger Testdauer mit EVENTLOG ausgewertet.

Als Maß für die Lokomotion des Versuchstiers wurden dessen Linienübertritte innerhalb eines auf der Schalenunterseite aufgezeichneten Rasters (Quadrate zu 4x4 cm) während der ersten 4 Testminuten erhoben. Nach der Testung wurde das Jungtier markiert und zur Mutter zurückgesetzt.

Abbildung 4.
Ultraschallvokalisations-Test.
Versuchsdurchführung mit einem 11 Tage alten Jungtier in einer Glas-Petrischale, die durch ein Wasserbad auf 19 °C temperiert wurde. Die Vokalisationslaute wurden per Richtmikrophon detektiert. Die Lokomotion wurde als Linienübertritte innerhalb des an der Bodenunterseite aufgezeichneten Rasters quantifiziert.



Elevated platform-Exposition (EPF)

Die *elevated platform* (EPF)-Exposition stellt einen milden Stressor dar und ist mit der *open arm-Exposition* (auf ausschließlich einen OA der EPM beschränkte Exposition) vergleichbar (Neumann et al., 2000). Die Plattform hat einen Durchmesser von 15 cm und befindet sich in einer Höhe von 35 cm (Abb. 5). Unabhängig von einer zurückzulegenden Wegstrecke wird somit das Explorations- bzw. Angstverhalten der Tiere erfasst. Nach der sorgfältigen Säuberung mit detergentenhaltigem Wasser wird das Versuchstier für 10 min auf die Plattform gesetzt. Als inverser Verhaltensparameter im Formenkreis Angst wurde die Anzahl der *headdips* (Absenken des Kopfes unter die Plattformoberfläche) von einem geübten Beobachter zeitgleich oder mittels einer Videoaufzeichnung post hoc mit EVENTLOG analysiert.

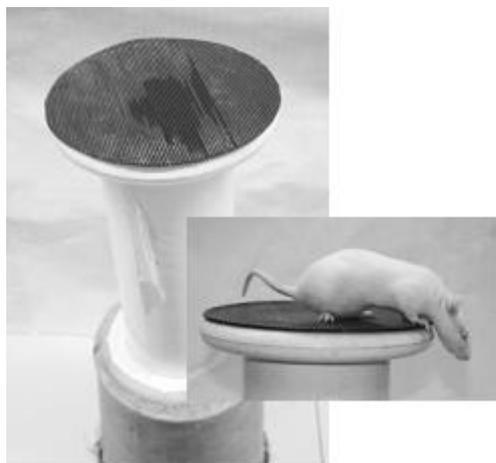


Abbildung 5.
Elevated platform-Test.
Versuchsaufbau der Plattform und repräsentative Abbildung eines *headdips* (Absenken des Kopfes unter die Plattformoberfläche).

Social Discrimination-Test (SDis)

Der *social discrimination* (SDis)-Test wurde 1995 von Engelmann et al. (1995) in unserem Labor etabliert, um die Lern- und Gedächtnisfähigkeiten von adulten Männchen im sozialen Kontext studieren zu können. Dazu wurde in den Heimkäfig eines einzeln gehaltenen adulten Versuchstiers ein unbekanntes Jungtier 1 (21-30 Tage alt) gegeben, das für 4 min durch das Adulttier exploriert werden konnte (Abb. 6). Nach einem vorgegebenen Interexpositionsintervall (IEI) wurde erneut das bekannte Jungtier 1 zusammen mit einem noch unbekanntem Jungtier 2, das im gleichen Alter war, aber aus einem anderen Wurf als Jungtier 1 stammte, für 4 min zur Exploration durch das adulte Versuchstier in den Käfig gegeben. Die Dauer des explorativen Verhaltens (direktes Beschnuppern) der Versuchsratte gegenüber dem jeweiligen Jungtier wurde in beiden Expositionen von einem geübten Beobachter mit Hilfe von EVENTLOG bestimmt. Alle Versuche wurden zu Beginn der täglichen Dunkelphase, ca. 1 h nach Licht-Aus, im Dämmerlicht durchgeführt.



Abbildung 6.
Social discrimination-Test.
Repräsentative Abbildung der Exploration eines 21-30 Tage alten Jungtiers durch die adulte Versuchsratte mittels anogenitalen Beschnupperns.

Die Zeit der Erstexposition wurde gemessen, um unspezifische Effekte, die das investigative Verhalten der Tiere supprimieren könnten, auszuschließen. Explorierte das adulte Tier in der zweiten Exploration das neue Jungtier 2 länger als das bekannte Jungtier 1, wurde dies als Parameter für die soziale Gedächtniskapazität des Versuchstiers zum Wiedererkennen und Unterscheiden der Jungtiere angenommen (Engelmann et al., 1995).

Social defeat-Exposition (SD)

Die *social defeat*-Exposition (SD) stellt einen starken emotionalen Stressor für das Versuchstier dar, das als Eindringling (*intruder*) in fremdes Territorium den Angriffen und der erzwungenen Unterwerfung durch eine dort heimische, dominante Ratte (*resident*), ausgesetzt wird (Miczek, 1979; Heinrichs et al., 1992).

Die forcierte Niederlage des *intruder* wurde herbeigeführt, indem das Versuchstier in den Heimkäfig des *resident* gesetzt wurde (Abb. 7; Plexiglas, 35 cm x 37 cm, 22 cm hoch). Um das Aggressionsverhalten gegenüber dem *intruder* zu verstärken, wurden die in diesem Experiment verwendeten *residents* (n = 8) regelmäßig in ihrem Heimkäfig mit jüngeren, unterwürfigen Männchen konfrontiert und zusammen mit einem Weibchen gehalten (Flannelly und Lore, 1977; Albert et al., 1992). War eine Attacke erfolgt oder zeigte der *intruder* unterwürfiges Verhalten (Grant und

Mackintosh, 1963), wurde die Interaktion unterbrochen, indem ein Maschendrahtgitter zwischen *intruder* und *resident* eingesetzt wurde. Nach 1 min wurde die Abtrennung nochmals entfernt und eine zweite Attacke bzw. Unterlegenheitshaltung abgewartet, woraufhin die beiden Opponenten wieder durch das Gitter getrennt wurden. Der *intruder* war dem *resident* somit für weitere physische Attacken entzogen, es bestand jedoch visueller, olfaktorischer und auditiver Kontakt. Der *intruder* verblieb nun für weitere 30 min im Käfig des *resident*. Während der Exposition wurde im Minutenabstand das Vorkommen von Ultraschallvokalisation (USV) im Bereich von 20-30 kHz (mit Mini-3 Bat-Detector, Ultra Sound Advice, Großbritannien) gemessen (van der Poel und Miczek, 1991). Ebenso wurde das Verhalten des *intruder* (*freezing* (Immobilität)) und *rearing* (Männchenposition mit vom Boden abgehobenen Vorderpfoten)) und des *resident* (Drohen in Richtung *intruder*) einmal pro Minute von einem geübten Beobachter analysiert. Anschließend wurde der *intruder* dem Käfig des *resident* entnommen und in seinen Heimkäfig zurückgesetzt.

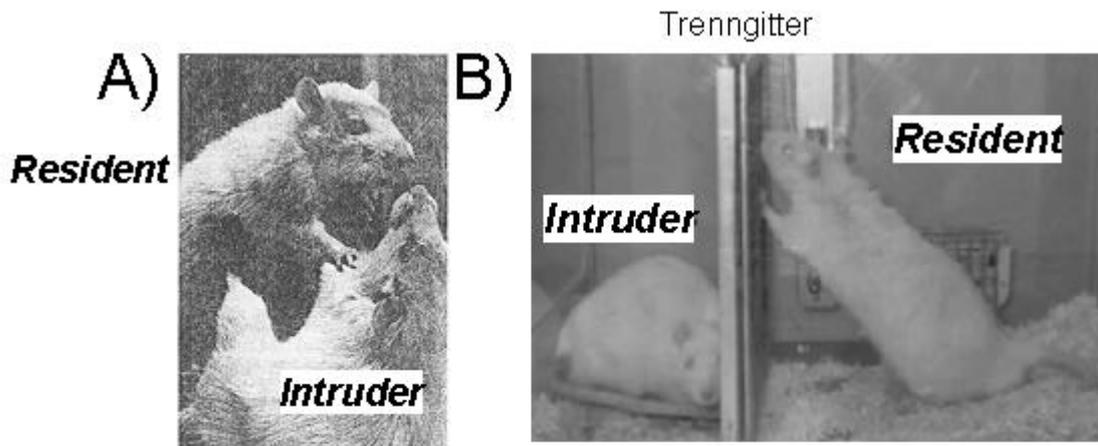


Abbildung 7. *Social defeat*-Exposition.

A) Repräsentative Abbildung der unterwürfigen Haltung des Eindringlings (*intruder*) nach der Unterwerfung durch den *resident*.

B) Darstellung der Versuchstiere nach Trennung durch ein Maschendrahtgitter mit *freezing*-Verhalten des *intruder* sowie Drohgebärde des *resident*.

Dark-light box-Test (DaLi)

Ähnlich dem EPM-Test basiert die *Dark-light box* (DaLi)-Exposition auf dem unconditionierten Konflikt zwischen dem Trieb zu Exploration einer neuen Umgebung und der Vermeidung von offenen, hell erleuchteten Arealen (Hascoet et al., 2001). Dementsprechend war die Testapparatur in ein dunkles und eine helles Areal unterteilt (Crawley und Goodwin, 1980). Die beiden Bereiche waren durch eine kleine, am Boden befindliche mittige Öffnung (7,5 x 7,5 cm) verbunden (Abb. 8). Boden (27 x 36 cm) und Wände (27 cm hoch) des dunklen Bereichs waren schwarz und mit Rotlicht (70 lx) beleuchtet, während Boden (54 x 36 cm) und Wände (27 cm hoch) des hellen Areals weiß waren und mit Weißlicht hell beleuchtet (350 lx) wurden. Die gesamte

Bodenfläche war durch 0,5 mm starke Vertiefungen in Quadrate (9 x 9 cm) unterteilt. Definitionsgemäß umfasste die innere Zone des weißen Areal alle Quadrate, die nicht wandständig waren. Zu Beginn der 5-minütigen Testung wurde das Versuchstier in den schwarzen Bereich der gereinigten Apparatur mit Gesicht zur Wand gesetzt (Henniger et al., 2000). Das Verhalten der Ratte wurde per Kamera aufgezeichnet und anschließend wurden folgende Parameter von einem geübten Beobachter erhoben:

- Verweildauer im hellen Areal (beide Vorderpfoten und Schultergürtel im hellen Bereich),
- Verweildauer in der inneren Zone des hellen Areals (beide Vorderpfoten und Schultergürtel im jeweiligen Bereich),
- Anzahl der rearings im dunklen Areal pro dort verbrachter Minute,
- Anzahl der Linienübertritte im dunklen Areal pro dort verbrachter Minute.

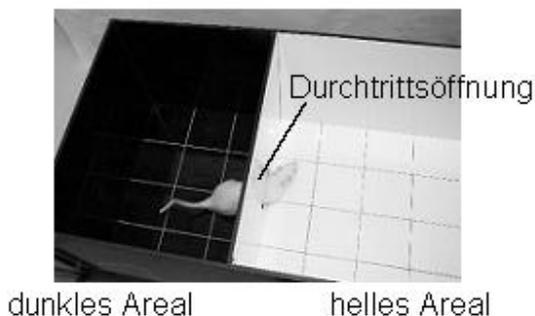


Abbildung 8. *Dark-light box*-Test. Die Testapparatur bestand aus eine dunklen und hellen Areal, die über eine Durchtrittsöffnung verbunden waren und mit einem Bodenraster zur Lokomotionserfassung versehen waren.

Als inverser quantitativer Hauptparameter für Angst wurde die Verweildauer im hellen Areal evaluiert. Die Lokomotion wurde durch die prozentuale Anzahl der Linienübertritte im dunklen Bereich erhoben.

Verhalten im Heimkäfig

Das Verhalten der Ratten in ihren Heimkäfigen wurde eine Stunde vor und eine nach Licht-Aus beobachtet. In der Dunkelphase wurde der Raum durch Rotlicht beleuchtet. Die Tiere wurden jeweils zweimal während der ersten und zweiten Observations-Phase mit einem Intervall von 20 min beobachtet (Henniger et al., 2000). Zu jedem Zeitpunkt wurden folgende Parameter direkt verzeichnet: kämpfen, defensives Verhalten, drohen, soziales Putzen, *rearing*, schnüffeln, graben, selbstputzen, schlafen/ruhen, fressen/saufen. Da die Tiere in Gruppen (2 bis 4 Tiere pro Käfig) gegessen hatten und damit keine individuelle Erkennung möglich war, wurde pro Zeitpunkt das prozentuale Verhalten zu allen beobachteten Verhalten pro Käfig ermittelt. Aus diesen wurde über die vier Beobachtungszeitpunkte das Verhalten im Mittel der jeweiligen Gruppe errechnet (Käfig hierbei n=1).

Trinkverhalten

Die Flüssigkeitsaufnahme eines Versuchstiers wurde bestimmt, indem die Gewichtsänderung einer Standard-Trinkflasche (300 ml), die anfangs mit 290 ± 10 ml Flüssigkeit gefüllt war, über ein bestimmtes Zeitintervall ermittelt wurde. Ein Gramm Gewichtsabnahme wurde dabei als 1 ml Flüssigkeitsaufnahme angenommen. Beim Einlegen und Herausnehmen der Flaschen wurde auf möglichst geringen Flüssigkeitsverlust geachtet. Bei Gruppenhaltung (Projekt 2 D) wurde die Trinkmenge zur Gruppengröße relativ gesetzt (Käfig hierbei $n = 1$).

Invasive Methoden

Blutgewinnung durch mehrfache Blutentnahme per Jugularvenenkatheter

Um den Verlauf des Stresshormongehalts über die Zeit erfassen zu können – ohne zu starke Beeinflussung des Versuchstiers –, wurden Ratten vier Tage vor dem Experiment mit einem Jugularvenenkatheter versehen (Remie et al., 1990). Unter laufender Halothannarkose (Halothan BP, Willy Rüscher Hospital Vertriebs GmbH, Böblingen, Deutschland) wurde die *Vena jugularis* im rechten Brustbereich freigelegt und minimal angeschnitten. Das Silikon-Stück eines zweigliedrigen Katheters (Silikonschlauch (4,5 cm): Innendurchmesser: 0,025 inch, Außendurchmesser: 0,047 inch, Dow Corning, USA; Polyethylenschlauch (PE, 13 cm) 50, SIMS Portex Ltd., U.K.; verbunden mit Hilfe von Rotihistol (Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe, Deutschland)) wurde nun rostral in das rechte Atrium eingeschoben und mit sterilem Faden (SUPRAMID, Hauptner, Solingen, Deutschland) befestigt. Vor der Implantation wurde der Katheter über Nacht in 70%igen Alkohol gelegt, dann mit steriler NaCl-Lösung (0,9%, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) gespült und mit heparinierter NaCl-Lösung (0,6 Vol% Heparin-Natrium, ratiopharm, Ulm, Deutschland) gefüllt. Mit Hilfe eines Subcutanstechers wurde das PE-Ende des Katheters nach dorsal in den Nackenbereich des Tiers freigelegt und nach Injektion von 0,3 ml Gentamycin-Lösung (1,8 Vol% Gentacur, Centravet, Bad Bentheim, Deutschland) verschlossen.

Zuletzt wurde die ventrale Wunde mit sterilen Wundklammern verschlossen, mit Jod desinfiziert und das Tier einzeln in einen Experimentalkäfig aus Plexiglas (Höhe 35 cm, Breite 37 cm, Tiefe 22 cm) gesetzt.

Eineinhalb Stunden vor Versuchsbeginn wurde der nackenständige Katheter über einen PE 50-Schlauch mit einer 1 ml-Spritze (Omnifix-F, B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland; gefüllt mit heparinierter NaCl-Lösung) verbunden und gespült. Entnommene Blutproben wurden in 1,5 ml Probenröhrchen gegeben, die mit Ethylendiamintetraessigsäure-Beschichtung versehen (EDTA 1000 A PP; Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Eisenroth, Deutschland) und vorab mit 10 µl Trasylol (Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) präpariert waren. Diese wurden während des Versuchs auf Eis gelagert und anschließend 5 min mit 4000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das entnommene Blutvolumen beruhte auf der benötigten Plasmamenge für die zu bestimmenden

Substanzen und wurde mit steriler NaCl-Lösung substituiert. Plasma-Aliquote wurden für die Analyse von ACTH (50 µl) und CORT (10 µl in 1,4 ml 1 M PBS) bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Blutgewinnung aus Dekapitationsblut

Zur einmaligen finalen Untersuchung stressbezogener HPA-Achsen-Aktivität wurde das Versuchstier direkt im Anschluss an die Stressor-Exposition nach Inhalation einer letalen Überdosis Halothan dekapitiert und Dekapitationsblut in 1,5 ml Probenröhrchen aufgefangen. Die mit Ethylendiamintetraessigsäure-Beschichtung versehenen und vorab mit 10 µl Trasylol präparierten Röhrchen wurden auf Eis gelagert und anschließend 5 min mit 4000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Plasma-Aliquote wurden für die Analyse von ACTH (50 µl) und CORT (10 µl in 1,4 ml 1 M Phosphatpufferlösung) bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Akute Substanzapplikation per Glasfaserkanüle

Eine einmalige, punktgenaue intrazerebrale Applikation von Substanzlösung erfolgte per Glasfaserkanüle unter laufender Halothannarkose. Nach punktueller Öffnung des Schädels wurde eine Glasfaserkanüle mittels eines stereotaktischen Apparats (Typ 51600, TSE GmbH, Bad Homburg, Deutschland) auf vorher ermittelte Koordinaten ins Gehirnparenchym eingeführt. Dies erfolgte unter einem vorher festgesetzten Winkel, um eine Verletzung des *Sinus sagittalis* zu vermeiden. Die Glasfaserkanüle (Abb. 9) war, eingeklebt in eine Injektionskanüle (25 G, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), über einen Polyethylenschlauch (Innendurchmesser: 0,40 mm, Außendurchmesser: 0,80 mm, SIMS Portex Ltd., U.K.) an eine 5 µl-Glasspritze (Hamilton, Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) angeschlossen, die 0,1 µl-genaue Injektionen erlaubte. Die intraparenchymale Substanzapplikation von 1 µl erfolgte über einen Zeitraum von ca. 3 min. Die Kanüle verblieb für weitere 30-60 sec am Applikationsort, um einen überdruckbedingten Substanzrückfluss durch den Injektionskanal zu minimieren. Nach Substanzapplikation wurde die Hautwunde vernäht, mit Jod desinfiziert, Depot-Antibiotikum (0,03 ml Tardomyocel, Bayer AG, Deutschland) *sub cutan* appliziert und das Tier in einen Experimentalkäfig einzeln gesetzt.

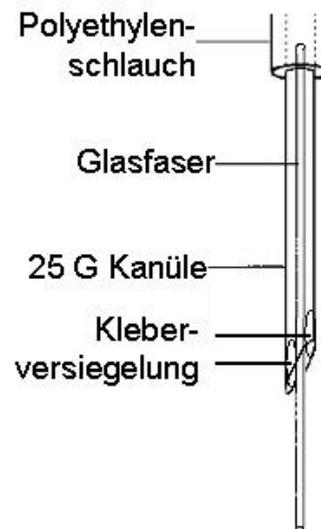


Abbildung 9.
Schematische Darstellung des
Glasfaserinjektionssystems
(nach Neumann, 2000).

Basierend auf einem stereotaktischen Hirnatlas (Paxinos & Watson, 1986) wurden aufgeführte Koordinaten und Winkel verwendet. Das Bregma galt als Bezugspunkt in der anterior-posterioren sowie medio-lateralen Achse. Die Schädeloberfläche diente als dorso-ventrale Referenz.

Projekt B 1.2: laterales Septum bilateral: 0,2 mm anterior, $\pm 2,0$ mm lateral, 6,5 mm ventral; 20° vertikal;

Projekt B 2.3: PVN bilateral: 1,4 mm posterior, $\pm 1,7$ mm lateral, 8,5 mm ventral; 10° vertikal

Implantation einer Führungskanüle

Für eine repetitive, punktgenaue intrazerebrale Applikation von Substanzlösungen wurde das Versuchstier mit einer Führungskanüle versehen, die eine exakte Injektionslokalisation ermöglichte. Vier Tage vor Durchführung des jeweiligen Experiments erfolgte die Implantation unter laufender Halothannarkose. Nach punktueller Öffnung des Schädels wurde eine Führungskanüle (21 G, Länge 12 mm) mittels eines stereotaktischen Apparats (Typ 51600, TSE GmbH, Bad Homburg, Deutschland) auf vorher ermittelte Koordinaten ins Gehirn eingeführt. Zur Stabilisierung wurde die Führungskanüle mit zwei Stützschrauben, die in die Schädeldecke eingedreht waren, durch Zahnzement (Kallocryl CP-GM rot, Kaltpolymerisat; SPEKO – Dr. Speier GmbH, Münster, Deutschland) verbunden und mit einem Stylet (angepasste 21 G-Kanüle) versehen, um einem gerinnungsbedingten Verschluss vorzubeugen. Die Hautwunde wurde mit Jod desinfiziert, Depot-Antibiotikum (0,03 ml Tardomyocel) *subcutan* appliziert und das Tier in einen Experimentalkäfig einzeln gesetzt.

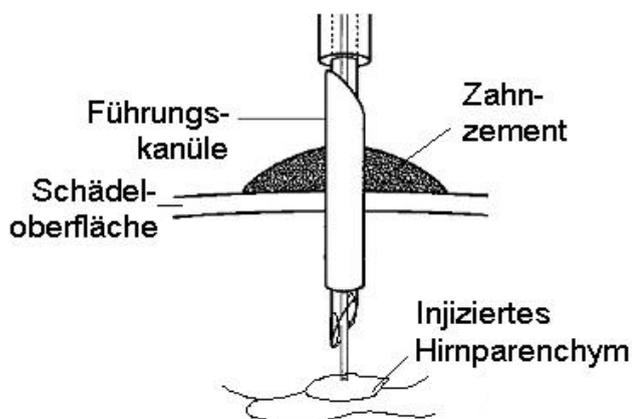


Abbildung 10.
Schematische Darstellung der implantierten Führungskanüle zur mehrfachen Substanzapplikation per Glasfaserinjektionssystem (nach Neumann, 2000).

Die Hautwunde wurde mit Jod desinfiziert, Depot-Antibiotikum (0,03 ml Tardomyocel) *subcutan* appliziert und das Tier in einen Experimentalkäfig einzeln gesetzt.

Basierend auf einem stereotaktischen Hirnatlas (Paxinos & Watson, 1986) wurden aufgeführte Koordinaten und Winkel verwendet. Das Bregma galt als Bezugspunkt in der anterior-posterioren sowie medio-lateralen Achse. Die Schädeloberfläche diente als dorso-ventrale Referenz.

Projekt B 1.1: BNST bilateral: 0,4 mm posterior, $\pm 2,6$ mm lateral, 4,1 mm ventral (+3 mm Führungskanüle); 10° vertikal.

Projekt B 2.1: PVN bilateral: 1,3 mm posterior, $\pm 1,7$ mm lateral, 5,9 mm ventral (+3 mm Führungskanüle); 10° vertikal.

Projekt B 3.1: Ventrikel unilateral: 0,6 mm anterior, 1,6 mm lateral, 1,8 mm ventral (+3 mm Führungskanüle); 0° vertikal.

Die repetitive, intraparenchymale Applikation per Glasfaserkanüle erfolgte entsprechend dem Protokoll der akuten Applikation unter Narkose. Hierzu wurde das Versuchstier aus dem Käfig genommen, mit Hilfe eines Handtuchs möglichst stressfrei immobilisiert, die Glasfaserkanüle eingeführt und das Medium injiziert (Abb. 10).

Die intracerebroventriculäre (icv) Applikation erfolgte per Infusionskanüle (Abb. 11; 25 G), die über einen Polyethylenschlauch an eine 5 µl-Glasspritze angeschlossen war.

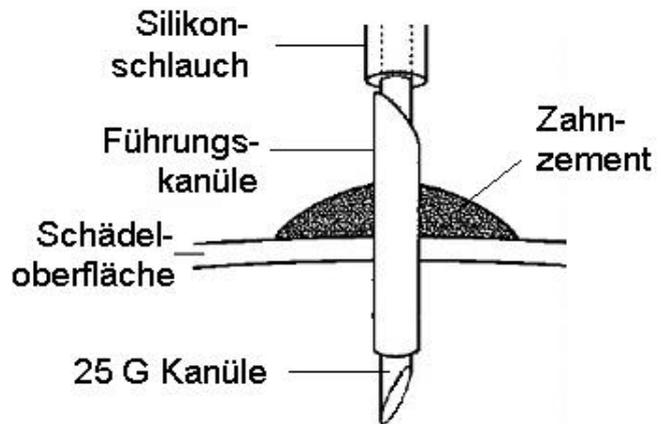


Abbildung 11. Schematische Darstellung der implantierten Führungskanüle zur mehrfachen Substanzapplikation per 25 G Kanüle (nach Neumann, 2000).

Mikrodialyse des PVN

Zum durchgehenden intrazerebralen Verfolgen von akut freigesetzten Neurotransmittern bzw. -modulatoren am wachen und frei beweglichen Tier wurde die Probennahme per Mikrodialyse als Methode der Wahl etabliert (Parsons und Justice, 1994). Zwei Tage vor Durchführung der Mikrodialyse erfolgte die Implantation unter laufender Halothannarkose. Nach punktueller Öffnung des Schädels wurde eine Uförmige Sonde (Abb. 12; Dialysemembran: Hemophan GFS Plus 16, Gambro Dialysatoren GmbH & Co., Hechingen, Deutschland, Durchmesser < 18 kDa; Durchlassrate 2 % in vitro, nach Ludwig und Landgraf (1992)) mittels eines stereotaktischen Apparats (Typ 51600, TSE GmbH, Bad Homburg, Deutschland) auf vorher ermittelte Koordinaten in das Gehirn eingeführt. Zuvor war die Mikrodialysesonde mit Ringers Lösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen Deutschland) gespült worden und wurde nun mit zwei Schläuchen (PE 20; Karmann & Droll, München, Deutschland, 6 und 8 cm) versehen. Zur Stabilisierung wurde die Sonde mit zwei Stützschaublen, die in die Schädeldecke eingedreht waren, durch Zahnzement verbunden. Die Hautwunde wurde mit Jod desinfiziert, Depot-Antibiotikum (0,03 ml Tardomyocel) *sub cutan* appliziert und das Tier in einem Experimentalkäfig aus Plexiglas (Höhe 35 cm, Breite 37 cm, Tiefe 22 cm) einzeln gehalten.

Basierend auf einem stereotaktischen Hirnatlas (Paxinos & Watson, 1986) wurden aufgeführte Koordinaten und Winkel verwendet. Das Bregma galt als Bezugspunkt in der anterior-posterioren sowie in der medio-lateralen Achse. Die Schädeloberfläche diente als dorso-ventrale Referenz.

Projekt A 6: PVN unilateral: 1,3 mm posterior, 1,7 mm lateral, 8,5 mm ventral; 10° vertikal

Projekt B 1.2: laterales Septum unilateral: 0,2 mm anterior, ±2,0 mm lateral, 6,5 mm ventral; 20° vertikal.

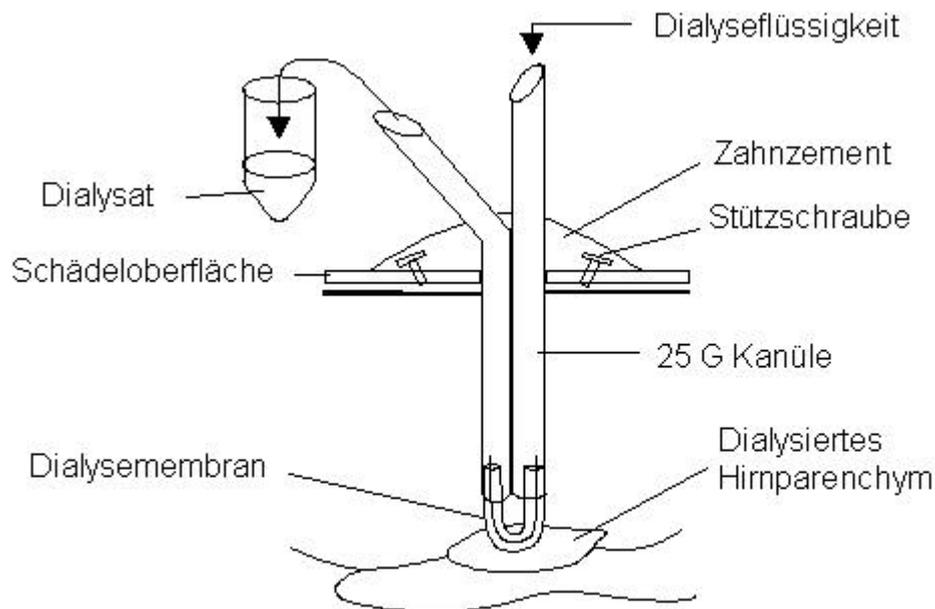


Abbildung 12. Schematische Darstellung eines Mikrodialyse-Systems (nach A. Wigger).

Die Probennahme bzw. Substanzapplikation erfolgte mittels einer Mikroinfusionspumpe (E 540220, TSE GmbH, Bad Homburg, Deutschland) mit 2,5 ml Spritzen (Hamilton, Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz), welche mit Ringers Lösung gefüllt waren. Über einen PE 20-Schlauch wurden die Spritzen mit der Mikrodialysesonde des Tieres verbunden. Die Pumpe hatte eine Durchflussrate von $3,3 \mu\text{l} / \text{min}$, was zu einem Probenvolumen von $100 \mu\text{l} / 30 \text{min}$ führte.

Vor jedem Experiment war die Sonde für eine Stunde prä-perfundiert worden. Anschließend wurden entsprechend dem Versuchsplan jeweils in 30 min-Intervallen Proben für die Bestimmung von Neurotransmittern bzw. -modulatoren in einem Tube (Safe-Lock 1,5 ml, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland), versehen mit $10 \mu\text{l}$ $0,1 \text{N}$ HCl-Lösung, aufgefangen und sofort auf Trockeneis eingefroren. Nach zwei basalen Abnahmen wurde das Tier dem jeweiligen Stressor exponiert und die dritte Probe gesammelt. Danach wurden zwei weitere post-Stress-Proben abgenommen.

Nach dem Versuch wurde das Tier unter Halothannarkose getötet, dekapitiert und das Gehirn entnommen, um durch histologische Präparation die Lokalisation der Sonde zu verifizieren.

Analytik und Histologie

Histologische Lokalisationskontrolle

Zur histologischen Verifikation der korrekten Lokalisation der Führungskanüle bzw. Mikrodialysesonde wurden die Tiere nach Beendigung der entsprechenden Versuche mit einer Überdosis Halothan getötet, dekapitiert und die Gehirne entnommen. Von den unmittelbar nach der Entnahme in 2-Methylbutan (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) tiefgefrorenen Gehirnen wurden mittels eines Kryostat (HM 500 O; Microm, Walldorf, Deutschland) 25 µm dicke Koronalschnitte der betreffenden Hirnregion angefertigt. Diese wurden auf Objektträger aufgenommen und mit 0,5 % Kresylviolett (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) gefärbt (Abb. 13). Die korrekte Lage der Kanüle wurde unter dem Binokular von einem geübten Experimentator verifiziert.

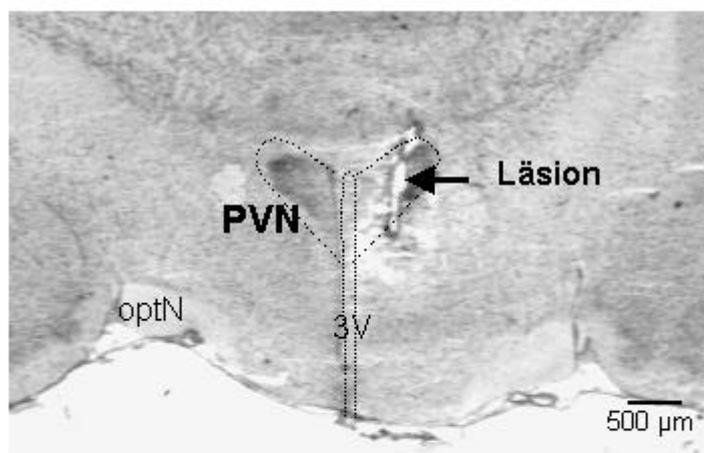


Abbildung 13. Repräsentative Abbildung eines koronalen Hirnschnitts von 25 µm Dicke, gefärbt mit Kresylviolett.

Die korrekte Lokalisation von Kanüle bzw. Mikrodialysesonde war an der durch die Injektion hervorgerufene Läsion erkenntlich. 3V 3. Ventrikel, optN optischer Nerv

***In situ*-Hybridisierung (ISH)**

Die *in situ*-Hybridisierung (ISH) einer bestimmten mRNA mit einer für sie hochspezifischen, radioaktiv markierten Sonde diente der quantitativen Erfassung der momentanen Expression dieser mRNA innerhalb eines definierten Gebiets eines Gehirnschnitts. Dazu wurden die zu untersuchenden Tiere mit einer Überdosis Halothan getötet, dekapitiert und die Gehirne entnommen. Von den unmittelbar nach der Entnahme in 2-Methylbutan (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) tiefgefrorenen Gehirnen wurden mittels eines Kryostat (HM 500 O; Microm, Walldorf, Deutschland) unter Gefrierbedingungen (-20 °C) 14 µm dicke Koronalschnitte der betreffenden Hirnregion angefertigt, auf Objektträger aufgenommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

Vor der Hybridisierung der AVP mRNA wurden die Schnitte aufgetaut, luftgetrocknet und durch Waschen in einer Alkoholreihe mit einem Chloroform-Zwischenschritt entfettet und dehydriert (1 min 70 % Ethanol, 1 min 80 % Ethanol, 2 min 95 % Ethanol, 1 min 100 % Ethanol, 4 min Chloroform, 1 min 100 % Ethanol, 1 min 95 % Ethanol). Zur Markierung von AVP mRNA wurde

eine hochspezifische, 48 Basen lange Oligodeoxynukleotid-Sequenz (ODN) verwendet, die den letzten 16 Aminosäuren des Glykoproteins komplementär ist (5' ggg ctt ggc aga atc cac gga ctc ttg tgt ccc agc cag ctg tac cag; (Ivell und Richter, 1984; Wigger et al., 2004). Die ODNs wurden unter Verwendung einer terminalen Transferase (Böhringer, Deutschland) mit [35S]-ATP (NEN DuPont, Deutschland) markiert und durch tRNA-Präzipitation (Sigma, Deutschland) gereinigt. Die in einer Hybridisierungs-Flüssigkeit (für 200 ml: 100 ml deionisiertes Formamid, 40 ml 20 x *Standard saline citrate* (SSC; 175,32 g NaCl und 88,23 g tri-Natriumcitrat Dihydrat in 1 l H₂O), 2 ml Dehnhards Lösung (Sigma, Deutschland), 10 ml 20 % Sarcosyl, 20 ml 0,2 M Natriumphosphat-Puffer, 20 g Dextransulfat (Sigma, Deutschland), 40 µl/ml Dithiothreitol, 50 µl/ml Lachssperma-DNA) gelösten, markierten ODN wurden auf die Schnitte aufgebracht (10⁶ cpm/100µl/Objekträger) und in einer feuchten Kammer für 20 h bei 45 °C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in einer 1 x SSC-Reihe (4 x 15 min bei 55 °C, 30 min von 55 °C auf RT, 10 sec destilliertes H₂O) gewaschen, durch Alkohole (1 min 65 % Ethanol, 1 min 95 % Ethanol) dehydriert und luftgetrocknet. Die Signaldetektion erfolgte durch 1 ½ h Exposition eines Films (Kodak Biomax MR, Deutschland).

Vor der Hybridisierung der CBF-A mRNA wurden die Schnitte aufgetaut, luftgetrocknet, anschließend in 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert und 3 x 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte in 0,1 M triethanolamine Salzsäurelösung gegeben, der tropfenweise 1,89 ml saures Anhydrid (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) zugegeben wurde, und 10 min darin inkubiert. Nach zweifacher Waschung für 5 min in 2 x SSC wurden die Schnitte in einer Alkohol-Reihe dehydriert (1 min 60 % Ethanol, 1 min 75 % Ethanol, 1 min 95 % Ethanol, 1 min 100 % Ethanol, 4 min Chloroform, 1 min 100 % Ethanol, 1 min 95 % Ethanol).

Die ODN zur Markierung der CBF-A mRNA wurde aus einer hochspezifischen cDNA-Sonde hergestellt. Diese stammt aus dem die 326 Basenpaare N-terminale Sequenz enthaltenden Plasmid pBSK-N-CBF-A, das mit *EcoRV* und *XbaI* zur RNA-Synthese linearisiert wurde.

Die ODNs wurden unter Verwendung einer T7 RNA Polymerase (Roche, Mannheim, Deutschland) mit [35S]-rUTP (NEN DuPont, Deutschland) markiert und aufgereinigt. Die in einer Hybridisierungs-Flüssigkeit (50 % deionisiertes Formamid, 20 mM Tris-HCl, 0,3 M NaCl, 5 mM EDTA, 10 % Dextran Sulphat, 0,02 % Ficoll, 0,02 % Polyvinylpyrrolidon, 0,2 % BSA, 0,5 mg/ml tRNA, 0,2 mg/ml Lachssperma DNA, 200 mM Dithiothreitol) gelösten markierten ODN wurden auf die Schnitte aufgebracht (10⁶ cpm/100µl/Objekträger) und in einer feuchten Kammer für 20 h bei 54 °C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in 4 x SSC voneinander gelöst und in einer 4 x SSC-Reihe 4 x 5 min gewaschen. Dann wurden sie in Puffer (0,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA) mit 20 µg/ml RNaseA für 30 min bei 37 °C inkubiert, zweimal in 2 x SSC mit 1 mM Dithiothreitol für 5 min, einmal in 1 x SSC mit 1 mM Dithiothreitol für 10 min und einmal in 0,5 x SSC mit 1 mM Dithiothreitol für 10 min gewaschen. Nach zweimaliger 30-minütiger Inkubation in 0,1 x SSC mit 1 mM Dithiothreitol bei 54 °C wurden die Schnitte noch zweimal in 0,1 x SSC mit 1 mM Dithiothreitol für 10 min bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurden sie durch Alkohole (1 min 30 % Ethanol mit 300 mM NH₄OAc, 1 min 50 % Ethanol mit 300 mM NH₄OAc, 1 min 70 % Ethanol mit

300 mM NH₄Oac, 1 min 95 % Ethanol, 1 min 100 % Ethanol, 1 min 100 % Ethanol) dehydriert und luftgetrocknet. Die Signaldetektion erfolgte durch 72 h Exposition eines Films (Kodak Biomax MR, Deutschland).

Das jeweilige Negativ wurde mit ca. 200-facher Vergrößerung gescannt. Mit einem Bildanalyseprogramm (Optimas, Deutschland) wurde die relative Schwärzung (Schwärzung innerhalb des durch eine Signal/Rauschen-Schwelle definierten Gebiets pro dessen Fläche) unter Subtraktion der Schwärzung im als Hintergrund definierten Gebiet sowie die Gebietsfläche analysiert.

Perfusion

Zur immunhistochemischen, quantitativen Erfassung des momentanen Gehalts eines bestimmten Neuropeptids innerhalb eines definierten Gehirngebiets ist die *in situ*-Fixierung des Gehirns durch das Auswaschen allen Blutes und die Perfusion mit Paraformaldehyd notwendig. Die Tiere wurden hierfür zunächst mit einer Überdosis Natrium-Pentobarbital per Bauchraumapplikation (200 mg/kg intraperitoneal, ip) anästhesiert. Bei tiefer Narkose wurden Bauchraum und Thorax geöffnet und das Herz freigelegt. Mit einer 21 g Kanüle, die an einem PE-Schlauch befestigt war, wurde in den linken Ventrikel eingestochen. Über den Schlauch wurde das Tier zunächst mit 100 ml 0,9 % NaCl-Lösung und anschließend mit 100 ml einer 4 % Paraformaldehyd 0,1 M PBS perfundiert. Das rechte Atrium war vorher geöffnet worden, um einen Flüssigkeitsaustritt zu gewährleisten. Nun wurde das Gehirn entnommen und über Nacht in eine 4 % Paraformaldehyd 0,1 M PBS bei 4 °C eingebracht. Die Gehirne wurden bis zur Weiterverarbeitung in 0,2 M PBS aufbewahrt.

Fos-Expression

Zur Quantifizierung der Fos-Expression in verschiedenen Gehirnregionen wurden zunächst 100 µm dicke Koronalschnitte der perfundierten Gehirne mittels eines Vibratoms (Vibratome, St. Louis, USA) angefertigt und in einem Immunopuffer (0,1 M NaCl, 5 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 15 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 0,3 % Triton X-100, and 0,04 % Thimerosal) aufgefangen. Nach einer Präinkubation von 30 min in 1 % H₂O₂ wurden die Schnitte zweimal in Immunopuffer gewaschen, bevor sie zunächst in 2 % Ziegen Serum enthaltendem Immunopuffer und anschließend für 72 h in 5 % Ziegen Serum enthaltendem Immunopuffer mit polyklonalen c-Fos-Antikörpern (SC-52; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA; Verdünnung 1:20000) inkubiert wurden. Der c-Fos-Antikörper war in Kaninchen gegen den N-Terminus des humanen c-Fos gezüchtet worden. Nach der Inkubation wurden die dreimal für 10 min in Immunopuffer gewaschenen Schnitte für 24 h in 0,5 % Ziegen Serum enthaltendem Immunopuffer mit einem Biotin-gebundenen Ziegen-Anti-Kaninchen IgG-Antikörper (Vector Laboratories, Burlingame, USA; Verdünnung 1:200) inkubiert. Die Schnitte wurden dann dreimal mit Immunopuffer gespült, in eine Avidin-Biotin-Lösung für 2 h inkubiert (Vectastain ABC Kit; Vector Laboratories, Burlingame, USA), erneut dreimal in 50 mM Tris

gewaschen und schließlich in 0,05 % DAB/0,1 M Phosphatpuffer für 10 min inkubiert. Die Färbereaktion wurde durch den Zusatz von 0,004 % H₂O₂ initiiert. Bei Eintreten des Farbwechsels wurden die Schnitte dreimal in 50 mM Tris-Puffer zur Beendigung der Reaktion gewaschen, auf Objektträgern aufgenommen und über Nacht luftgetrocknet. Dann wurden die Schnitte in 100 % Ethanol für 10 min dehydriert, mit HistoClear (10 min; National Diagnostics, Atlanta, USA) gesäubert und mit Eukitt (Kindler, Freiburg, Deutschland) und Deckplättchen bedeckt. Zellen, die eine braunschwarze Kernfärbung aufwiesen, wurden als positiv für die Fos-Immunreaktion angenommen und werden als Fos-positiv bezeichnet. Die Quantifizierung der Zellen erfolgte unter dem Mikroskop unter 100-facher Vergrößerung. 0,01, 0,02 oder 0,04 mm² große Flächen wurden abhängig vom Gehirngebiet bilateral in den jeweils anatomisch zugeordneten Schnitten (Paxinos und C., 1986) ausgezählt und als Fos-positive Zellen pro 0,01 mm² aufgeführt. 29 Gehirnstrukturen wurden in folgenden rostro-caudalen Ebenen untersucht: Bregma 2,70: cingulärer, prälimbischer, infralimbischer, piriformer, primärer und sekundärer motorischer Cortex; Bregma 2,20: Nucleus accumbens; Bregma 0,20: intermediärer und ventro-lateraler septaler Nucleus; Bregma -0,26: *bed nucleus* der *stria terminalis*, mediales präoptisches Areal; Bregma -1,80: parvo- und magnozellige Regionen des PVN, anteriores, laterales und periventriculäres hypothalamisches Areal, paraventriculärer thalamischer Nucleus; Bregma -2,80: CA3-Region des Hippocampus, Gyrus dentatus, zentrale, laterale, basolaterale und mediale Amygdala, dorsomediales und posteriores hypothalamisches Areal; Bregma -3,30: laterale Habenula; Bregma -6,30: dorsomediales, dorsolaterales, laterales und ventrolaterales periaqueductales Grau (PAG).

ACTH- und CORT-Bestimmung über Radio-Immuno-Assays

Zur Bestimmung der Plasma-ACTH- und Plasma-CORT-Konzentration wurden käuflich erwerbbar Radio-Immuno-Assay-Sets (ICN Pharmaceuticals Inc., Costa Mesa, USA) verwendet.

Zur ACTH-Bestimmung wurden 50 µl Blut-Plasma mit ACTH-Antikörper und Tracer (Iod¹²⁵-markiertes ACTH) versetzt. Nach einer Inkubation (16h bei 4°C) wurde zur Ausfällung ein zweiter Antikörper gegen den ACTH-Antikörper-Komplex zugegeben und die Lösung zentrifugiert (15min, 4000rpm, 4°C).

Die gewonnenen Pellets wurden jeweils für 4 min im γ -Counter gemessen.

Die Bestimmung von CORT erfolgte aus 10µl Blut-Plasma, die in 1,4 ml 1 M Phosphatpufferlösung gelöst waren. Nach Zugabe von Steroid-Deluens, Tracer (Iod¹²⁵-markiertes CORT) und CORT-Antikörper und einer Inkubation von 2 h wurde Präzipitatlösung zugegeben und die Lösung zentrifugiert (15 min, 3000 rpm, 4°C).

Die gewonnenen Pellets wurden jeweils für 4 min im γ -Counter gemessen.

Anhand der Standarddeichkurve wurde der inverse Hormongehalt der Probe bestimmt.

AVP- und Oxytocin-Bestimmung

Zur Bestimmung des AVP- und Oxytocin-Gehalts in Mikrodialyseproben wurden diese zunächst für 3 h in der Vakuumzentrifuge lyophilisiert und das Lyophilisat mit PBS/BSA-Puffer rekonstituiert. Anschließend wurden die Mikrodialyseproben geteilt, um sowohl OXT als auch AVP im selben Dialysat bestimmen zu können.

Nachfolgend wurden AVP- bzw. Oxytocin-Antikörper zugegeben, 30-60 min präinkubiert, anschließend Tracer (Iod¹²⁵-markiertes AVP bzw. OXT) zugegeben und weitere 3 Tage bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde nun charcoaliert und abzentrifugiert (15 min, 4900 rpm, 4°C). Das entstandene Pellet wurde für 4 min im γ -Counter gemessen.

Genotypisierung

Um den Genotyp der Versuchstiere zu bestimmen, wurde aus ca. 0,5 cm langen Schwanzstücken, die gewöhnlich post mortem oder vor dem 21. postnatalen Tag gewonnen wurden, DNA isoliert und auf das Vorhandensein des entsprechenden SNPs untersucht.

Die Isolierung der DNA wurde entweder entsprechend des Protokolls nach Murgatroyd et al. (2004) oder mit einem käuflich erwerbbaaren Extraktions-Set (NucleoSpin Tissue, MN GmbH & CoKG, Düren) durchgeführt.

Nach Murgatroyd et al. (2004) erfolgte der Aufschluss des zerkleinerten Gewebes (ca. 0,5-1 cm Schwanzgewebe) mittels eines Puffers (700 μ l; 5 % Tris-HCl pH 8,0, 20 % 5 M EDTA, 2 % 7 M NaCl, 5 % 20 % *sodium dodecyl sulfate*, 68 % H₂O), dem 40 μ l Proteinase K (10 mg/ml) zum Abbau von Proteinen, insbesondere DNAsen sowie RNAsen, zugegeben wurde (12-16 h bei 56 °C). Nach der Zellyse durch Zugabe von 300 μ l saturierter 7M NaCl-Lösung wurde die DNA aus dem Überstand mit 500 μ l Isopropanol gefällt und anschließend mit 500 μ l 70 % Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 200 μ l Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) gelöst.

Die Extraktion mit dem Extraktions-Set erfolgte entsprechend der Anleitung zur Extraktion von DNA aus tierischem Schwanzgewebe. Dazu wurden zunächst ca. 0,5-1 cm zerkleinertes Schwanzgewebe mit Proteinase K für 12-16h bei 56°C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand in eine Extraktionssäule übertragen. Nach mehreren Waschrufen wurde die DNA mit 100 μ l vorgewärmtem TE-Puffer aus der Säule gelöst.

Die DNA-Qualität wurde als Verhältnis der optischen Dichte einer 5 % DNA-Lösung bei 260 nm und 280 nm photometrisch ermittelt. Werte zwischen 1,5 und 2,0 wurden zur weiteren Bearbeitung akzeptiert.

Die AVP-Promotorregion (327 Basenpaare, bp) wurde durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in 35 Zyklen amplifiziert und die korrekte Amplifikation per Gel-Elektrophorese (1 % Agarose-Gel, ethidiumbromid-haltige, 60 V, 60 min, Proben mit Auftragspuffer versehen) verifiziert. Als Kontrollen dienten eine 1 kbp DNA-Leiter als Laufstandard sowie eine leere bzw. eine Standard-HAB- und -LAB-DNA-Lösung. (PCR-Ansatz: 1 µl DNA-Lösung, 2,5 µl PCR Puffer (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), 3,0 µl MgCl₂, 1,5 µl dNTPs (10 mM; Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), 1,5 µl Primersequenz AVP Ksp Forward (2 pmol/µl; gca tgt gtc aca act gtc ctt t), 1,5 µl Primersequenz AVP Ksp Reverse (2 pmol/µl; tga gca ttt cag cag ctc tc; Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), 1,0 µl Taq DNA Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), 13 µl H₂O; Zyklen: 2 min 94 °C, 35 x [1 min 95 °C, 1 min 58 °C, 1 min 72 °C], 10 min 72 °C)

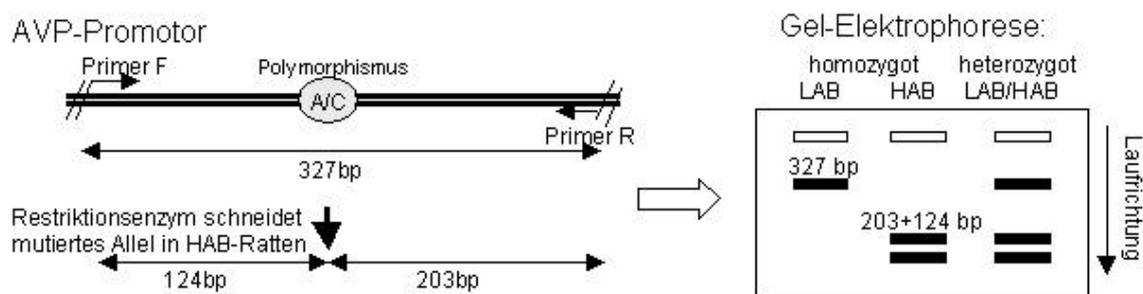


Abbildung 14. Schematische Darstellung der Genotypisierung von HAB- und LAB-Ratten durch Identifizierung des Wildtyp- bzw. mutierten Allels anhand des A/G-*single nucleotide*-Polymorphismus im Promotor des AVP-Gens (Abb. 37). Nach der Amplifikation von 327 Basenpaaren (bp) der Promotorsequenz wird diese mit einem selektiven Restriktionsenzym inkubiert. Bei Vorliegen des mutierten HAB-Allels wird das Amplifikat in zwei Fragmente von 124 bp sowie 203 bp geteilt. Die Auftrennung und Visualisierung erfolgte mittels Gelelektrophorese. Anhand der Bandenverteilung konnte der jeweilige Genotyp bezüglich des AVP-Allels bestimmt werden.

Das Restriktionsenzym Eam11041 (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) erkennt die Basensequenz „CTCTTC“ und schneidet damit auf Grund des SNPs ausschließlich die mutierten HAB-Allel-Sequenzen innerhalb der amplifizierten AVP-Promotor-Region. Dies erlaubt die Differenzierung der beiden Linien. PCR-Produkt (5 µl) und Restriktionsenzym Eam11041 (0,5 µl in 1 µl Enzympuffer und 4 µl H₂O) wurden ca. 12 h bei 37 °C inkubiert und auf ein 2 % Agarose-Gel (versetzt mit 2 µl Ethidiumbromid) aufgebracht (Proben mit Auftragspuffer versehen). Zeigte sich unter UV-Licht nach 2 h Elektrophorese bei 65 V eine Bande mit 327 bp, so lag eine ungeschnittene amplifizierte AVP-Promotor-Region des LAB-Allels vor, Banden bei 203 Basenpaaren und 124 Basenpaaren resultierten aus der enzymatisch gespaltenen amplifizierten AVP-Promotor-Region des HAB-Allels. Daraus ergab sich der Genotyp des Versuchstiers (Abb. 14). Auch hier dienten eine 1 kbp DNA-Leiter als Laufstandard sowie eine leere bzw. eine verdaut Standard-HAB- und -LAB-DNA-Lösung als Kontrollen.

Statistik

Alle vorliegenden Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Die statistische Analyse wurde mittels eines Computerprogramms (SPSS für Windows 12.0, SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Unterschiede wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant angesehen. Das Signifikanzniveau wurde bei multiplem Testen nach der Bonferroni-Methode korrigiert.

Der Vergleich zweier unabhängiger Gruppen wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Zwei abhängige Gruppen wurden mit dem Wilcoxon-Rangsummentest verglichen. Wurden mehrere unabhängige Gruppen untersucht, so erfolgte dies zunächst mit einem Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von Mann-Whitney-U-Tests für die einzelnen Gruppen unter Bonferroni-Korrektur. Die Untersuchung wiederholt getesteter Gruppen wurde mittels des Friedman-Tests durchgeführt, gefolgt von Wilcoxon-Tests für den Vergleich zweier wiederholter Testungen innerhalb der Gruppe und dem Mann-Whitney-U-Test für den Vergleich zweier unabhängig voneinander wiederholt getesteter Gruppen, stets unter Bonferroni-Korrektur. Die Prüfung auf Normalverteilung der Daten erfolgte mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests und der Signifikanzkorrektur nach Lilliefors. Korrelationsanalysen wurden mittels der nicht-parametrischen Rangkorrelation nach Spearman durchgeführt und um multiples Testen korrigiert.

III. Projekte

A. Charakterisierung der HAB/LAB-Zucht

1. Das soziale Gedächtnis von HAB- und LAB-Ratten: eine *social discrimination*-Studie

Dass eine veränderte Kognition und Angstverhalten in einer engen Beziehung stehen, wurde in den letzten Jahren mehrfach gezeigt (Ohl, 2005). So könnte die Ausprägung einer unangemessenen emotionalen Reaktion – wie pathologische Angst – darauf beruhen, dass eine dysregulierte Gedächtnisleistung eine pathogene Nicht-Übereinstimmung zwischen momentan rezipierter Information und gespeicherter Information zur Folge hat. In diesem Zusammenhang war es von Interesse, das Gedächtnis von HAB- und LAB-Tieren zu untersuchen.

Bekanntes Individuen wieder zu erkennen ist die Grundlage für die Ausbildung sozialer Bindungen in allen Tierarten, vor allem in sozial strukturierten Spezies (Ferguson et al., 2002; Bielsky und Young, 2004). Basierend auf der natürlichen Tendenz von Ratten und Mäusen, unbekanntes Individuen beim Erstkontakt intensiv zu erkunden, haben Thor und Holloway (1982) einen einfachen experimentellen Versuchsaufbau zur Untersuchung des Kurzzeitgedächtnisses im sozialen Kontext entwickelt. Das Originalkonzept des *social recognition*-Tests, das aus der einmaligen Reexposition eines dem Versuchstier bereits zur Erkundung exponierten Jungtiers unter Beobachtung des investigativen Verhaltens besteht, wurde mehrfach modifiziert. So wurde die Wiederepositions Häufigkeit erhöht, um eine Gedächtniskurve erstellen zu können, außerdem wurde die Versuchsanordnung durch die finale Exposition eines unbekanntes Jungtiers ergänzt, um ein Defizit an investigativem Interesse ausschließen zu können (Ferguson et al., 2002). Als alternative Verfeinerung des *social recognition*-Tests wurde der *social discrimination* (SDis)-Test von Engelmann et al. (1995) in unserem Labor etabliert. In diesem erfolgt die Reexposition des bekannten Jungtiers einmalig zusammen mit einem unbekanntes Jungtier. Dadurch können – ohne vielfach wiederholte Jungtierexpositionen – unspezifische Nebeneffekte, wie die Ermüdung der explorativen Neugierde, gleichzeitig miterfasst und von der eigentlichen Gedächtnisleistung klar differenziert werden.

In Anbetracht der unterschiedlichen Regulation des AVP-Systems von HAB/LAB-Ratten und unter Berücksichtigung der Unterschiede in der Ängstlichkeit der beiden Linien wurde der SDis-Test zur adäquaten Untersuchung der Gedächtnisleistung im nicht-aversiven, sozialen Kontext gewählt. Dazu sollte versucht werden, für beide Linien unter Anwendung verschiedener Interexpositionsintervalle (IEI) jene Zeitintervalle zu eruieren, bei denen entweder beide Tiergruppen die kognitive Kapazität zur Wiedererkennung des Jungtiers aufwiesen oder zu denen nur eine der beiden Linien zur Unterscheidung im Gegensatz zur anderen in der Lage war.

Basierend auf den Ergebnissen an normalen Wistar-Ratten wurden IEIs von 15 min, 30 min und 120 min gewählt (Engelmann et al., 1995).

Versuchsplan

Die IEIs von 30 min und 120 min wurden an aufeinander folgenden Tagen an denselben HAB/LAB-Tieren (jeweils $n = 10$) mit jeweils neuen Jungtieren pro Experimentaltag und Versuchstier untersucht. In einer weiteren Versuchsreihe wurden HAB/LAB-Ratten (jeweils $n = 8$) ergänzend mit einem IEI von 15 min studiert.

Ergebnisse

Keine Unterschiede wurden in der Erstexplorationsdauer, weder bei 15 min, 30 min noch 120 min IEI, zwischen HAB- und LAB-Ratten gefunden (Abb. 15). Auch unterschieden sich HABs und LABs jeweils nicht in der Latenz zum ersten Beschnüffeln der Jungtiere (IEI 15 min HAB: $1,98 \pm 0,34$ sec, LAB: $2,01 \pm 0,37$ sec; IEI 30 min HAB: $7,90 \pm 2,18$ sec, LAB: $5,50 \pm 0,85$ sec; IEI 120 min HAB: $11,9 \pm 3,22$ sec, LAB: $6,12 \pm 1,07$ sec).

Bei der Reexposition der Tiere nach 15 min explorierten sowohl HAB- als auch LAB-Tiere das unbekannte Jungtier signifikant mehr als das bekannte Tier. Auch bei einem IEI von 30 min zeigten HAB-Ratten mehr Interesse an dem neuen Jungtier als an dem Jungtier der Erstexploration, wohingegen LAB-Ratten nur tendenziell mehr Zeit dem neuen als dem bekannten widmeten. Ebenso explorierten HAB-Ratten nach 120 min IEI-Dauer das bereits bekannte Jungtier weniger als das unbekannte, während LAB-Ratten nach 120 min IEI-Dauer keinerlei Unterschied zwischen den beiden Jungtieren machten (Abb. 15).

Diskussion

Die vorliegende Studie bestätigt, dass erhöhte Ängstlichkeit mit einer veränderten Rezeption und Gedächtnisleistung im sozialen Kontext einhergeht. Wie für Wistar-Ratten gezeigt (Engelmann et al., 1995), waren HAB- und LAB-Ratten in der Lage, ein bekanntes Jungtier kurzzeitig von einem unbekanntem zu unterscheiden (Abb. 15). Dass das verbesserte Gedächtnis nicht einer intensiveren Exploration des Jungtiers zuzuschreiben ist, macht die vergleichbare Erstexplorationszeit beider Linien deutlich.

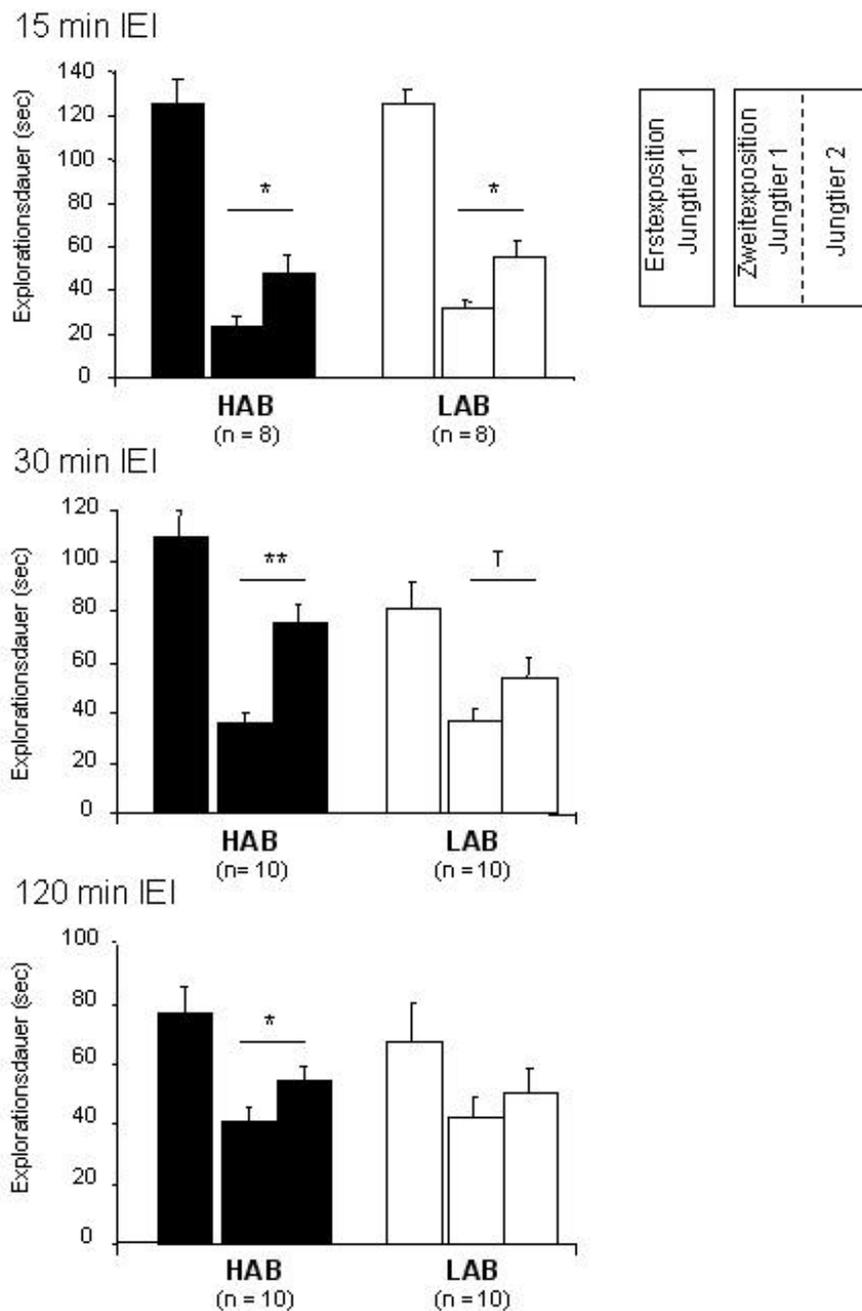


Abbildung 15. *Social discrimination*-Test an HAB- und LAB-Ratten. Kognitive Fähigkeit adulter HABs und LABs, ein bereits für 4 min exploriertes Jungtier 1 von einem unbekanntem Jungtier 2 in der Zweitexposition nach Interexpositionsintervallen (IEL) von 15 min, 30 min und 120 min zu unterscheiden. Die Wiedererkennung wird in einer kürzeren Exploration des bekannten Jungtiers gegenüber dem unbekanntem in der Zweitexposition sichtbar (Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, T $p < 0,1$).

Ein intaktes soziales Gedächtnis ist grundlegend für die soziale Interaktion bei Säugetieren (Bielsky und Young, 2004). Dieses beruht, im Gegensatz zu z.B. kontextuellem Lernen, hauptsächlich auf dem AVP- und Oxytocin-System (Ferguson et al., 2002).

Die zentrale Stellung des septalen AVP-Systems in sozialen Verhaltensweisen und insbesondere im sozialen Gedächtnis von Nagetieren wurde bereits einleitend beschrieben (Engelmann et al., 1996; Tanaka et al., 2003). Exprimiert im BNST und freigesetzt im lateralen Septum bindet AVP dort an V1aR und auch V1bR und ist von grundlegender Bedeutung für die adäquate kognitive Funktion im sozialen Kontext.

Dieser enge Zusammenhang der sozialen Gedächtnisleistung mit dem AVP-System und die Überexpression von AVP, nicht aber Oxytocin, in HAB-Ratten (Wigger et al., 2004) deutet auf einen Zusammenhang von verbesserter Gedächtnisleistung im sozialen Kontext und der Ausprägung von erhöhter Ängstlichkeit in HABs hin. Dieser Zusammenhang von Kognition und Emotionalität wurde auch für die AVP-defizitären Brattleboro-Ratten beschrieben. Diese zeigen weniger ängstliches Verhalten im *open field*, aber eine Fehlregulierung des sozialen Gedächtnisses, das durch Applikation von synthetischem AVP ins Septum wiederhergestellt werden konnte (Herman et al., 1986; Engelmann und Landgraf, 1994). Auch verminderte die Injektion von V1R *antisense* ODN-Sequenzen durch die Reduzierung der V1R-Dichte im Septum sowohl die soziale Gedächtnisleistung als auch das Angstverhalten so behandelter Tiere (Landgraf et al., 1995). Dass die AVP-Rezeptordichte auch in den vorliegenden Experimenten eine Rolle spielen könnte, ist nicht auszuschließen, da die Bindung eines selektiven V1aR-Liganden in HABs gegenüber LABs im lateralen Septum erhöht war (Keck et al., 2003).

Dennoch ist die Frage von Ursache und Wirkung und welche Rolle die AVP-Überexpression im PVN darin einnimmt, nach wie vor ungeklärt. So könnte einerseits die Prädisposition bzw. die Ausprägung von depressiven Symptomen in HABs zur übermäßigen Rezeption und Verarbeitung von sozialen Stimuli führen. Dies wird für Depressionspatienten berichtet, die ihr Augenmerk auf soziale Probleme fokussieren und mehr Aufmerksamkeit und Verarbeitungsleistung sozialen Informationen, insbesondere vergleichenden, widmen (Watson und Andrews, 2002). Andererseits wäre auch eine veränderte Rezeption bzw. Kognition im sozialen Kontext ein Ansatzpunkt für die Ausprägung von Psychopathologien. Eine derartige kognitive Fehlregulierung wurde als auf einer Überaktivität des septo-hippokampalen Systems beruhend postuliert (McNaughton, 1997). So beschreiben Grady und Keightley (2002) in einem Überblick mögliche Strukturen, die einer Negativierung des sozialen Umfelds zugrunde liegen könnten. Psychopathologien werden wie die Kognition im sozialen Kontext in Zusammenhang mit der erhöhten bzw. verminderten Aktivität in Strukturen wie Amygdala und präfrontalem Cortex beschrieben.

Auch in Tierexperimenten wurde neben dem lateralen Septum die Beteiligung von medialer Amygdala, Hippocampus und Hypothalamus sowie dem BNST und dem medialen präoptischen Areal an der Ausprägung von sozialen Verhaltensweisen und Gedächtnisleistungen beschrieben (Bielsky und Young, 2004). Dies wurde u.a. durch Läsionen des Hippocampus von Ratten und Mäusen gezeigt (Maaswinkel et al., 1997; Kogan et al., 2000). Dieser vermittelt vor allem nicht-soziale

Gedächtnisformen und ist zentral im kontextuellen Lernen (Silva et al., 1998). Dass die soziale Wiedererkennung weder vom Kontext abhängig ist noch von der Interaktion mit den Jungtieren, sondern auf den olfaktorischen Charakteristika des Stimulus beruht, belegen Studien von Burman und Mendl (2002) sowie van den Bos et al. (2002). Zu zeigen bleibt daher in weiteren Studien, ob es sich bei HAB-Ratten um eine generell verbesserte Gedächtnisleistung handelt oder ob diese auf das soziale Gedächtnis beschränkt ist. Für Depressionspatienten wird in diesem Zusammenhang berichtet, dass sie, im Gegensatz zum sozialen Gedächtnis, eine verschlechterte Leistung in kognitiv fordernden, nicht-sozialen und abstrakten Aufgaben aufweisen (Watson und Andrews, 2002).

In vorliegender Untersuchung wurde gezeigt, dass HABs gegenüber LABs eine deutlich verbesserte kognitive Kapazität im sozialen Kontext aufweisen. Dieser Unterschied ist Ausgangspunkt für weitere Studien (Projekte B 1.1 und 1.2) des Zusammenhangs von Angst, Depression und Kognition und der Rolle des AVP-Systems in diesem Kontext.

2. Neuroendokrine und neuronale Aktivität in HAB/LAB-Tieren in Reaktion auf *social defeat*

In einer sozialen Spezies dient der innerartliche Konflikt zur Etablierung von Hierarchien und damit der Aufrechterhaltung stabiler sozialer Gruppen. Ist ein derartiger Konflikt in der subjektiven Rezeption eines Individuum unkontrollierbar oder herrscht soziale Instabilität, so kann dies, vor allem bei unterlegenen Gruppenmitgliedern, zu stressbedingten, pathologisch depressionsähnlichen Veränderungen führen (Koolhaas et al., 1999; Anisman und Matheson, 2005). Parallelen zwischen sozial gestressten Tieren und depressiven Patienten, die schicksalhafte Erlebnisse hatten, wurden mehrfach gezogen (Price et al., 1994; Gilbert und Allan, 1998).

Zur Untersuchung sozialer Interaktionen wurden verschiedene Stressmodelle vorgeschlagen, die auf der physischen und psychischen Bedrohung durch einen dominanten Artgenossen und der damit verbundenen sozialen Unterlegenheit basieren (Martinez *et al.* 1998a). Zur Herbeiführung einer unkontingierten Stresssituation im sozialen Kontext etablierten Miczek (1979) und Heinrichs (1992) den sogenannten *social defeat* (SD)-Test. In diesem Verhaltenstest wird ein schwächerer Eindringling (*intruder*) in das Heimterritorium eines dominanten Tieres (*resident*) gesetzt, was zum sofortigen Angriff und der Unterwerfung des *intruder* führt. Indem die beiden Kontrahenten nach der Unterwerfung des *intruder* durch ein Gitter getrennt werden, wird dieser weiteren unerwünschten physischen Attacken entzogen, nicht aber der psychischen Bedrohung durch den *resident*.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass SD ein natürlicher und starker Stressor ist mit teilweise erheblichen verhaltensbiologischen, neuroendokrinen, immunologischen sowie morphologischen Auswirkungen, die sowohl akut als auch chronisch messbar sind (Miczek et al., 1990; Koolhaas et al., 1997a; 1997b; Martinez et al., 1998a; Meerlo et al., 1999). Neben aktiven und passiven Bewältigungsstrategien im SD-Test (Grant und Mackintosh, 1963; Buwalda et al., 1999; Koolhaas et al., 1999) wurde berichtet, dass Ratten 22 kHz USV sowohl in Antizipation, während der

Attacken des *resident* wie auch danach zeigen (Thomas et al., 1983; van der Poel und Miczek, 1991; Tornatzky und Miczek, 1994).

In unterworfenen *intruder* fand sich außerdem eine erhöhte HPA-Achsen-Aktivität, die bis zu 4 h anhalten konnte (Heinrichs et al. 1992, Pich et al. 1993, Skutella et al. 1994). Wie bereits in meiner Diplomarbeit beschrieben, zeigen HAB- und LAB-Ratten stark unterschiedliche Stressbewältigungsstrategien nach sozialer Unterwerfung und während der 30-minütigen *resident*-Exposition. Während HAB-Tiere passiv reagieren und vermehrt Immobilität und USV zeigen, verhalten sich LABs aktiver und aggressiver (Frank et al., 2006). Auch wurden entgegen anderer Studien (Bohus et al., 1987; Koolhaas et al., 1999; Bandler et al., 2000) Hinweise auf eine erhöhte HPA-Achsen-Aktivität in LABs gegenüber HABs gefunden. Auf Grund der Ergebnisse meiner Diplomarbeit sollte die HPA-Achse daher in Verbindung mit SD detaillierter untersucht werden.

In Fos-Studien erwiesen sich viele Gehirnregionen der zentralnervösen Stressverarbeitung, vor allem viele limbische Gehirnregionen – zu denen u.a. der PVN gehört –, nach SD verstärkt aktiv (Martinez et al., 2002). Daher sollten außerdem die neuronalen Korrelate sowohl von Stressbewältigungsstrategien als auch bezüglich der HPA-Achsen-Aktivität in HABs und LABs durch eine Fos-Studie charakterisiert werden.

Als Kontrollen zur *resident*-Exposition wurden Tiere beider Linien nach gleichem Versuchsschema in einen frischen Käfig ohne *resident* gesetzt.

Versuchsplan

Um Rückschlüsse von den neuroendokrinen und neuronalen Parametern auf das zuvor beobachtete Verhalten ziehen zu können, wurde dieses bei allen Tieren während der Stressorexposition minutlich analysiert.

Das Studium der Veränderungen der ACTH- und CORT-Konzentrationen im Blut erfolgte über eine mehrmalige Blutnahme per Jugularvenenkatheter (4 Tage vor Versuchsbeginn implantiert). 30 min (b1) bzw. direkt vor (b2) der *resident*-Exposition wurden den HAB- und LAB-Ratten (jeweils n = 7) die ersten beiden Blutproben abgenommen. Während der Attacken wurde der Katheter von der Spritze abgesteckt, so dass die Tiere in der Interaktion nicht behindert waren. Direkt nach der Trennung der Tiere durch das Metallgitter wurde der Katheter wieder befestigt und sofort (T0) sowie nach 5 min (T5), 10 min (T10), 15 min (T15), 20 min (T20) und 30 min (T30) Blut genommen. Dann wurde das Versuchstier in den Heimkäfig zurückgesetzt. Dort wurden zwei weitere Proben 60 min (T60) bzw. 90 min (T90) nach den Attacken entnommen. Als Kontrolle wurden HABs (n = 8) und LABs (n = 6), mit Ausnahme der Attacken, exakt der SD-Prozedur entsprechend, in einen leeren, frisch gereinigten *resident*-Käfig gesetzt.

Zum Studium der neuronalen Aktivität auf Grund von SD wurden einerseits unterworfenen und dem *resident* 30 min exponierte HABs (n = 8) und LABs (n = 7) bzw. dem frischen Käfig für 30 min ausgesetzte HABs (n = 8) und LABs (n = 6) 2 h nach Stressorexposition perfundiert, um die Fos-Expression in ausgewählten Gehirnregionen zu quantifizieren.

Ergebnisse

Dem frischen Käfig exponiert zeigten HABs und LABs wenig passives Verhalten und unterschieden sich weder darin noch im Explorationsverhalten (Tabelle 1). Den Attacken und der Bedrohung durch den *resident* ausgesetzt, waren HABs vermehrt immobil und vokalisiert vermehrt, während LABs mehr aktive Stressbewältigung mit vermehrten *rearings* und wenig USV zeigten. Kein Unterschied war im Drohverhalten der *residents* gegenüber den beiden Linien festzustellen.

Tabelle 1. Verhalten von HAB- und LAB-*intruder* bzw. des *resident* im *social defeat*-Test. Die Versuchstiere wurden für 30 min entweder einem leeren *resident*-Käfig oder den Attacken und der anschließenden Bedrohung durch einen *resident* ausgesetzt. Das Verhalten wurde einmal pro Minute evaluiert (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. leerer Käfig; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. LAB).

	leerer <i>resident</i> -Käfig		<i>Social defeat</i>	
	HAB (n = 8)	LAB (n = 6)	HAB (n = 8)	LAB (n = 9)
<i>Intruder</i>				
<i>freezing</i> (n)	2,50 ± 0,65	1,50 ± 0,72	10,8 ± 0,49 ^{###**}	3,50 ± 1,09 [#]
USV (n)	0,00 ± 0,00	1,17 ± 0,75	8,13 ± 1,57 ^{###*}	5,44 ± 1,63 [#]
<i>rearing</i> (n)	1,63 ± 1,12	2,33 ± 0,92	0,13 ± 0,13 ^{**}	3,00 ± 1,04
<i>Resident</i>				
Drohen (n)	-	-	8,63 ± 0,73	9,22 ± 0,78

Das Einsetzen der beiden Linien in den leeren *resident*-Käfig führte zu einer Erhöhung der Plasma-Stresshormone (Friedman-Test: HAB $p < 0,01$, LAB $p < 0,05$), die aber nicht unterschiedlich war zwischen HABs und LABs (Abb. 16 A und C). Auch die SD-Exposition erhöhte die ACTH- und CORT-Konzentration im Blutplasma in beiden Linien (Friedman-Test: HAB, LAB $p < 0,01$), jedoch signifikant stärker in LABs als in HABs (Abb. 16 B und D). So zeigte sich im zeitlichen Verlauf der Hormonsekretion in HABs kein Unterschied zwischen den Stressoren, während SD bei LABs eine höhere ACTH- und CORT-Sekretion zur Folge hatte als die Käfig-Exposition.

Die Fos-Expressions-Studie ergab Unterschiede zwischen den dem frischen Käfig ausgesetzten HAB- und LAB-Ratten in 7 Gehirnregionen (Tabelle 2). Während der parvozelluläre Bereich des PVN in HABs mehr Fos aufwies als in LABs, zeigten letztere mehr Expression im infralimbischen Cortex, *Nucleus accumbens*, paraventriculären thalamischen Nucleus, in der lateralen Amygdala, der lateralen Habenula sowie dem dorsomedialen PAG. SD-ausgesetzte LABs hatten mehr Fos-exprimierende Zellen im cingulären Cortex, primären und sekundären motorischen Cortex, paraventriculären thalamischen Nucleus, intermediären Septum und im dorsomedialen PAG,

wohingegen HABs mehr Fos-Expression im medialen präoptischen Areal, periventriculären Hypothalamus, in der zentralen sowie der medialen Amygdala aufwiesen. Der Vergleich der Expositionseffekte auf HABs zeigte eine Aktivitätserhöhung auf Grund der SD-Exposition im infralimbischen Cortex, ventrolateralen Septum, *Nucleus accumbens*, periventriculären Hypothalamus, in der lateralen und medialen Amygdala sowie im dorsomedialen und ventrolateralen PAG. In LABs waren der piriforme Cortex, der sekundäre motorische Cortex, der paraventriculäre thalamische Nucleus, das laterale und posteriore hypothalamische Areal sowie das dorsomediäre und dorsolaterale PAG nach SD vermehrt aktiv.

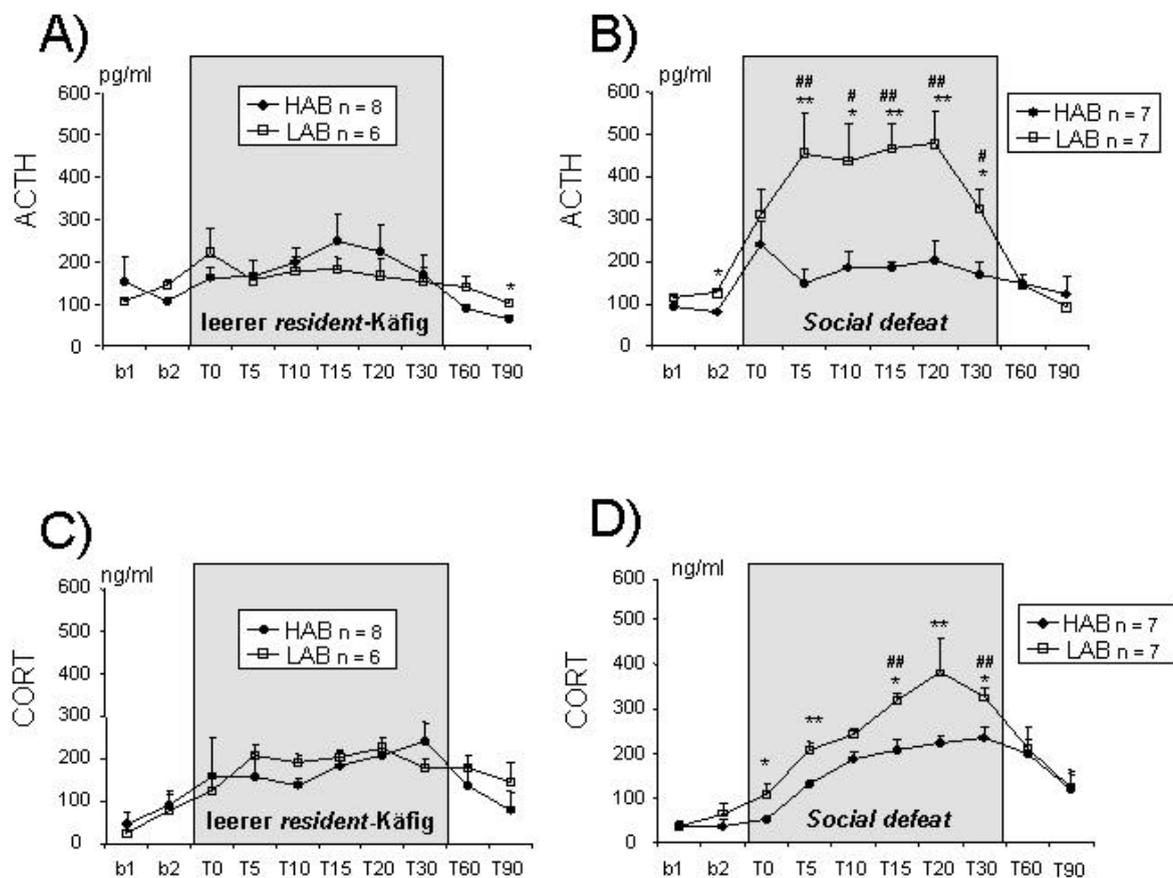


Abbildung 16. Plasmakonzentrationen von Adrenocorticotropin (ACTH) und Corticosteron (CORT) in HABs und LABs, die für 30 min einem leeren *resident*-Käfig (A, C) oder der sozialen Unterwerfung durch einen *resident* (*social defeat*; B, D) ausgesetzt waren (Beginn der Stressorexposition T0). Proben wurden per Jugularvenenkatheter vor (b1, b2), während (T0–T30) und nach (T60, T90) der Exposition entnommen (Mittelwerte \pm SEM; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. leerer Residentenkäfig; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ vs. HAB).

Tabelle 2. Fos-Expression von HAB- und LAB-Ratten im *social defeat*-Test.

Die Versuchstiere waren für 30 min entweder einem leeren *resident*-Käfig oder den Attacken und der anschließenden Bedrohung durch einen *resident* ausgesetzt worden (angegeben sind Mittelwert \pm SEM der Fos-positiven Zellen/0,01 mm²; # $p < 0,05$, # # $p < 0,01$ vs. leerem Käfig; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. LAB).

Gehirnregion	leerer <i>resident</i> -Käfig		<i>Social defeat</i>	
	HAB (n = 7)	LAB (n = 6)	HAB (n = 8)	LAB (n = 8)
Vorderhirn				
cingulärer Cortex	2,9 \pm 0,2	4,8 \pm 0,8	3,1 \pm 0,3 **	5,4 \pm 0,7
prälimbischer Cortex	4,3 \pm 0,2	5,7 \pm 0,5	4,5 \pm 0,3	5,6 \pm 0,5
infralimbischer Cortex	3,9 \pm 0,3 *	6,4 \pm 0,8	5,7 \pm 0,5 ^{###}	6,4 \pm 0,8
piriformer Cortex	9,8 \pm 0,5	9,2 \pm 1,0	10,7 \pm 0,6	12,5 \pm 1,2 #
primärer motorischer Cortex	0,5 \pm 0,1	0,8 \pm 0,2	0,7 \pm 0,1 *	1,3 \pm 0,3
sekundärer motorischer Cortex	2,1 \pm 0,4	2,2 \pm 0,3	2,0 \pm 0,3 **	3,3 \pm 0,3 #
intermediolateraler septaler Nucleus	1,1 \pm 0,5	1,3 \pm 0,3	1,2 \pm 0,2 *	2,4 \pm 0,4
ventrolateraler septaler Nucleus	2,7 \pm 0,3	3,5 \pm 0,7	4,8 \pm 0,7 #	5,0 \pm 0,7
<i>bed nucleus</i> der <i>Stria terminalis</i>	1,6 \pm 1,1	3,0 \pm 1,1	1,5 \pm 0,3	3,4 \pm 1,6
<i>Nucleus accumbens</i>	1,1 \pm 0,4 *	2,9 \pm 0,7	2,6 \pm 0,2 ^{###}	3,1 \pm 0,4
Thalamus				
paraventriculärer thalamischer Nucleus	4,0 \pm 0,4 *	6,0 \pm 0,7	4,6 \pm 0,3 **	9,0 \pm 0,8 #
lateraler habenulärer Nucleus	1,1 \pm 0,3 *	2,8 \pm 0,6	2,1 \pm 0,6	2,7 \pm 0,4
Hypothalamus				
PVN				
parvozelluläre Region	11,6 \pm 1,7 *	5,9 \pm 1,9	14,9 \pm 1,7	11,0 \pm 1,9
magnozelluläre Region	6,3 \pm 3,0	6,5 \pm 1,9	4,6 \pm 0,5	4,8 \pm 0,8
periventriculäres hypothalamisches Areal	3,4 \pm 0,2	3,1 \pm 0,5	5,3 \pm 0,7 # *	3,5 \pm 0,4
mediales präoptisches Areal	7,7 \pm 0,7	5,1 \pm 1,0	10,1 \pm 1,1 **	6,7 \pm 0,8
anteriores hypothalamisches Areal	3,8 \pm 0,3	4,7 \pm 0,4	4,9 \pm 0,6	5,9 \pm 0,8
laterales hypothalamisches Areal	1,9 \pm 0,5	0,9 \pm 0,3	1,7 \pm 0,3	1,9 \pm 0,3 #
posteriores hypothalamisches Areal	3,8 \pm 0,6	3,3 \pm 0,2	4,8 \pm 0,8	5,1 \pm 0,8 #
dorsomediales hypothalamisches Areal	6,9 \pm 0,6	7,0 \pm 0,6	9,0 \pm 0,9	8,1 \pm 0,9

Amygdala				
zentrale Amygdala	2,3 ± 0,8	3,2 ± 0,8	3,4 ± 0,4 *	2,1 ± 0,3
mediale Amygdala	6,6 ± 1,2	6,9 ± 0,4	12,0 ± 0,5 ^{###} **	7,9 ± 0,4
basolaterale Amygdala	4,5 ± 0,3	5,3 ± 0,4	5,3 ± 0,3	6,1 ± 0,4
laterale Amygdala	2,3 ± 0,3 ^{**}	5,1 ± 0,7	4,9 ± 0,6 ^{###}	5,9 ± 0,3
Hippocampus				
CA3	3,4 ± 0,4	2,6 ± 0,4	2,6 ± 0,3	3,4 ± 0,5
<i>Gyrus Dentatus</i>	2,6 ± 0,5	4,1 ± 0,9	2,7 ± 0,5	3,6 ± 0,5
Periaquäduktales Grau				
dorsomediale Region	1,4 ± 0,4 ^{**}	3,9 ± 1,0	5,0 ± 0,7 ^{###} *	9,2 ± 1,1 ^{###}
dorsolaterale Region	1,0 ± 0,3	1,6 ± 0,4	2,5 ± 0,6	3,2 ± 0,3 ^{###}
laterale Region	2,1 ± 0,5	3,0 ± 0,5	3,9 ± 0,7	4,8 ± 0,7
ventrolaterale Region	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,2	1,3 ± 0,3 [#]	1,6 ± 0,5

Diskussion

Die Daten der vorliegenden Studie zeigen, dass die Selektion der Tiere bezüglich ihres Angstverhaltens auf der EPM auch die Stressvulnerabilität und Stressbewältigungsstrategie im sozialen anxiogenen Kontext bestimmt. Wie bereits in meiner Diplomarbeit gezeigt, waren HABs in Reaktion auf die soziale Unterwerfung passiv und zeigten vermehrt USV gegenüber LABs (Tabelle 1). Die weniger stressvolle Käfig-Exposition führte zu einer geringen Aktivierung der HPA-Achse, die zwischen den beiden Linien nicht differierte. Bei der *resident*-Exposition hingegen zeigten LABs, nicht aber HABs eine starke Aktivierung der HPA-Achse (Abb. 16). Die Untersuchung der neuronalen Aktivität per Fos-Quantifizierung ergab, dass die soziale Unterwerfung in HABs vor allem amygdaläre und hypothalamische Areale stimulierte, wohingegen in LABs präfrontale und Hirnstammareale vermehrt aktiv waren (Tabelle 2).

Dass HABs gegenüber LABs in stressvollen Situationen – unabhängig von deren Qualität – eher passiv in ihrem Verhalten sind, wurde bereits mehrfach gezeigt, so im FS-Test und im Heimkäfigverhalten (Liebsch et al., 1998a; 1998b; Henniger et al., 2000; Keck et al., 2003). Im Vergleich mit der Fluchtreaktion wurde angenommen, dass *freezing* ein höheres Niveau antizipierender Angst verlangt (Mongeau et al., 2003). Diese Voraussetzung könnte durch die genetische Prädisposition in HABs erfüllt sein. Auch wurden Unterwürfigkeit, Kontrollverlust und eine derartige Passivität im sozialen Kontext als kausal für bzw. einhergehend mit Psychopathologien, insbesondere Depression diskutiert (Koolhaas et al., 1995; Allan und Gilbert, 1997; Gilbert und Allan, 1998; van Kampen et al., 2002). Dies ist der Ausgangspunkt für weitere neuroendokrine und neuronale Untersuchungen von Mechanismen, die dieser Vulnerabilität und der Pathogenese von

Fehlanpassungen in sozialen Interaktionen zu Grunde liegen könnten (Hawker und Boulton, 2000; Bjorkqvist, 2001).

Wurden die Ratten einem leeren *resident*-Käfig ausgesetzt, fand sich ein geringfügiger Anstieg der HPA-Achse, der nicht unterschiedlich zwischen den Linien war. Die soziale Unterwerfung hatte jedoch einen starken Anstieg von sowohl ACTH als auch CORT in LABs, nicht aber in HABs zur Folge (Abb. 16). Dieses Ergebnis steht früheren Untersuchungen gegenüber, die zeigten, dass Stressexposition in HABs zu einem Anstieg der Stresshormone gegenüber LABs führte (Landgraf et al., 1999; Salome et al., 2004). Anzunehmen wäre, dass es sich in diesen Studien im Vergleich zu SD um mildere Stressoren – den OA der EPM und das *open field* – handelte. Jedoch wurde auch für SD bisher berichtet, dass passive Stressbewältigung, geringe Aggression und Unterwerfung mit einer erhöhten HPA-Achsen-Aktivität einhergehen (Schuurman, 1980; Bohus et al., 1987; Miczek et al., 1990; Koolhaas et al., 1999; Bandler et al., 2000). Somit stehen die vorliegenden Ergebnisse im Widerspruch zu früheren Studien.

Stressbewältigungsstrategien dienen dazu, sich Bedrohungen zu entziehen bzw. sie zu minimieren und die subjektive Kontrolle über eine Situation zu erlangen (Koolhaas und Bohus, 1989). Daher könnte die geringe Hormon-Sekretion in HABs entweder eine vollkommen inadäquate Reaktion auf diesen starken sozialen Stressor darstellen oder aber eine hervorragende Anpassung, die durch Passivität und *freezing* eine Dämpfung der HPA-Achse hervorruft. In LABs hingegen könnte das aktive Ankämpfen gegen die Unterwerfung die Stressreaktion verstärken. Dies weist darauf hin, dass das Zusammenspiel von Verhalten und HPA-Achse in HABs und LABs auf möglicherweise unterschiedlichen Regulationsmechanismen beruht bzw. im Zusammenhang mit SD gänzlich dissoziiert ist.

Die Validität der invers erwarteten Ergebnisse vorliegender Untersuchung unterstreichen allerdings einige Humanstudien. So ergab die Untersuchung der Stresshormone in zweijährigen Kindern an den ersten Kindergarten Tagen, dass impulsivere und mehr extrovertierte Kinder in einer neuen sozialen Situation eine erhöhte CORT-Sekretion aufwiesen als scheue und ängstlichere Kinder (de Haan et al., 1998). Auch in einer Studie, die interessanterweise nur Individuen mit extremen (Nicht-)Angstwerten umfasste und solche mit mittleren ausschloss, hatten Teilnehmer mit erhöhter Ängstlichkeit unter psychosozialen Stress eine geringere ACTH- und CORT-Ausschüttung als jene mit geringer Ängstlichkeit (Jezova et al., 2004).

Da unterschiedliche Stressoren bei HABs und LABs in einer anders gearteten HPA-Achsen-Aktivität resultierten (Landgraf et al., 1999; Salome et al., 2004 und vorliegende Ergebnisse), ist anzunehmen, dass eine Aktivierung des PVN und damit die Ausschüttung von AVP und/oder CRH stressor- und linienabhängig variieren. So wurde berichtet, dass SD vermehrt der HPA-Achsen-Aktivierung durch CRH unterliege (Pich et al., 1993; Skutella et al., 1994), die durch eine AVP-basierte Autosuppression innerhalb des PVN feinreguliert werden könnte (Wotjak et al., 1998). Der Einfluss der AVP-Überexpression im PVN von HABs (Wigger et al., 2004) auf die HPA-Achsen-Aktivität in SD bleibt zu zeigen.

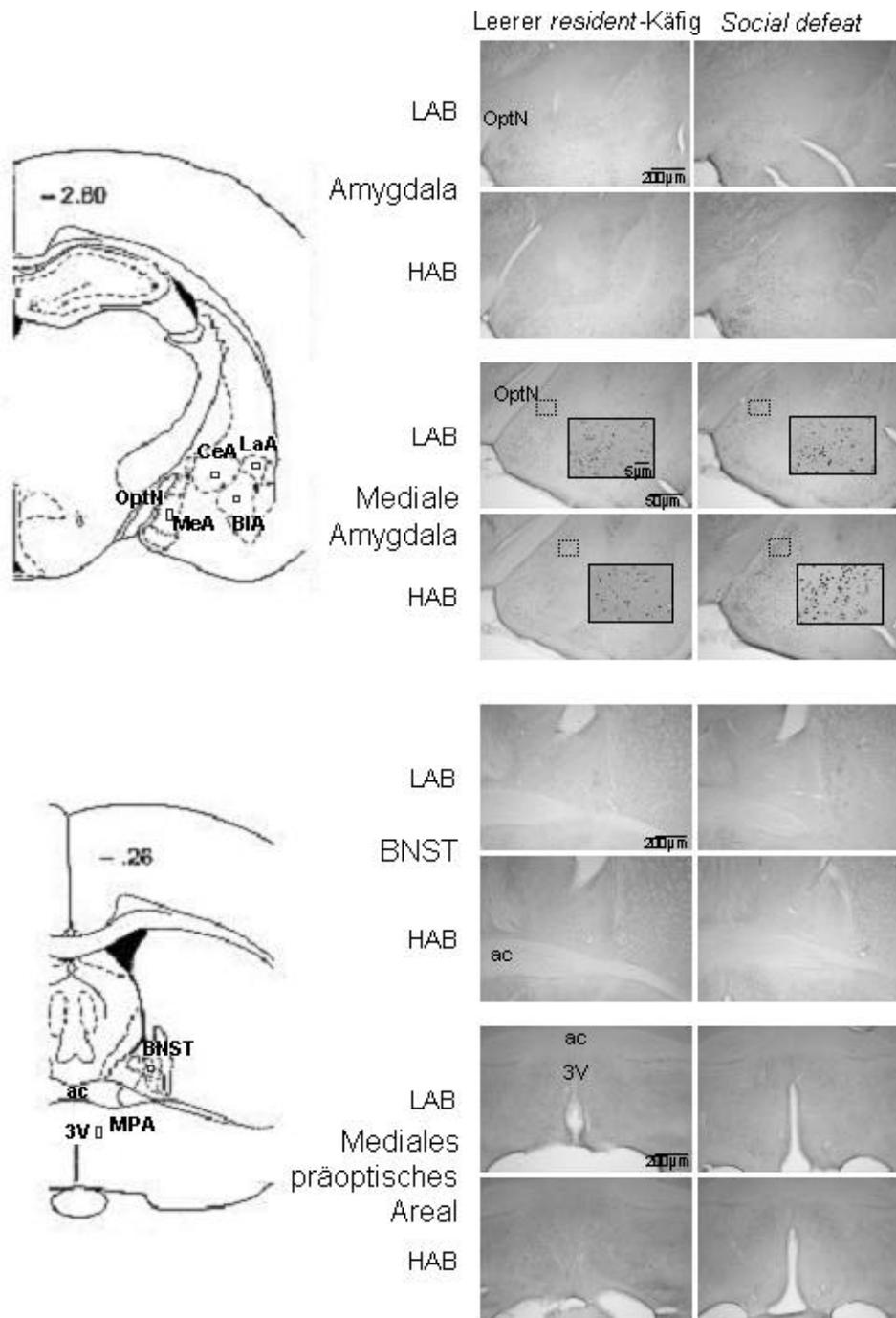


Abbildung 17. Repräsentative Abbildungen der Fos-Expression in der Amygdala – insbesondere der medialen Amygdala – dem *bed nucleus* der *stria terminalis* und des medialen präoptischen Areals in HABs und LABs, die für 30 min einem leeren *resident*-Käfig oder der sozialen Unterwerfung durch einen *resident* (*social defeat*) ausgesetzt waren.

Die Quantifizierung erfolgte innerhalb der in den schematischen Zeichnungen gekennzeichneten Areale (nach Paxinos und Watson, 1986). 3V 3. Ventrikel; ac anteriore Commissur; BIA basolaterale Amygdala; BNST *bed nucleus* der *stria terminalis*; CeA zentrale Amygdala; LaA laterale Amygdala; MeA mediale Amygdala; MPA mediales präoptisches Areal; optN optischer Nerv.

Die Aktivierung einer Vielzahl von Gehirnregionen durch SD wurde in Wistar-Ratten von Martinez et al. (1998b) dargelegt. Während der leere *resident*-Käfig keine unterschiedliche neuronale Aktivität zwischen den Linien hervorrief, führte SD zu Divergenzen der Fos-Expression in 12 Arealen (Tabelle 2). Zur Differenzierung neuronaler Regionen, die in die zuvor beschriebenen Verhaltens- und neuroendokrinen Phänomene involviert sein könnten, waren jedoch nur Areale interessant, die nach SD stärker aktiviert waren als nach reiner Käfig-Exposition und zusätzlich zwischen HABs und LABs differierten. Diese Kriterien erfüllten der sekundäre motorische Cortex, der paraventriculäre thalamisch und periventriculäre Nucleus, das mediale präoptische Areal sowie die zentrale und mediale Amygdala (Darstellung repräsentativer Regionen in Abb. 17).

Insbesondere die mediale Amygdala und der periventriculäre Nucleus waren nach SD-Exposition in HABs stark überaktiviert. Dass die Aktivität der medialen Amygdala, wie sie auch in Wistar-Ratten und Hamstern gezeigt wurde (Kollack-Walker et al., 1997; Martinez et al., 1998a), nicht rein der Verarbeitung von chemosensorischen Stimuli zuzuschreiben ist (Coolen und Wood, 1998), wird durch den Unterschied zwischen den Linien trotz derselben olfaktorischen Stimulation deutlich. Vielmehr ist jenes Areal vermutlich in die Verarbeitung von sozialen Interaktionen involviert, die eine emotionale Erregung und die Verarbeitung sozialer Informationen bedingen (Kollack-Walker et al., 1997; Martinez et al., 1998a; Young, 2002). Ebenso wurde die mediale Amygdala als Mediator für das *freezing*-Verhalten (Luiten et al., 1985; Li et al., 2004; Blanchard et al., 2005) und auch als beteiligt an der Ausprägung von Angstverhalten beschrieben (Ebner et al., 2004). Des Weiteren finden sich Hinweise auf deren Kontrollmechanismus für Aggressivität und die damit verbundenen Gedächtnisinhalte (Halasz et al., 2002). Damit könnte die mediale Amygdala eine zentrale Rolle in der passiven, ängstlichen und wenig aggressiven Verhaltensreaktion von HABs im SD spielen. Auch für den periventriculären Nucleus wurde ein Zusammenhang mit *freezing*-Verhalten berichtet (Mongeau et al., 2003).

Ebenso waren die zentrale Amygdala und das mediale präoptische Areal überaktiviert in HABs. Diese beiden Kerngebiete sind in die neuronale Kontrolle von somatischen, autonomen und endokrinen Furchtreaktionen involviert, was für verschiedene, zumeist nicht-soziale Stressoren gezeigt wurde (Davis und Whalen, 2001). Auch wurde diskutiert, dass unkontrollierbarer Stress zur Aktivierung des medialen präfrontalen Cortex, des PVN und der zentralen Amygdala führte (Anisman und Matheson, 2005). Insbesondere die Rolle der zentralen Amygdala wird momentan jedoch kontrovers diskutiert. So wurde sie als grundlegend für die Angstreaktion von Rhesusaffen und deren HPA-Achsen-Aktivität beschrieben (Kalin et al., 2004), aber auch als nicht involviert in die unkonditionierte und konditionierte Furchtreaktion (Koo et al., 2004; Li et al., 2004). Daher bleibt die Rolle der zentralen Amygdala in vorliegender Studie ungeklärt.

Die beschriebene Aktivität des paraventriculären thalamischen Nucleus, des cingulären Cortex und der zentralen Amygdala stehen vermutlich in Zusammenhang, da insbesondere erstere als interaktiv (Bubser und Deutch, 1998) und reprimierend auf letztere (Spencer et al., 2004) beschrieben wurden. Die beobachtete geringere Aktivität des präfrontalen Cortex in HABs bestätigt frühere Untersuchungen (Kalisch et al., 2004; Salome et al., 2004). Neuere Studien weisen auf die zentrale

Rolle dieser Gehirnregion bzw. deren Subregionen in der kognitiven Flexibilität und der damit einhergehenden Fähigkeit zur Strategieveränderung in Anpassung an eine neue Situation hin (Cabrera et al., 2006). Die Konsequenzen der unterschiedlichen Aktivität des präfrontalen Cortex in HAB- und LAB-Ratten in Zusammenhang mit deren Unterschieden in Kognition (Projekt A 1) und Stressbewältigung (vorliegende Daten) bleiben zu zeigen.

Interessanterweise war die parvozelluläre Region des PVN in HABs bei der Käfig-Exposition verstärkt aktiviert. Dies wurde bereits für die wenig stressvolle OA der EPM- bzw. *open field*-Exposition berichtet (Salome et al., 2004). Es fanden sich jedoch keine Unterschiede in der Aktivierung der Subregionen des PVN zwischen HABs und LABs auf Grund von SD. Da der PVN sowohl beim Angstverhalten als auch bezüglich der HPA-Achsen-Aktivität eine zentrale Stellung einnimmt (Herman und Cullinan, 1997; Engelmann et al., 2004; Landgraf und Holsboer, 2005), insbesondere in HAB- und LAB-Ratten (Keck et al., 2002; Wigger et al., 2004), ist dieser Befund mit vorliegenden Daten nicht zu deuten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studien bestätigen die passive bzw. aktive Stressbewältigungsstrategie von HABs bzw. LABs nach sozialer Unterwerfung. Als zentral beteiligte Strukturen an verhaltensbiologischen und neuroendokrinen Phänomenen konnten präfrontale, hypothalamische und Hirnstammareale identifiziert werden – allen voran die mediale Amygdala.

Die zunächst paradox anmutenden Ergebnisse der supprimierten HPA-Achsen-Aktivität in HABs und der erhöhten Stresshormon-Sekretion in LABs bei SD fanden zusätzlich Bestätigung in einer aktuellen Studie an deutschen und amerikanischen Studenten (Wirth et al., 2005). Die untersuchten Männer mit stärkerem Streben nach Dominanz zeigten erhöhte CORT-Werte nach einer sozialen Niederlage als mehr subdominante Studenten. Somit stellt die „inverse“ HPA-Achsen-Aktivierung ein neu beschriebenes Phänomen in der sozialen Interaktion dar, dem insbesondere in HABs und LABs weiter Aufmerksamkeit gewidmet werden sollte.

3. Trinkverhalten von HAB-/LAB-Ratten und Anhedonie im Zuckerkonsumtest

Der Verlust von Lebensfreude – Anhedonie – ist neben depressiver Verstimmung eines der zwei Hauptsymptome depressiver Erkrankungen (Anisman und Matheson, 2005). Für Tiermodelle wird berichtet, dass chronischer Stress zu Symptomen von Anhedonie führen kann, verbunden mit vermehrtem *floating* im FS-Test (Strekalova et al., 2004; Sergeev et al., 2005). Außerdem wurde gezeigt, dass Mäuse, die anfälliger für die Ausprägung von anhedonischen Merkmalen nach chronischem Stress waren, auch zu unterwürfigem Verhalten in der sozialen Interaktion neigten (Strekalova et al., 2004).

HAB-Tiere weisen genetisch veranlagt sowohl depressionsähnliches Verhalten als auch starke Unterwürfigkeit in der sozialen Interaktion auf (Henniger et al., 2000; Landgraf und Wigger, 2003). Um das Vorhandensein von Anhedonie in den beiden Zuchtlinien zu untersuchen, sollten diese

einem Test auf den Konsum einer Zuckerlösung unterzogen werden. Da bei dem oft verwendeten Paradigma der Konsummessung unter deprivierten Bedingungen (vorab Entzug von Futter und/oder Wasser) Interferenzen von metabolischen Parametern nicht auszuschließen sind, sollte das Trinkverhalten der Tiere über mehrere Tage im „freien Wahlverfahren“ (Strekalova et al., 2004) untersucht werden.

AVP spielt, sezerniert aus der Neurohypophyse in den Blutkreislauf, eine wichtige Rolle in der Osmoregulation. Es beeinflusst die Menge des aus dem Primärharn rückresorbierten Wassers durch den Einbau von Aquaporinen in das Sammelrohr der Niere (Klinke und Silbernagel, 2000). Bei Diabetes insipidus-Patienten kann diese AVP-Funktion zentral und/oder peripher gestört sein, was zu übermäßiger Urinausscheidung und verstärktem Durstgefühl (Polydipsie) führt (Ghirardello et al., 2005). Insbesondere der zentrale Diabetes insipidus wurde auf eine Fehlfunktion des AVP-Gens zurückgeführt, was u.a. bei AVP-defizitären Brattleboro-Ratten beobachtet wurde (Jirikowski et al., 1992). Liebsch et al. (1998a) zeigten, dass kein Unterschied im Trinkverhalten von ausgezuchteten HAB- und LAB-Ratten bestand. Auf Grund der inzwischen bekannten Unterschiede in der Expression von AVP in den ingezüchteten HAB/LAB-Ratten (Murgatroyd et al., 2004; Wigger et al., 2004) sollte dieses Ergebnis vorab als Basis für den auf dem Trinkverhalten basierenden Anhedonie-Test bestätigt werden.

Versuchsplan

Zunächst wurde durch die Messung des Trinkflaschengewichts das normale Trinkverhalten einzeln gehaltener HABs (n = 6) und LABs (n = 6) über 72 h bestimmt. Jedes Tier hatte dazu, in Vorbereitung auf den Anhedonie-Test, zwei mit Wasser gefüllte Standard-Trinkflaschen zur Auswahl. Die Trinkmenge wurde als Summe der Gewichtsreduzierung beider Flaschen ermittelt. Um Positions- und Flascheneffekte aufzudecken, wurden die Positionen der Flaschen jedes Käfigs bei jeder Wägung getauscht. Nach der dritten Wägung wurde eine der beiden Flaschen mit 1 % Sucroselösung (Roche, Mannheim, Deutschland) gefüllt. Beide Flaschen wurden nun nach obigem Schema vier weitere Male gewogen (inklusive Flaschenaustausch).

Ergebnisse

Das Trinkverhalten von HABs und LABs zeigte keine Veränderung über die Zeit hinweg, weder bei reiner Wasser- noch bei Wasser- oder Sucrose-Befüllung der Flaschen (Friedman-Test). Der basale Wasserkonsum war nicht unterschiedlich zwischen den beiden Zuchtlinien. Durch das Austauschen der Flaschen traten keine Flaschen- oder Positionseffekte auf (Wilcoxon: Parameter Flasche rechts, Flasche links pro Käfig pro Linie bzw. Parameter Flasche 1, Flasche 2 pro Käfig pro Linie). Bei freier Wahlmöglichkeit zwischen Wasser und 1 % Sucroselösung zeigte sich kein Unterschied im Wasserkonsum. Allerdings tranken LAB-Ratten in allen Messintervallen signifikant bzw. tendenziell mehr Zuckerlösung als HAB-Ratten (Abb. 18).

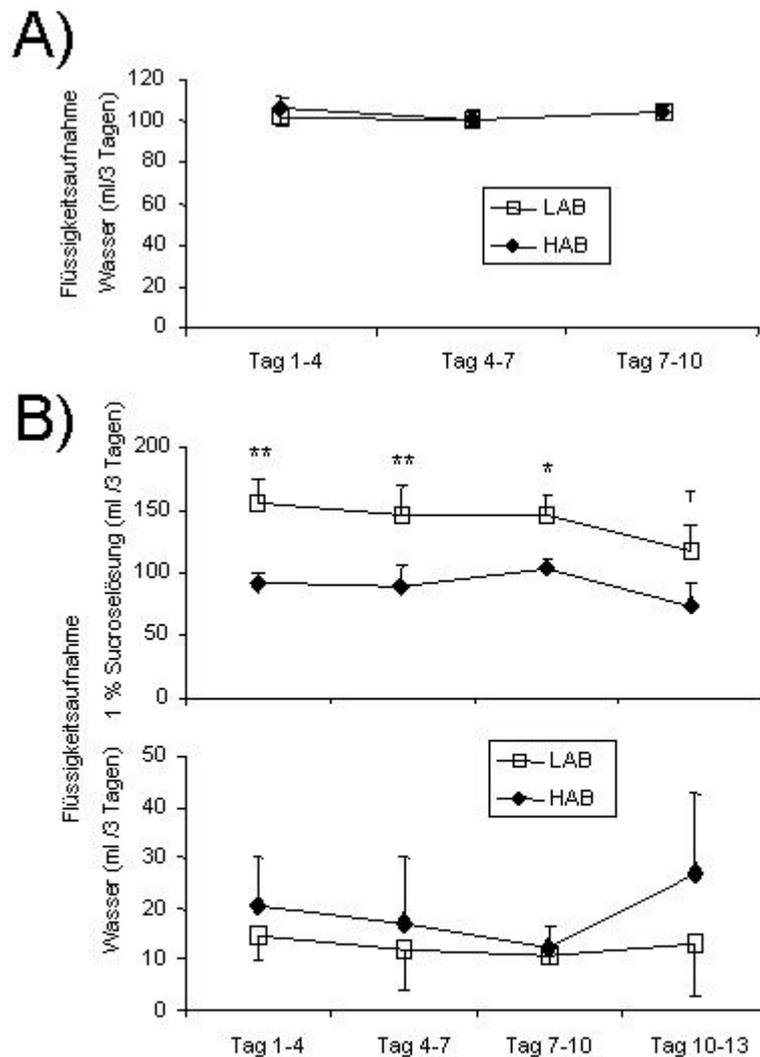


Abbildung 18. Trinkverhalten von ungestressten, einzeln gehaltenen HAB- und LAB-Ratten, gemessenen in jeweils dreitägigen Intervallen, unter basalen Bedingungen und im Zuckerkonsumtest für Anhedonie (Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, $\dagger p < 0,1$ vs. HAB).

A) Wasseraufnahme von HAB- und LAB-Ratten.

B) Flüssigkeitsaufnahme von HAB- und LAB-Ratten bei freier Wahlmöglichkeit zwischen Wasser und 1 % Sucroslösung.

Diskussion

Die Ergebnisse dieses Versuchs bestätigen, dass HAB/LAB-Ratten ein vergleichbares, nicht aber übermäßiges Trinkverhalten und damit keine Anzeichen eines Diabetes insipidus aufweisen. Bei freier Wahl zwischen Wasser und sucroshaltiger Lösung tranken LAB-Ratten bis zu einem Drittel mehr Zuckerwasser als HAB-Ratten (Abb. 18).

Bereits Liebsch et al. (1998a) zeigten, dass ausgezüchtete HABs und LABs nicht in ihrer Trinkmenge differierten. Bei Erzeugung einer Inzuchtlinie können sich durch Selektion und damit einhergehender genetischer Drift Gene anreichern, die bei heterozygotem Auftreten bei ausgezüchteten Tieren keine Auswirkung auf physiologische Prozesse haben, wohl aber bei homozygoter Präsenz, wie es für ingezüchtete Tiere nach mehreren Generationen postuliert wird (Mormede et al., 2002). Das AVP-System im PVN – in HAB/LAB-Ratten unterschiedlich reguliert durch das homozygote Vorhandensein der Wildtyp- bzw. mutierten Allele (Murgatroyd et al., 2004; Wigger et al., 2004) – trägt einen wichtigen Teil zur Steuerung der Osmoregulation und damit zum Trinkverhalten bei. Auch wird von Patienten mit Schizophrenie oder chronischen Psychopathologien berichtet, dass sie Zeichen von Polydipsie in Zusammenhang mit einer in diesem Fall gesteigerten AVP-Sekretion aufweisen. Die Ursachen für beides sind jedoch noch ungeklärt (McKinley et al., 2004).

Die stressinduzierte AVP-Sekretion innerhalb des PVN und peripher in das Blutplasma wurden als voneinander unabhängig erwiesen (Wotjak et al., 1996). Dennoch war nicht auszuschließen, dass die im sowohl parvo- als auch magnozellularen Teil des PVN gefundene AVP-Überexpression in HAB-Ratten (Wigger et al., 2004) über das Hypothalamus-Neurohypophysen-System einen Einfluss auf die Osmoregulation der Tiere haben könnte. Dass sich unter basalen Bedingungen keine Unterschiede im Wasserhaushalt beider Linien zeigten, unterstützt die Hypothese der Unabhängigkeit von zentraler – in HABs basal erhöhter (Wigger et al., 2004) – und peripherer AVP-Sekretion ebenso wie die These, dass nicht alleine die mutierten Formen der Polymorphismen im AVP-Gen von HABs, sondern vielmehr auch intra- und extrazelluläre Faktoren für die zentral erhöhte AVP-Sekretion und den darauf resultierenden Unterschied in der HPA-Achsen-Aktivität und auch das Angstverhalten verantwortlich sind. Dabei könnten die SNPs im AVP-Gen als Angriffspunkt für modulierende Faktoren kausal an der Ausprägung letzterer beteiligt sein.

Dass auch in HAB/LAB-Inzuchttratten keine Unterschiede im Wasserkonsum zu finden waren, war jedoch eine geeignete Voraussetzung für die Durchführung eines nicht modifizierten Sucrosekonsumtests im freien Wahlverfahren. HAB-Tiere erwiesen sich in diesem Test als anhedonisch gegenüber LAB-Tieren. In Anbetracht dessen, dass Anhedonie als zentrales Symptom und diagnostischer Marker für Depression angesehen wird (Keedwell et al., 2005), unterstreicht dies die Validität der HAB/LAB-Ratten als Modell für Depression und die zugrunde liegenden neurobiologischen Phänomene.

Dennoch ist der Sucrosekonsumtest als Marker für depressive Symptome nicht unumstritten. Problematisch haben sich dabei vor allem die verwendeten Tiermodelle erwiesen (Brenes Saenz et al., 2006). Das generell verfolgte Schema zur Herbeiführung depressionsähnlicher Verhaltensweisen als Ausgangspunkt für den Anhedonietest beruht zumeist darauf, die Versuchstiere mehrere Wochen, unberechenbarem, chronischem, aber mildem Stress zu unterziehen. Dieses Prozedere variiert jedoch oftmals in Durchführung, angewandten Stressoren und Dauer (Griffiths et al., 1992; Willner, 1997). Auch zeigte sich eine Abhängigkeit vom verwendeten Ratten- bzw. Mausstamm bezüglich der Ausprägung von Anhedonie nach Stress (Pothion et al., 2004; Brenes Saenz et al., 2006). Zwar wurde

mehrfach belegt, dass die nach chronisch mildem Stress verminderte Trinkmenge von Zuckerlösung durch die Gabe von Antidepressiva wieder erhöht werden kann (Willner et al., 1992; Willner, 1997), was aber nicht immer reproduziert werden konnte (Cryan und Mombereau, 2004). Axiolytika und Neuroleptika erwiesen sich als weitgehend ineffektiv (Willner, 1997). Auch zeigten Tiere nach Behandlung mit chronisch mildem Stress nur teilweise jene Symptome, die bei Depressionspatienten zu beobachten sind. So ergab die Prozedur leichte Veränderungen des Schlafverhaltens, des circadianen Rhythmus und einer erhöhten CORT-Sekretion, hatte aber keinen Einfluss auf das FS-Verhalten und die explorative Aktivität (Strekalova et al., 2004). Somit könnten weitere Untersuchungen von HAB/LAB-Ratten mit ihrer genetischen Prädisposition zu depressionsbezogenem Verhalten einerseits unter pharmakologischer Behandlung ein Modell zum eingehenderen Studium des Sucrosekonsumtests als validen Depressionsmarker darstellen. Zum anderen wäre die Analyse der (gemeinsamen) neurobiologischen Grundlagen von Depression und Anhedonie möglich.

Da Anhedonie auch als vermindertes Verlangen nach belohnenden Stimuli betrachtet werden kann, wurden die neuronale Verarbeitung von Anhedonie im Zusammenhang mit dem Belohnungssystem untersucht (Anisman und Matheson, 2005). Dabei wurde gezeigt, dass insbesondere die dopaminergen Systeme im medialen präfrontalen Cortex und im *Nucleus accumbens* sowie das ventrale Tegmentum an anhedonischen und auch depressiven Verhaltensweisen beteiligt sind. Diese Strukturen wurden durch fMRI-Studien an Depressionspatienten bestätigt. Insbesondere der ventromediale präfrontale Cortex und striatale Strukturen korrelierten in ihrer Aktivität mit positiven bzw. negativen Stimuli (Keedwell et al., 2005).

In den letzten Jahren wurde die Hypothese, dass Anhedonie mit einer Störung des dopaminergen Systems, insbesondere des Striatums/*Nucleus accumbens*, zusammenhängt, in Frage gestellt. Das Abnehmen des Konsums hedonischer Stimuli wurde vielmehr einer auf der Dysfunktion der dopaminergen Projektionen beruhenden verminderten Motivation und nicht der verminderten Konsumlust zugeschrieben (Heinz, 1999). So wurde vermutet, dass das Belohnungssystem drei Komponenten umfasst: hedonische Aktivierung, assoziatives Lernen zwischen Stimuli und deren hedonischen Konsequenzen sowie der daraus folgende motivierende Anreiz dieser Stimuli (Berridge und Robinson, 1998). Die Autoren stellen dar, dass das dopaminerge System weniger in ersten beiden Komponenten, sondern vor allem im Antrieb zum Erhalt der Belohnung greift („*Dopamine-depleted rats still ‘like’ rewards, and still know the rewards they ‘like’. They simply fail to ‘want’ rewards they ‘like’*“, Berridge und Robinson, 1998).

Auch bei den Ergebnissen vorliegender Studie ist zu beachten, dass HAB-Ratten zwar weniger Sucroselösung konsumierten als LAB-Ratten, aber insgesamt doch der vorher gemessenen konsumierten Wassermenge entsprechend. Dies deutet darauf hin, dass LAB-Ratten zugunsten des hedonischen Stimulus ihre Flüssigkeitsaufnahme steigerten. Auch das Absinken der konsumierten Sucroselösung im letzten Messintervall in LABs unterstreicht diese Annahme als Anzeichen einer Demotivation auf Grund einer kalorischen und osmotischen Sättigung. Somit wäre in folgenden Versuchen, bei Wiederverfügbarkeit von HAB/LAB-Ratten, eine Differenzierung von

Hedonie/Anhedonie und Konsummotivation nach Berridge und Robinson (1998) zu untersuchen. Außerdem bestünde die Möglichkeit, durch Mikrodialyse bzw. Manipulation des vom ventralen tegmentalen Areal ausgehenden dopaminergen Systems von HAB/LAB-Ratten die Interaktionen von Anhedonie, Motivation und depressionsbezogenem Verhalten eingehender zu studieren.

4. *In situ*-Hybridisierung und Immunohistochemie von AVP in HAB-, LAB-, F1- und NAB-Ratten

Um die Veränderung des AVP-Systems der Zuchtlinien näher zu charakterisieren, sollte neben dem Gehalt von AVP mRNA bzw. AVP im PVN von HAB/LAB-Ratten deren Vorkommen in F1- und NAB-Tieren quantifiziert werden. Außerdem sollte dies für die parvo- und magnozellige Region des PVN differenziert geschehen. Um die Ergebnisse mit Verhaltensparametern und Genetik der HAB/LAB-Tiere in Verbindung setzen zu können, sollten alle Tiere phäno- und genotypisiert werden.

Versuchsplan

Nach der Standard-Testung auf der EPM in der 7. Woche, wurden die Tiere (HAB n = 10, LAB n = 10, F1 n = 10, NAB n = 9) 2 h später dem FS-Test, nach einer Woche der DaLi-Testung und eine Woche darauf dem EPF-Test unterzogen. Unmittelbar nach der EPF-Exposition wurden die Tiere letal narkotisiert, Dekapitationsblut zur stressbezogenen HPA-Achsen-Aktivität gewonnen und das Gehirn entnommen, um die nach 10 min EPF noch basalen Expressionsmuster studieren zu können. Das Blutplasma wurde auf ACTH- und CORT-Gehalt untersucht und der AVP mRNA-Gehalt im PVN mittels ISH bestimmt. Die Genotypisierung erfolgte via SNP-Analyse des AVP-Gens in DNA aus Schwanzspitzengewebe (Abb. 14; technische Durchführung der Genotypisierung dieses Projekts durch C. Murgatroyd, MPI München).

Von einer weiteren Zusammenstellung von HAB- (n = 6), LAB- (n = 5) und NAB-Ratten (n = 6) wurden die Gehirne nach dem Durchlaufen der EPM-Testung perfundiert und der AVP-Gehalt im PVN per IHC bestimmt (technische Durchführung der IHC durch M. Bunck, MPI München, und N. Singewald, Universität Innsbruck).

Ergebnisse

Der Vergleich von HAB-, LAB- und F1-Ratten zeigte im Kruskal-Wallis-Test signifikante Unterschiede im AVP mRNA-Gehalt sowie in allen angstbezogenen Parametern und in der *struggling*-Dauer im FS-Test (Abb. 19). Auch war die Lokomotion teilweise unterschiedlich (Abb 19, Tabelle 3; $p < 0,01$: %Zeit auf den OA, *headdips*, Zeit im Hellen der DaLi, USV, *struggling*; $p < 0,05$: DaLi-rearings, AVP mRNA, Lokomotion DaLi und EPM). Kein oder nur ein tendenzieller Einfluss der Linienzugehörigkeit zeigte sich bei den neuroendokrinen sowie den Gewichtsparametern.

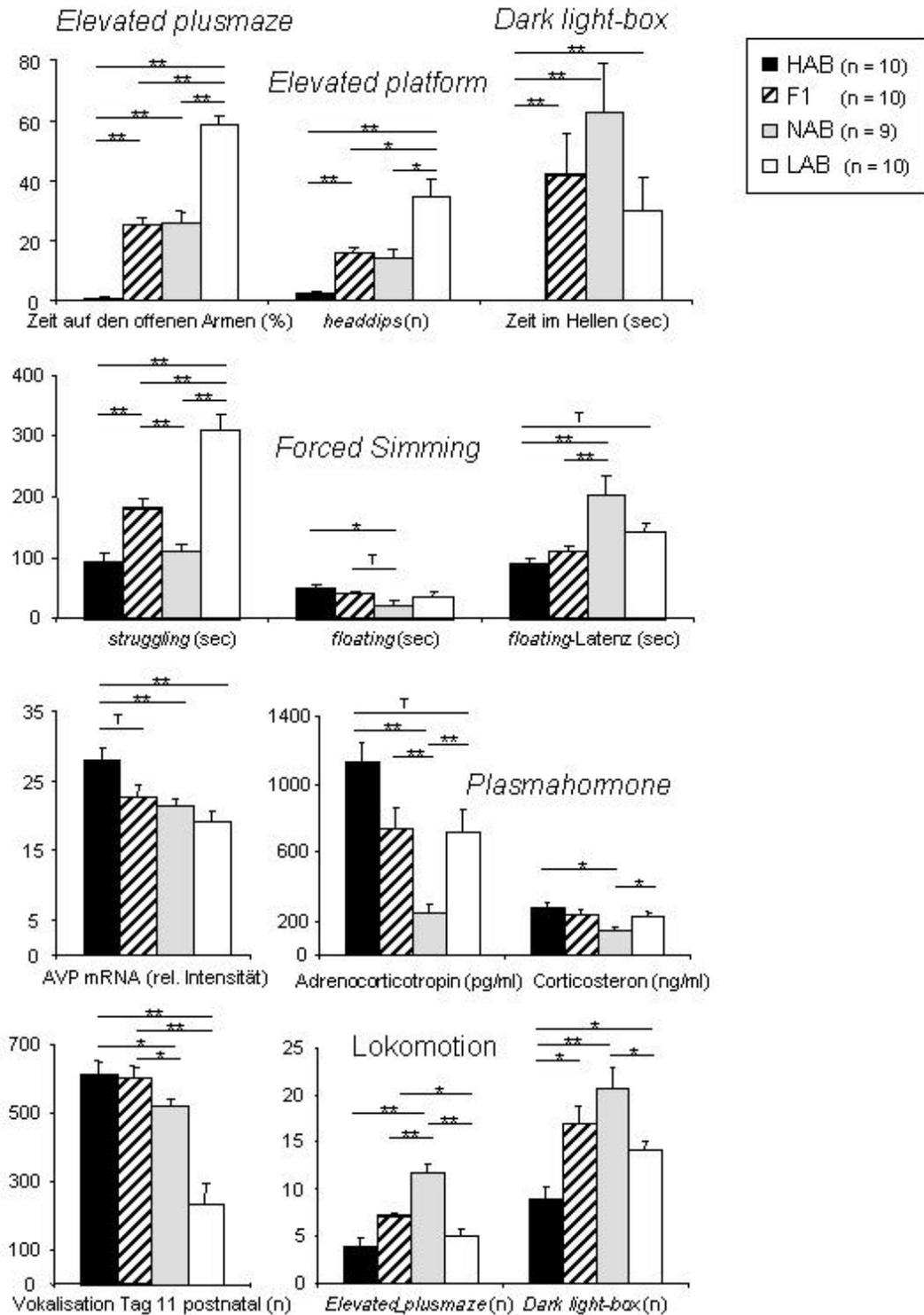


Abbildung 19 Charakterisierung von HAB-, F1-, NAB- und LAB-Ratten. Verhaltens- und neuroendokrine Parameter sowie AVP mRNA-Gehalt im PVN von HABs und LABs (Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, † $p < 0,1$).

HABs, LABs und NABs erwiesen sich im Kruskal-Wallis-Test in allen Parametern mit Ausnahme von Gewicht und Lokomotion beim USV-Test signifikant unterschiedlich (Abb 19; Tabelle 3; $p < 0,01$: %Zeit auf den OA, *headdips*, Zeit im Hellen der DaLi, USV, *struggling*; *floating*-Latenz, ACTH, AVP mRNA, Lokomotion DaLi und EPM, Gewicht; $p < 0,05$: DaLi-rearing, *floating*, CORT).

Die Untersuchung des AVP mRNA-Gehalts im PVN resultierte in einer deutlich erhöhten mRNA-Expression in HABs gegenüber allen anderen Linien, die sich nicht in ihrem Gehalt unterschieden. Dies beruhte auf einem erhöhten AVP-Gehalt pro Zelle, da sich die Linien nicht in der Größe des PVN unterschieden (rel. Größe: HAB: $1,55 \pm 0,09$, LAB: $1,31 \pm 0,09$; F1: $1,64 \pm 0,06$; NAB: $1,60 \pm 0,07$).

Während HABs und LABs auf der EPM das die Linien auszeichnende extreme Angstverhalten zeigten, erwiesen sich sowohl NABs als auch F1-Tiere darin intermediär. Diese Abstufung zeigte sich auch auf der EPF, auf der HABs kaum bzw. LABs viele *headdips* zeigten, während NABs und F1-Ratten zwischen den beiden Linien lagen. Auch im DaLi-Test unterschieden sich HAB- und LAB-Ratten extrem, indem erstere keinen Eintritt in das helle Areal aufwiesen und damit auch signifikant weniger Zeit im Hellen waren als F1-Tiere und NABs. LABs, F1- und NAB-Tiere waren nicht unterschiedlich in ihrem Angstverhalten in der DaLi. Während HABs und LABs im FS-Test deutlich in der mit *struggling* verbrachten Zeit differierten, war der Unterschied im Parameter *floating* nach Bonferroni-Korrektur nicht mehr signifikant.

Gleiches galt im Vergleich von HAB- und F1-Tieren, die ein intermediäres *struggling*-Verhalten zeigten. Umgekehrt waren zwischen HABs und NABs keine Unterschiede in der *struggling*-Dauer, aber sowohl in der *floating*-Dauer als auch -Latenz zu messen, die bei NABs am geringsten bzw. am höchsten von allen Gruppen war. Im Gegensatz dazu zeigten LABs die im Vergleich zu allen Gruppen längste *struggling*-Dauer.

Tabelle 3. Exploratives Verhalten in der DaLi und Lokomotion im USV-Test sowie Gewicht beim USV-Test im Alter von 11 Tagen und von adulten HAB-, F1-, NAB- und LAB-Ratten (Mittelwert \pm SEM; ^{LAB} $p < 0,05$ vs. LAB, ^{NAB} $p < 0,05$ vs. NAB, ^{F1} $p < 0,05$ vs. F1).

	HAB	F1	NAB	LAB
DaLi (<i>rearings</i> /min im Dunklen)	$2,96 \pm 0,42$ ^{LAB} ^{NAB}	$4,01 \pm 0,41$	$5,30 \pm 0,64$	$4,68 \pm 0,31$
Linienübertritte im USV-Test (n)	$28,2 \pm 4,56$	$30,0 \pm 4,39$	$35,3 \pm 5,85$	$22,7 \pm 4,09$
Gewicht im USV-Test (g)	$19,3 \pm 0,92$ ^{F1}	$16,0 \pm 0,52$ ^{NAB}	$19,2 \pm 0,55$	$16,4 \pm 1,75$
Adultgewicht (g)	$307 \pm 5,52$ ^{F1} ^{NAB}	$336 \pm 6,83$ ^{NAB}	$396 \pm 8,31$	$314 \pm 6,48$ ^{NAB}

In Reaktion auf die Separation vom Muttertier zeigten 11 Tage alte HABs vermehrt USV gegenüber NABs und LABs, die deutlich weniger vokalisiert als alle anderen Gruppen. Während sich HAB- und F1-Tiere nicht unterschieden, wiesen NABs weniger Rufe als letztere auf. Im USV-Test fanden sich keinerlei Lokomotionsunterschiede, jedoch erwiesen sich F1-Jungtiere leichter als HABs und NABs.

Die Untersuchung der neuroendokrinen Blutparameter ergab vor einer Bonferroni-Korrektur für ACTH einen erhöhten Gehalt in HABs gegenüber allen anderen Linien, der nach Bereinigung der Signifikanzniveaus nur noch für NABs und LABs tendenziell annehmbar blieb. F1- und LAB-Tiere zeigten keinen Unterschied, wohingegen NABs einen stark erniedrigten ACTH-Gehalt gegenüber allen Linien aufwiesen. Dies spiegelte sich auch im CORT-Gehalt wider, der in NABs geringer war als in allen anderen Gruppen, die sich darin nicht unterschieden.

Während sich keine Lokomotionsunterschiede auf der EPM zwischen HAB- und LAB- sowie HAB- und F1-Ratten zeigten, waren NABs gegenüber allen anderen Gruppen auf der EPM vermehrt lokomotorisch aktiv. Außerdem differierten LAB- und F1-Tiere in diesem Parameter. Ähnliches zeigte sich in der DaLi-Lokomotion. Hier waren HABs weniger mobil als alle Gruppen, wohingegen NABs am stärksten lokomotorisch aktiv waren.

Im Gewicht unterschieden sich HABs und LABs nicht, jedoch HAB- und F1-Tiere. NABs wiesen ein höheres Gewicht als alle anderen Gruppen auf (Tabelle 3).

Die Genotypisierung bestätigte den homozygoten Genotyp der HAB- bzw. LAB-Tiere bezüglich der jeweiligen AVP-Allele. F1-Ratten waren durchgehend heterozygot sowie alle NAB-Tiere homozygot für das LAB-Wiltyp-Allel (Murgatroyd, unveröffentlicht).

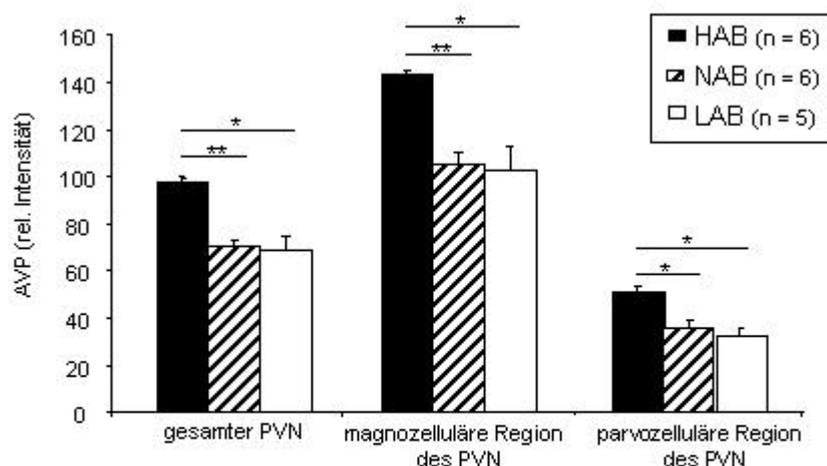


Abbildung 20. Charakterisierung von HAB-, NAB- und LAB-Ratten. AVP-Gehalt im PVN von HAB-, NAB- und LAB-Ratten anhand von immunhistochemischen Untersuchung des PVN und seiner Subregionen quantifiziert (Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

Die Korrelation der untersuchten Parameter von HAB-, F1- und LAB-Ratten zeigte, dass alle Angstparameter (*headdips*, $R = 0,78$; DaLi-Zeit im Hellen, $R = 0,60$; USV, $R = -0,63$) stark miteinander korrelierten. Auch war ein Zusammenhang von *struggling* mit der %Zeit auf den OA ($R = 0,80$) und den *headdips* ($R = 0,74$) zu erkennen. Der AVP mRNA-Gehalt im PVN hingegen korrelierte ausschließlich mit der %Zeit auf den OA ($R = 0,63$). Eine Korrelation innerhalb der 10 Tiere der jeweiligen Subpopulation zeigte keinerlei signifikanten Zusammenhang.

Die IHC bestätigte die Ergebnisse der ISH, indem HABs einen erhöhten AVP-Gehalt im PVN gegenüber NABs und LABs aufwiesen, die sich nicht unterschieden. Dies traf auch für eine Analyse des PVN, unterteilt in dessen magno- und parvocelluläre Subregionen, zu (Abb. 20).

Ein individueller Vergleich des AVP-Gehalts im PVN mit dem Angstverhalten der jeweiligen Ratten auf der EPM ergab eine Korrelation der Parameter für das gesamte Kerngebiet als auch für die beiden Subregionen, wobei Tiere mit mehr AVP im PVN erhöhte Ängstlichkeit auf der EPM zeigten (Abb. 21).

Diskussion

In der eingehenden Analyse des Verhaltens und der neuroendokrinen Parameter in Zusammenhang mit AVP im PVN bestätigten sich einerseits die Unterschiede zwischen HAB- und LAB-Ratten und andererseits der weitgehend intermediäre Phänotyp von kreuzgezüchteten F1-Tieren. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass HABs eine pathologische Überexpression von AVP nicht nur gegenüber LAB- und F1-Ratten (Wigger et al., 2004), sondern auch gegenüber normalen Wistar-Ratten aufweisen (Abb. 19). Dass keine Unterschiede in der Größe des PVN zwischen den Tiergruppen gefunden wurden, zeigt, dass HABs mehr AVP mRNA pro Zelle exprimieren als LABs, NABs und F1-Ratten. Dies wurde auf zellulärer Ebene auch von Murgatroyd et al. (2004) mittels allelischer Transkription gezeigt. In neutralem Hintergrund einer F1-Zelle wurde das HAB-AVP-Allel weniger stark transkribiert als das LAB-AVP-Allel. Da es sich bei letzterem um die genetische Sequenz des Wildtyps handelt, unterstützt dies das Ergebnis der nicht unterschiedlichen Expression von AVP in LABs und NABs. Sowohl der AVP mRNA-Gehalt als auch die gemessene Menge des Proteins selbst korrelierten mit dem Angstverhalten auf der EPM, indem ängstlichere Tiere mehr AVP mRNA aufwiesen. Das Verhalten auf der EPM korrelierte sowohl mit juvenilem Angstverhalten als auch mit der Angstausrprägung auf der EPF. Letztere standen aber in keinem Zusammenhang mit dem AVP mRNA-Gehalt. Es ist zu vermuten, dass es sich in den erhobenen Parametern um unterschiedliche Ausprägungen von angeborener Angst handelt, die nur teilweise auf einer überwiegend AVP-basierten Regulation beruhen. So könnten zur Ausprägung des Angstverhaltens in Jungtieren und auf der EPF überwiegend die CRH-Systeme in der zentralen Amygdala und im BNST beitragen, da auch diese zwischen HABs und LABs unterschiedlich reguliert sind (Wigger et al., 2004). Wie an Mäusejungtieren im USV-Test gezeigt, sind diese insbesondere unter stressvollen Testbedingungen durch die Gabe von CRH in ihrer Vokalisation beeinflussbar (Dirks et al., 2002). In die zentrale Amygdala appliziert, verstärkte CRH die Exploration unter Stress (Wiersma et al., 1995).

Dies könnte das EPF-Verhalten in LABs widerspiegeln. Das Ausbleiben der erwarteten Korrelation von AVP und den Stresshormonen ist vermutlich insbesondere dem annähernd gleichen ACTH- und CORT-Gehalt in LABs und F1-Tieren geschuldet. Dies reflektiert aber dennoch den AVP mRNA-Gehalt als übermäßig in HABs und vergleichbar in allen anderen Tiergruppen.

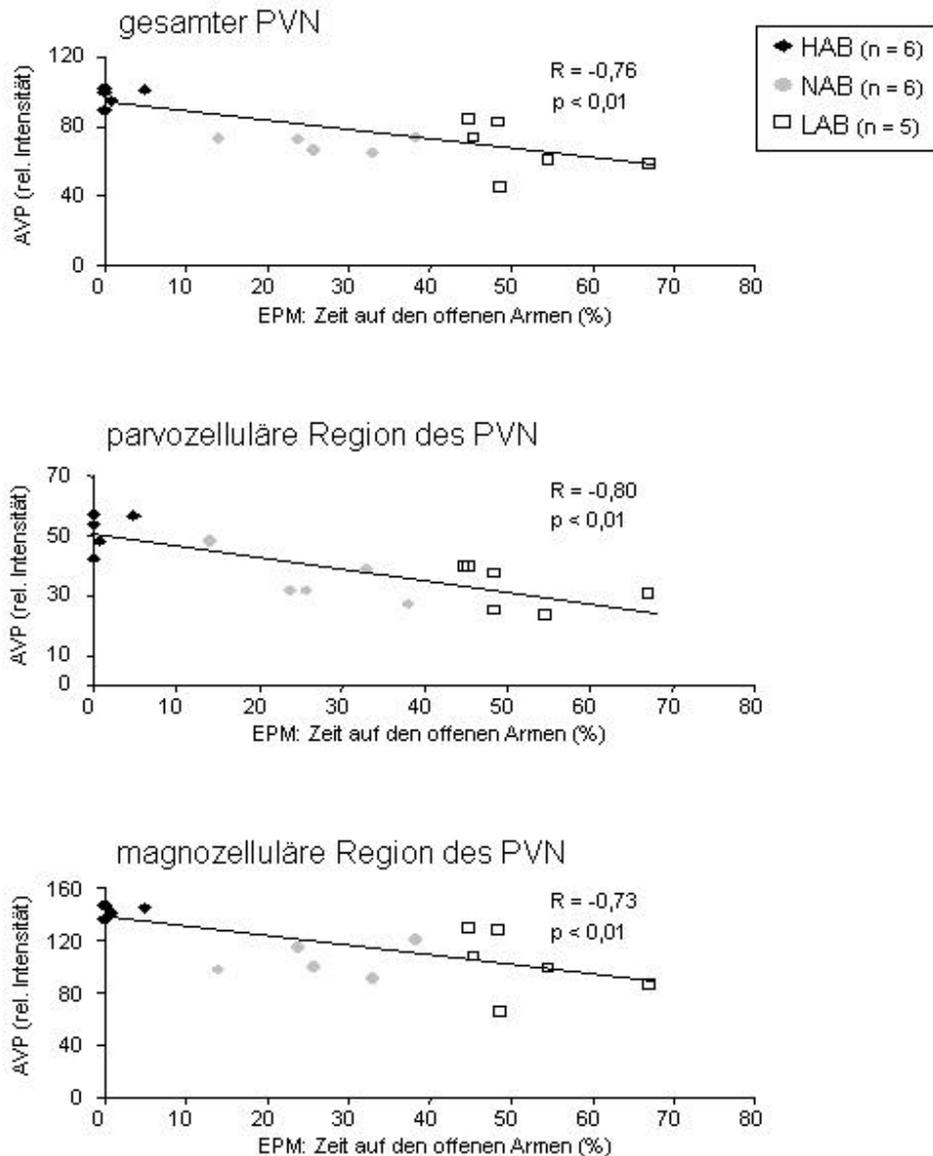


Abbildung 21. Charakterisierung von HAB-, NAB- und LAB-Ratten. Korrelationsanalyse des in der immunhistochemischen Untersuchung des PVN und seiner Subregionen und bereits in Abb. 20 aufgeführten AVP-Gehalts in HAB-, NAB- und LAB-Ratten mit deren Angstverhalten auf der *elevated plus maze* (EPM). R Korrelationskoeffizient.

NABs waren im Gegensatz zu HAB-, LAB- und F1-Tieren in einigen Parametern uneinheitlich. Zeigten sie ein weitgehend zwischen HABs und LABs liegendes Angstverhalten, so

waren sie im FS-Test ähnlich bzw. sogar vermehrt passiv in ihrem Verhalten im Vergleich zu HABs. Demgegenüber sezernierten sie weit weniger Stresshormone als alle anderen Gruppen und waren stärker motorisch aktiv. Auch das weit höhere Gewicht unterstreicht, dass NAB-Tiere durch ihren Auszucht-Status nur bedingt geeignete Kontrollen zur HAB/LAB-Inzucht bilden (Tabelle 3). Dies könnte auch einen Einfluss auf das Schwimmverhalten der Tiere gehabt haben, was die Vergleichbarkeit der Parameter mit HABs und LABs in Frage stellt. Vielmehr bieten F1-Tiere mit intermediärem und somit nicht-pathogenem Verhalten eine geeignete Relation zu den Zuchtlinien. Daher wurden NABs in die Korrelationsanalyse der erhobenen Parameter nicht mit einbezogen.

Der wenig ausgeprägte Unterschied im passiven Verhalten der Ratten im FS-Test unterstreicht die Notwendigkeit der gleichzeitigen Erfassung des aktiven Parameters *struggling*. Dass *floating* und *struggling* zwei Entitäten in der Untersuchung von depressionsbezogenem Verhalten von Nagern darstellen, wurde sowohl durch Faktoranalyse (Brenes Saenz et al., 2006) als auch in Studien unter Verwendung von verschiedenen Antidepressiva gezeigt (Page et al., 1999).

Während durch die Selektion auf extreme Ängstlichkeit die Angstparameter zwischen HAB-, F1- und LAB-Ratten untereinander sowie komorbid mit den depressionsbezogenen Parametern korrelierten (Abb. 19 und 21), fanden sich innerhalb der Subpopulationen keine Zusammenhänge. Dies mag einerseits an der relativ geringen Tierzahl liegen, andererseits spricht es aber dafür, dass die inzüchtige Selektion auf einen bestimmten Phänotyp eine in sich homogene Tiergruppe erzeugt hat. Diese eröffnet die Möglichkeit, Untersuchungen an einzelnen Individuen vorzunehmen, die stellvertretend für die Gesamtpopulation sind – unabhängig von genetischen und epigenetischen Faktoren. Vielmehr können ebendiese dadurch aufgedeckt werden.

Die Grundlagen der Komorbidität von Angst und Depression sind nach wie vor weitgehend unklar (Pollack, 2005). Um sich der Fragestellung zu nähern, ob gemeinsame neuronale Bahnen oder Angsterkrankungen *per se* die Pathogenese einer damit in Zusammenhang stehenden oder davon unabhängigen Depression begünstigen, wäre es von Interesse, HAB-Ratten zu identifizieren und zu untersuchen, die keine Komorbidität aufweisen bzw. HAB-Ratten durch prä- und postnatale Einflüsse so zu manipulieren, dass eine Komorbidität nicht eintritt.

Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen, dass HABs und LABs die beiden Verhaltensexreme in angstbezogenem Verhalten darstellen und komorbid depressionsbezogenes Verhalten aufweisen. Dies war bei NABs nicht der Fall. Während LABs und NABs ein ähnliches Niveau der AVP-Expression aufwiesen, wurde auch gezeigt, dass diese in HABs pathologisch überaktiv ist.

5. Intrazelluläre Einflüsse auf die AVP-Expression: CBF-A *in situ*-Hybridisierung im PVN von HAB- und LAB-Ratten

Die Expression eines Gens unterliegt einer Vielzahl von intrazellulären wie auch extrazellulären regulatorischen und modulatorischen Faktoren. Diese beeinflussen die Transkription,

die RNA-Modifikation, den RNA-Abbau, die Translation sowie die Proteinmodifikation und Sortierung (Sadock und Sadock, 2005). Insbesondere für die intrazelluläre Regulation der Transkription werden u.a. *cis*- und *trans*-Mechanismen beschrieben (Lee et al., 2006). Als *trans*-regulatorische Elemente wurden u.a. Protein-DNA- sowie Protein-Protein-Wechselwirkungen – auch solche, die nicht in der unmittelbaren Umgebung des Gens selbst lokalisiert sind – beschrieben. Diesen wird der überwiegende Einfluss auf die Gentranskription zugeschrieben. Dahingegen sind *cis*-wirkende Regulatoren auf demselben Chromosom wie das Gen selbst zu finden. Diese werden für 30 % der differentiellen Gen-Expression zwischen Individuen verantwortlich geschätzt. Um *cis*-Mechanismen detektieren zu können, kann die allelspezifische Transkriptionsrate in heterozygoten Tieren untersucht werden, sofern sich Marker-SNPs in unmittelbarer Umgebung bzw. innerhalb des Kandidatengens befinden. Weicht die Transkription der jeweiligen Allele – zu identifizieren durch die SNPs – von der erwarteten 1:1-Rate im identischen zellulären Hintergrund von heterozygoten Tieren ab, so kann dieses allelische Ungleichgewicht einen *cis*-wirkenden Regulationsmechanismus indizieren (Lee et al., 2006).

Wie von Murgatroyd et al. (2004) dargelegt, konnten in der Promotorregion des AVP-Gens 10 zwischen HABs und LABs differierende SNPs identifiziert werden. Die Isolation von mRNA aus dem Gehirngewebe von heterozygoten F1-Ratten erlaubte mittels eines Reporter-SNPs auf dem jeweiligen Allel die Quantifizierung der AVP mRNA-Expressionsrate von HAB- bzw. LAB-Allelen im identischen zellulären Milieu. Dabei wurde im PVN für die Expression der AVP mRNA ein allelisches Ungleichgewicht festgestellt, da die HAB-AVP mRNA stärker transkribiert wurde als die LAB-AVP mRNA. Keine Unterschiede fanden sich in der Transkriptionsrate der Oxytocin mRNA. Dies ließ das Vorhandensein eines divergenten *cis*-regulatorischen Elements für AVP in HABs und LABs vermuten. In der Untersuchung des HAB-AVP-Allels konnte der SNP A(-1276)G als möglicher Kandidat für die *cis*-Regulation der AVP-Expression identifiziert werden. Dieser befindet sich innerhalb der CArG-*box*, einer DNA-Bindungsregion für den repressiven Transkriptionsfaktor CBF-A. Durch verschiedene *in vitro*-Studien konnten Murgatroyd et al. (2004) zeigen, dass die Affinität bzw. Bindungskapazität dieses Repressors für die CArG-*box* in LAB-Ratten niedriger war als in HAB-Ratten.

Um die spezifische Relevanz des SNP A(-1276)G zu prüfen, wurde ein minimales Promotorkonstrukt erzeugt, das nur die jeweilige CArG-*box* einer oder beider Linien repetitiv enthielt. Während die ein- bis dreifache HAB-CArG-*box* zu starker Aktivierung des nachgeschalteten TATA-Elements führte, wurde diese durch den Einbau von einer bis dreier LAB-CArG-*boxen* effektiv unterdrückt. Auch wurde das reine LAB-Promotorkonstrukt in seiner Aktivität durch Zugabe von CBF-A stärker reprimiert als das reine HAB-Promotorkonstrukt.

Während die beschriebene AVP-Überexpression in HABs im PVN gefunden wurde, wies der ebenso stark AVP-exprimierende SON keine Unterschiede im AVP mRNA-Gehalt auf (Wigger et al., 2004). Dass die Expression von AVP in diesem Kerngebiet nicht verändert war, bestätigte eine vergleichbare Transkriptionsrate des HAB- bzw. LAB-AVP-Allels in heterozygoten Tieren (Murgatroyd et al., 2004). Das Vorhandensein der genetischen Mutationen von AVP in allen

Gehirnregionen vorausgesetzt, wäre zu erwarten, dass alle zentralnervösen vasopressinergen Regionen einen vermehrten AVP-Gehalt in HABs gegenüber LABs aufwiesen. Da der SON diese nicht zeigt, ist anzunehmen, dass intra- und/oder extrazelluläre Einflüsse auf den PVN – unabhängig von oder ansetzend an der vorhandenen Mutation im AVP-Gen in HAB-Ratten – dessen AVP-Gehalt erhöhen. Um dies zu untersuchen, sollten sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Kandidaten in Betracht gezogen werden.

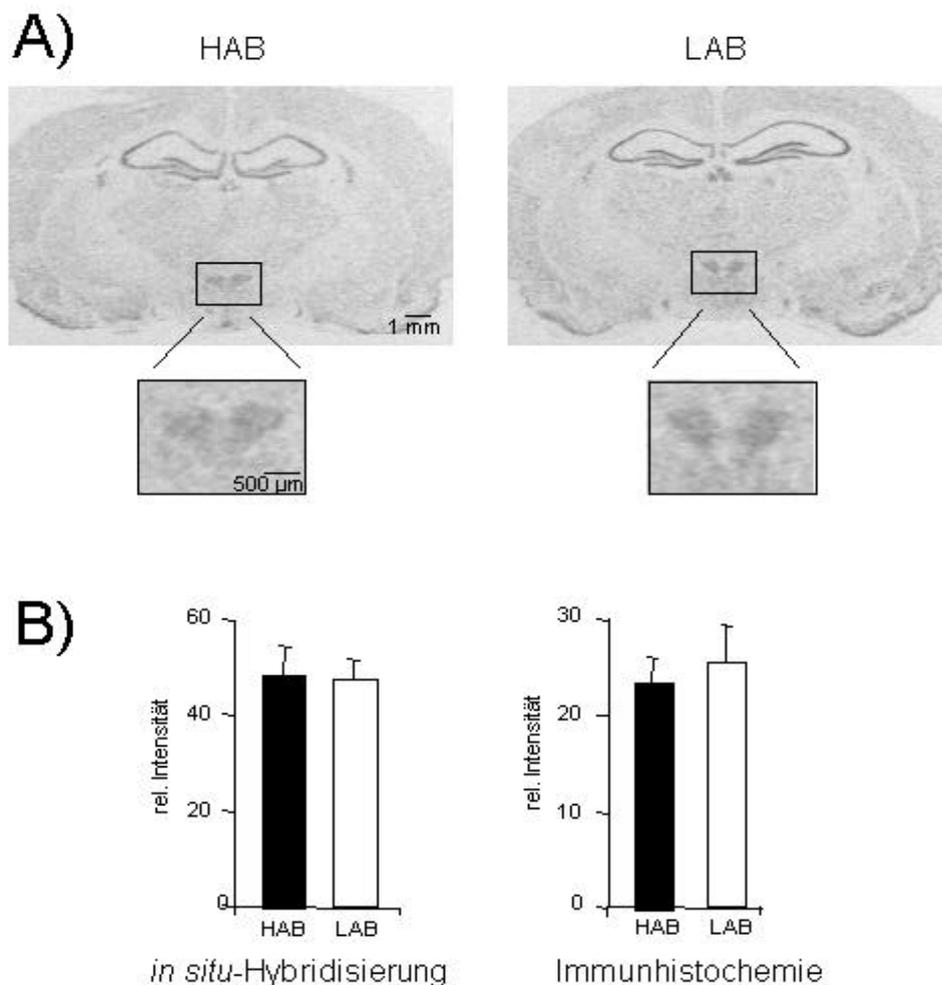


Abbildung 22. Vergleich des CBF-A mRNA- bzw. CBF-A-Gehalts im PVN von HAB- und LAB-Ratten.

A) Repräsentative Negativfärbung nach CBF-A mRNA *in situ*-Hybridisierung auf Ebene des PVN mit vergrößertem Ausschnitt des Kerngebiets.

B) CBF-A mRNA- sowie CBF-A-Gehalt von HABs und LABs auf Ebene des PVN mittels *in situ*-Hybridisierung bzw. immunhistochemischen Untersuchungen ermittelt und dargestellt als Intensität der jeweiligen relativen Grauwerte (Mittelwerte \pm SEM).

Zur Untersuchung eines möglichen intrazellulären Einflusses von CBF-A *in vivo* sollte im PVN von HABs und LABs der basale Gehalt von CBF-A mittels ISH bzw. IHC ermittelt werden. Durch Doppelmarkierung von CBF-A und AVP per IHC sollte außerdem die Kolokalisation der beiden Proteine in denselben Zellen nachgewiesen werden.

Versuchsplan

Mittels ISH wurde der basale CBF-A mRNA-Gehalt in ungestressten HAB- (n = 8) und LAB-Ratten (n = 10) quantifiziert. Per Fluoreszenz-Doppelmarkierung von basal perfundierten HABs (n = 5) und LABs (n = 5) wurde via IHC der Proteingehalt von CBF-A quantifiziert und die zelluläre Kolokalisation mit AVP in denselben Schnitten geprüft (technische Durchführung der Doppelmarkierung durch M. Bunck, MPI München, und N. Singewald, Universität Innsbruck).

Ergebnisse

HAB- und LAB-Ratten wiesen keinen Unterschied im basalen CBF-A mRNA-Gehalt des PVN (Abb. 22) wie auch des SON (relative Intensität: HAB basal $75,8 \pm 4,14$; LAB basal $70,9 \pm 3,28$) auf. Diese Ergebnisse wurden durch IHC bestätigt (Abb. 22). Gezeigt wurde außerdem, dass CBF-A und AVP in denselben Zellen koexprimiert werden (Abb. 23; gemeinsam mit C. Murgatroyd erarbeitet).

Auch deutet die starke Schwärzung des Films über den gesamten Schnitt hinweg auf eine ubiquitäre Expression des Transkriptionsfaktors hin (nicht-quantifizierte Beobachtung).

Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass CBF-A als möglicher Regulator der differentiellen AVP-Expression von HABs und LABs im PVN nicht unterschiedlich vorhanden war (Abb. 22). Auch fanden sich keine Unterschiede des CBF-A-Gehalts im SON. Aus der IHC-Doppelmarkierung von AVP und CBF-A im PVN wurde ersichtlich, dass CBF-A ein möglicher Repressor des AVP-Gens ist, da beide Proteine in denselben Zellen koexprimiert werden (Abb. 23).

Die ubiquitäre Expression von CBF-A wurde vormals beschrieben und dort in Zusammenhang mit der Beteiligung an der Regulation von *serum response elements* diskutiert (Rushlow et al., 1999). Vermehrt wurde es neben zentralnervösen Strukturen wie Hippocampus und Cerebellum auch peripher in Milz, Lunge und Thymus gefunden. Die deutliche Expression von CBF-A und zelluläre Kolokalisation mit AVP im PVN zeigte dessen mögliche Aktivität als Repressor *in vivo*. Dass keine Unterschiede im CBF-A-Gehalt, aber in der AVP-Expression gefunden wurden, unterstreicht die mangelhafte Suppression des HAB-AVP-Allels durch den Repressor. Allerdings wurden auch im SON keine Unterschiede im CBF-A-Gehalt gefunden, hier einhergehend mit nicht differenter AVP-Expression zwischen den Linien. Da die AVP-Mutation der HABs auch dort in Interaktion mit CBF-A zu einer erniedrigten Expressionssuppression führen sollte, ist somit fraglich,

Dennoch deuten die Ergebnisse der ISH und IHC vielmehr auf den Einfluss weiterer Faktoren hin, die die Aktivität von CBF-A regulieren, die Transkription direkt an den AVP-SNPs angreifend modulieren oder vollkommen unabhängig von beiden agieren.

Insgesamt ist somit gezeigt, dass der *CarG-box* SNP in HAB/LAB-Ratten – wie in *in vitro*-Experimente eindeutig erwiesen (Murgatroyd et al., 2004) – zur Überexpression von AVP im Zusammenspiel mit dem Repressor CBF-A beitragen kann, dass aber *in vivo* nicht-lineare, komplexe Faktoren mitberücksichtigt werden müssen.

6. Extrazelluläre Einflüsse auf die AVP-Expression: Mikrodialyse von Neurotransmittern im PVN von HAB- und LAB-Ratten

Die Kontrolle des PVN und damit der HPA-Achse obliegt vielen Gehirnregionen – allen voran Amygdala, BNST, Septum, Hippocampus und präfrontaler Cortex –, die an der Interpretation und Integration der Stressantwort beteiligt sind (Herman und Cullinan, 1997). Diese ermöglichen durch Exzitation und Inhibition des PVN eine fein abgestufte Reaktion auf externe und interne Stimuli. Zusätzlich wird die Plastizität durch lokale Regelkreise innerhalb bzw. in unmittelbarer Umgebung des Kerngebiets erhöht.

Der PVN wird in seiner Aktivität von Monoaminen, Aminosäuren und Neuropeptiden in Funktion als Neurotransmitter bzw. -modulatoren reguliert (Hokfelt et al., 2000). Wie bereits von Umriuhkin et al. (2002) gezeigt, unterscheiden sich HABs und LABs in ihrer Serotonin-Ausschüttung im PVN weder basal noch in Reaktion auf den milden Stress einer EPF-Exposition. Wurden die Ratten jedoch dem emotional und physisch beanspruchenden FS-Test ausgesetzt, reagierten HABs mit vermehrter Serotonin-Ausschüttung gegenüber LABs.

Innervationen von pontinen und medullären katecholaminergen Arealen – unter ihnen der *Locus coeruleus* und der laterale tegmentale noradrenerge Nucleus – sind hauptverantwortlich für die noradrenerge Steuerung des PVN (Pacak, 2000). Die Neuronen des *Locus coeruleus* reagieren dabei in ihrer Aktivität auf Stressoren und feuern vor allem bei Stimuli, die das momentane Verhalten unterbrechen und eine Neuorientierung der Aufmerksamkeit verlangen (Sadock und Sadock, 2005).

Die dopaminergen Neuronen sind in drei Projektionssysteme unterteilt. Das tuberohypophysäre System, dessen Neuronen im *Nucleus arcuatus* und im periventriculären Nucleus gelegen sind, projiziert dabei in die Adenohypophyse und beeinflusst dort inhibitorisch die Freisetzung von Prolaktin (Sadock und Sadock, 2005). In komplexer Interaktion stehen die Aminosäuren Glutamat und GABA in der Regulation des PVN. Glutamat fungiert als wichtigster ubiquitärer exzitatorischer Neurotransmitter im Säugerhirn. Bis zu 80 % der zentralnervösen Synapsen werden als glutamaterg angenommen und die zugehörigen Neuronen zumeist als Projektionsneuronen beschrieben (Sadock und Sadock, 2005). Für den PVN wurde allerdings berichtet, dass bis zu 40 % der glutamatergen Synapsen aus dem Kerngebiet selbst entspringen (Csaki et al., 2000). GABAerge Neuronen sind zentralnervös als vorwiegend kleine Interneuronen mit kurzen

Axonen beschrieben, die Projektionen aus anderen Gebieten per inhibitorischer Verschaltung fokussieren und integrieren. Dies gilt auch für den PVN (Sadock und Sadock, 2005). Die glutamaterge bzw. GABAerge Innervation des PVN erfolgt einerseits direkt vor allem durch den BNST, das mediale präoptische Areal und den dorsomedialen Nucleus andererseits indirekt über den peri-PVN, der vorwiegend vom Hippocampus, ventralen *Subiculum*, lateralen Septum, der medialen Amygdala und dem präfrontalen Cortex glutamaterg innerviert wird (Csaki et al., 2000; Herman et al., 2003). Die Umgebungsstruktur des PVN ist wiederum GABAerg mit dem PVN verschaltet, so dass es zu einer indirekten Inhibition kommt (Herman et al., 2002; 2005).

Dass auch Taurin und Aspartat eine Rolle in der Regulation des PVN spielen, zeigten Mikrodialyseexperimente, die im PVN, nicht aber im SON eine vermehrte Sekretion der beiden Neurotransmitter auf Grund von hyperosmotischer Stimulation zur Folge hatten (Horn et al., 1995). Der vermutlich modulatorische Einfluss von Taurin und Aspartat auf die Exzitabilität der Neuronen und deren Rezeptoren sind jedoch noch nicht näher beschrieben (Sadock und Sadock, 2005).

Zum Studium möglicher extrazellulärer Einflüsse auf den PVN sollten daher die inhibitorischen sowie exzitatorischen Neurotransmitter Noradrenalin, Dopamin, GABA, Glutamat, Taurin und Aspartat per Mikrodialyse des Kerngebiets gemessen werden.

Versuchsplan

Zur Untersuchung möglicher extrazellulärer Einflüsse wurde in den PVN von HAB- und LAB-Ratten 4 Tage vor Versuchsbeginn unilateral eine Mikrodialyse-Sonde implantiert. In Anlehnung an Umriuhkin et al. (2002) wurden pro Versuchstag zwei basale Proben, eine während und zwei nach Stressorexposition gesammelt. An Versuchstag 1 wurde als Stressor die EPF-Exposition gewählt. Am darauffolgenden Tag wurden die Tiere nach demselben Zeitschema dem FS-Test

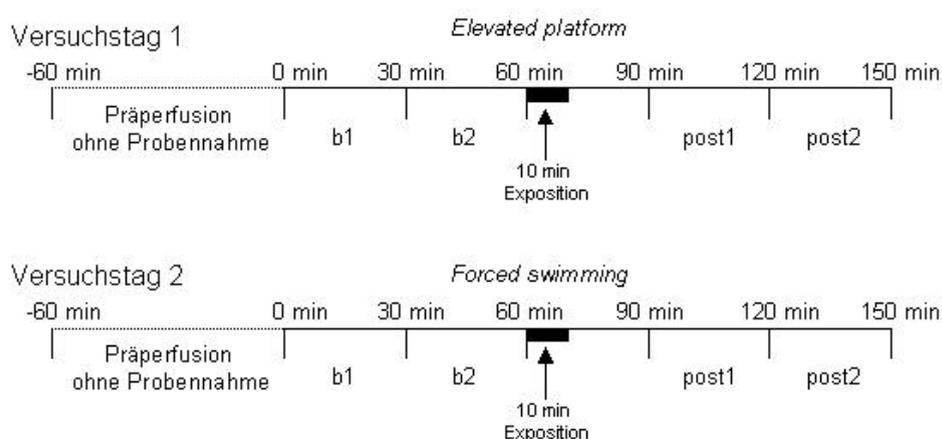


Abbildung 24. Zeitplan der Probennahme bei Mikrodialyse des PVN. An beiden Versuchstagen wurden nach einstündiger Präperfusion Dialysate über jeweils 30 min hinweg gesammelt. Vor der Stressorexposition wurden jeweils zwei basale Proben abgenommen (b1, b2). Die Stressorexposition erfolgte jeweils zu Beginn des 3. Perfusionsintervalls. Daran anschließend wurden zwei weitere Proben nach Stress gewonnen (post1, post2).

unterzogen (Abb. 24). In jedem Dialysat wurde bei ausreichender Probenmenge Noradrenalin (HAB n = 8, LAB n = 8), Dopamin (HAB n = 8, LAB n = 8), Taurin (HAB n = 8, LAB n = 8), Glutamat (HAB n = 8, LAB n = 7), GABA (HAB n = 8, LAB n = 6) sowie Aspartat (HAB n = 8, LAB n = 7) bestimmt (technische Durchführung der Transmitterbestimmung durch S. Sartori und N. Singewald, Universität Innsbruck, wie beschrieben in Singewald et al., (1995; 1999)). Die histologische Verifizierung der Sondenlokalisation wurde *post mortem* per Kresylviolett färbung durchgeführt.

Ergebnisse

Der Gehalt der untersuchten Neurotransmitter in den basalen Mikrodialyse-Proben zeigte zwischen der HAB- und LAB-Linie keine Unterschiede (Mittelwert der jeweils basalen Proben). Daher wurden alle weiteren Werte zur besseren Vergleichbarkeit zum Mittelwert der Basalproben in Relation gesetzt (Abb. 25). In der Untersuchung der Veränderung des Dialysatgehalts über die Zeit wurde ersichtlich, dass auf Grund der EPF-Exposition nur Noradrenalin ($p < 0,05$) und Dopamin (HAB $p < 0,01$; LAB $p < 0,05$) in beiden Linien und Taurin ($p < 0,05$) in der LAB-Linie beeinflusst wurden. Hingegen hatte die FS-Exposition Auswirkungen auf den Probengehalt von Dopamin ($p < 0,01$), Glutamat ($p < 0,05$), Aspartat ($p < 0,05$) und Taurin ($p < 0,01$) in beiden Linien sowie Noradrenalin ($p < 0,05$) in LABs und GABA ($p < 0,01$) in HABs. Die EPF-Exposition hatte unter Betrachtung der einzelnen Messpunkte keinen unterschiedlichen Einfluss auf die Ausschüttung eines Neurotransmitters zwischen beiden Linien.

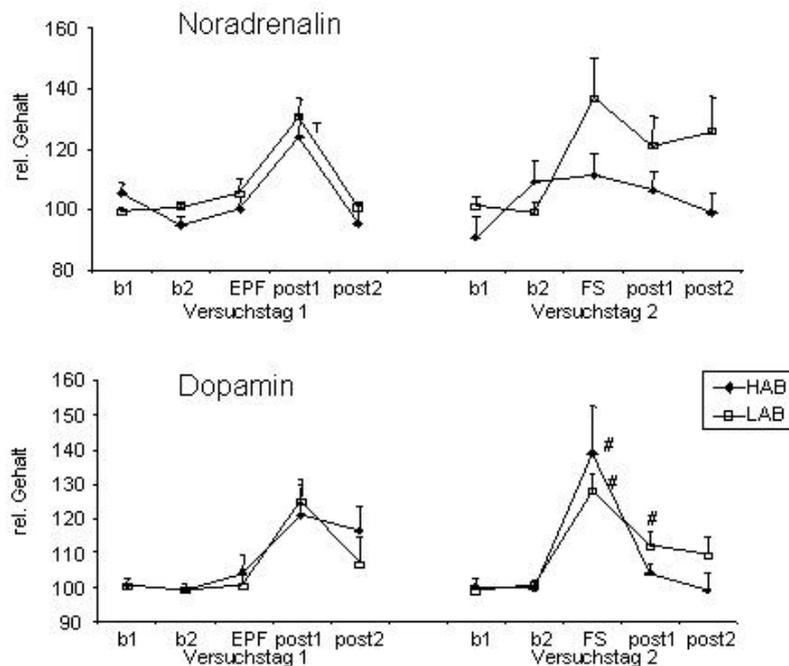


Abbildung 25. Zeitlicher Verlauf der Neurotransmitterausschüttung im PVN von HABs und LABs vor, während und nach Stressorexposition (entsprechend Zeitplan Abb. 24). Alle Werte wurden relativ zum Mittel der jeweiligen Basalproben angegeben (Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. LAB; # $p < 0,05$, T $p < 0,1$ vs. basales Mittel).

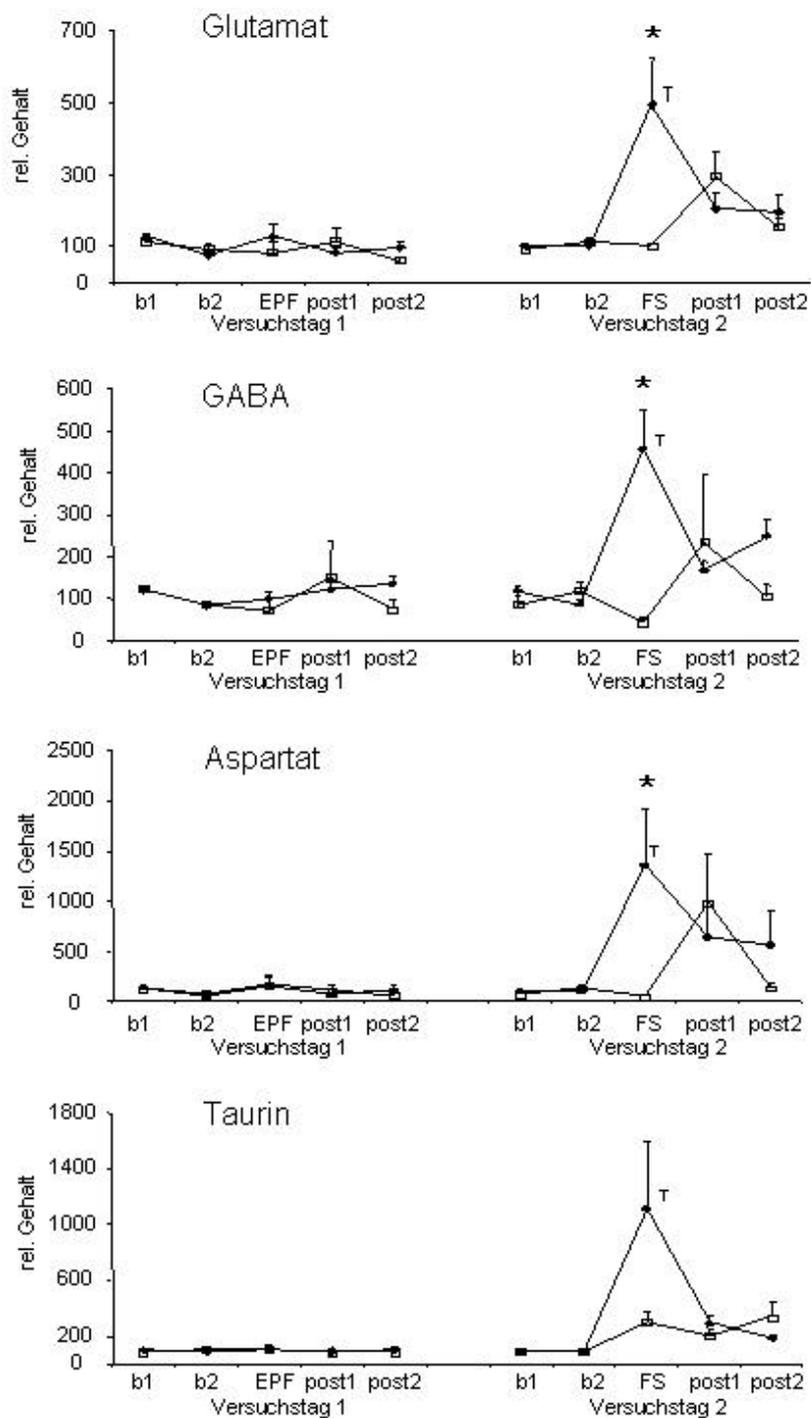


Abbildung 25 Fortsetzung.

Auch bei der FS-Exposition fanden sich keine Unterschiede zwischen HABs und LABs in der Noradrenalin-, Dopamin- und Taurin-Ausschüttung. Letztere sezernierten jedoch mehr Glutamat, GABA und Aspartat als HABs. Während die tendenzielle Erhöhung der Neurotransmitter relativ zum

Mittel der Basalproben in Reaktion auf den EPF-Test in jenem Dialysat zu finden war, das unmittelbar nach der Exposition entnommen worden war, führte FS in HAB-Tieren zu einem akuten Anstieg der Neurotransmitter und bei LAB-Tieren zu einem Trend erhöhter Ausschüttung – ähnlich der EPF-Exposition – in den Proben unmittelbar nach der Stressorexposition.

Diskussion

In vorliegender Studie zeigten sich zwischen HAB- und LAB-Ratten in den untersuchten inhibitorischen sowie exzitatorischen Neurotransmittern basal keine Unterschiede (Abb. 25). Auch gab es keine Linienunterschiede auf Grund der mild stressvollen EPF-Exposition, die *per se* keinen signifikanten Anstieg der gemessenen Transmitter nach sich zog. In Reaktion auf den physisch wie psychisch stark fordernden FS-Stress war jedoch eine zumindest tendenziell vermehrte Ausschüttung der Transmitter, mit Ausnahme von Noradrenalin, in HAB-Ratten zu messen. In LABs war lediglich der Dopamin-Anstieg signifikant. Der unterschiedliche Gehalt von Glutamat, GABA, Aspartat und Taurin im Stressdialysat zwischen HABs und LABs wurde dabei vor allem durch einen schnelleren Anstieg der Freisetzung in HAB- als in LAB-Tieren hervorgerufen, da die maximale Neurotransmitterausschüttung, mit Ausnahme von Taurin, annähernd vergleichbar war.

Wie schon für Serotonin berichtet (Umriukhin et al., 2002), unterschieden sich die Linien nicht im basalen Neurotransmittergehalt der Dialysate. Somit ist zu vermuten, dass die sezernierte Menge der beschriebenen Neurotransmitter basal keinen divergenten Einfluss auf die Regulation der AVP-Überexpression bzw. die bereits basal erhöhte AVP-Ausschüttung in HABs hatte. Dennoch könnten diese Transmitter durch eine zwischen den Linien unterschiedliche Rezeptordichte oder *second messenger*-Kaskade indirekt auf die Regulation von AVP im PVN einwirken. Ein vergleichbarer Transmittergehalt der basalen Dialysate war an Versuchstag 1 wie 2 zu messen, so dass die EPF-Exposition keine liniendivergente Veränderung der Transmitterausschüttung hervorgerufen hatte.

Studien von Itoi et al. (1999) haben gezeigt, dass die Applikation von Noradrenalin in den PVN eine ausgeprägte Aktivierung der HPA-Achse zur Folge hatte. Außerdem fanden die Autoren, dass eine derartige Behandlung eine differenzierte Aktivierung des CRH- und AVP-Systems nach sich zog. So wurde der Gehalt an CRH hnRNA in kurzer Zeit stark erhöht, während lediglich ein Trend zu vermehrter AVP hnRNA nach 120 min festzustellen war. In Erweiterung dieser Experimente wurde gezeigt, dass die AVP-Expression auf Grund noradrenerger Einflüsse stark CORT-abhängig ist. Jene ist in adrenaletomierten Tieren, nicht aber in scheinoperierten Ratten, stark erhöht. Dies deutete auf einen gegenregulierenden Mechanismus durch CORT hin, der die noradrenalinbasierte AVP-Expression unterdrückte (Helmreich et al., 2001). In HAB- wie auch LAB-Ratten fand sich ein Trend zu erhöhter noradrenerger Aktivität im PVN auf Grund beider Stressoren, die aber zwischen den Linien nicht unterschiedlich war. Dies steht in folgerichtigem Zusammenhang mit einer erhöhten HPA-Achsen-Aktivität in beiden Linien bei EPF- bzw. FS-Exposition, erklärt aber nicht die zwischen den Linien gefundene unterschiedliche Sekretion von CORT und ACTH (Landgraf

et al., 1999). Der Zusammenhang von Noradrenalin im PVN und dessen Einfluss auf die HPA-Achse in den Zuchtlinien sowie die noradrenalinbasierte AVP-Expression wäre in weiteren Untersuchungen zu studieren.

Die Untersuchungen zur dopaminergen Aktivität im PVN haben sich bisher vor allem auf dessen Einfluss auf das Sexualverhalten konzentriert (Bitner et al., 2006). Die in dieser Studie erhobenen Daten weisen auf einen deutlichen Zusammenhang zwischen sowohl mildem als auch physischem Stress und der dopaminergen Neurotransmission im PVN hin. Somit verdient auch das dopaminerge System weitere Beachtung in der Stressforschung. Dessen Interaktionen mit AVP und CRH sowie die Einflüsse von Dopamin innerhalb des PVN auf die HPA-Achsen-Aktivität bleiben zu zeigen.

Injiziert in den PVN wurde für den Glutamat- wie auch für den Aspartat-Rezeptoragonist N-methyl-D-aspartat (NMDA) gezeigt, dass er stark exzitatorische Wirkung auf die HPA-Achse hat (Zelena et al., 2005). Dieser Effekt wurde dabei mehr dem CRH- als dem vasopressinergen System zugeschrieben, da sich dies auch in AVP-defizitären Brattleboro-Ratten hervorrufen ließ. Dass der NMDA-Rezeptor bei chronischem Stress reduziert exprimiert wird, wurde als unterstützend für die Hypothese diskutiert, dass Glutamat einen starken Einfluss auf den PVN sowohl bei akutem als auch bei chronischem Stress hat (Ziegler et al., 2005). Auch zeigten diese Studien, dass das glutamaterge System zur Stressadaptation beiträgt, bei Fehlregulation aber zu einer pathologischen HPA-Achsen-Aktivität. Eine derartige Dysregulation könnte durch die stärkere und sehr rasche Aktivierung des glutamatergen Systems in HABs gegenüber LABs reflektiert werden und wäre somit ein weiteres Indiz für die erhöhte Vulnerabilität der HAB-Tiere.

Die GABAergen Interneuronen vermitteln die indirekte Innervation des PVN durch funktionell übergeordnete Gehirngebiete wie Hippocampus, Septum, Amygdala und präfrontaler Cortex (Bali und Kovacs, 2003). Durch Studien mit dem GABA-Rezeptor-Agonisten Muscimol wurde die inhibitorische Funktion von GABA auf die HPA-Achsen-Aktivität gezeigt (Herman et al., 2005). Auch wurde über deren Funktion in der Kontrolle pulsatiler Hormonsekretion, in der Anpassungen der Stressreaktion an physiologische Gegebenheiten sowie in der negativen Rückkopplung durch CORT spekuliert (Bali und Kovacs, 2003). Abgekoppelt von limbischen Innervationen konnte gezeigt werden, dass die GABAergen Interneuronen einen tonisch inhibierenden Einfluss vor allem auf die CRH- und AVP-Expression in parvozellulären Zellen haben. *In vivo* wurde eine GABA-basierte Inhibition vor allem in den Strukturen des peri-PVN gefunden, die wiederum die parvozelluläre AVP-Expression im PVN, weniger die CRH-Expression, reguliert (Bali und Kovacs, 2003). Neuere Untersuchungen sehen insbesondere im GABA_A-Rezeptorsubtyp einen Ansatzpunkt für die nächste Generation von Psychopharmaka für Angst und Depression. Der molekulare Mechanismus und dessen Wirkungsweise sind jedoch noch weitgehend ungeklärt (Cryan und Kaupmann, 2005). Die verstärkte, im PVN inhibitorisch wirkende GABA-Sekretion auf Grund von FS könnte die exzitatorische Glutamatpräsenz ausgleichen. Da die Mikrodialysesonde jedoch auf Grund ihrer Größe auch peri-PVN-Bereiche erfasste, könnte der gemessene GABA-Gehalt auch indirekt exzitatorische Aktivität reflektieren. So wäre eine regional stärker differenzierte Betrachtung

der GABA-Aktivität im PVN notwendig, um exakte Rückschlüsse auf die AVP-Expression bzw. das Verhalten und die HPA-Achsen-Aktivität von HAB- und LAB-Ratten zu erlauben. Dass sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Transmitter in HAB-Ratten verstärkt sezerniert wurden, könnte auch auf eine Dysregulierung übergeordneter, stressverarbeitender Gehirnareale – wie der Amygdala, des Hippocampus, des Septums –, die zum PVN projizieren, hinweisen.

Taurin ist eine der häufigsten Aminosäuren im Gehirn. Ein modulatorischer Effekt von Taurin wurde u.a. für den Metabolismus von GABA und Serotonin gezeigt (Kong et al., 2006). In Verhaltensstudien erwies sich die akute und chronische orale Applikation von Taurin auf der EPM anxiolytisch, nicht aber sedativ (Chen et al., 2004; Kong et al., 2006). Weitere Studien zum Effekt von Taurin auf die HPA-Achsen-Aktivität liegen bisher nicht vor. In Untersuchungen am SON konnten Engelmann und Ludwig (2004) zeigen, dass Taurin bei FS-Stress eine supprimierende Wirkung auf die AVP-Ausschüttung aufweist. Die vermehrte Taurin-Sekretion im PVN von HABS bei FS könnte die AVP-Ausschüttung im PVN reduzieren und damit den von Wotjak et al. (1996) postulierten inhibitorischen Tonus von AVP innerhalb des PVN auf die HPA-Achse reduzieren.

Die Untersuchung der klassischen Neurotransmitter im PVN zeigte, dass Noradrenalin, Dopamin und Serotonin keinen direkten Einfluss auf die unterschiedliche Verhaltens- sowie HPA-Achsen-Reaktivität von HABS und LABs hatten, weder basal noch bei Stress. Vielmehr erscheinen Glutamat, GABA, Aspartat und insbesondere Taurin als Modulatoren der unterschiedlichen Stressreaktivität der beiden Linien ausschlaggebend. Der Zusammenhang von extrinsischen Faktoren – wie Neurotransmitter und -modulatoren – und intrinsischen Faktoren – wie CBF-A – mit der Ausprägung der AVP-Expression, der Verhaltensextreme und der HPA-Achsen-Aktivität von HABS und LABs, anknüpfend an die oder unabhängig von der Mutation im AVP-Gen, bleibt weiter zu studieren.

B. Manipulation des AVP-Systems in HAB-, LAB- und NAB-Ratten

1. Effekte der Manipulation des AVP-Systems im Septum auf das soziale Gedächtnis von HAB-, NAB- und LAB-Ratten

1. 1. Suppression des septalen AVP-Systems via *antisense*-Behandlung des BNST von HAB- und LAB-Ratten: Kognition und Angstverhalten

Im ersten Projekt dieser Arbeit wurde gezeigt, dass HAB-Ratten gegenüber LAB-Ratten eine deutlich verbesserte soziale Gedächtnisfähigkeit aufweisen. Die im sozialen Gedächtnis grundlegende Funktion von AVP wurde, wie beschrieben, an einer Vielzahl von Studien gezeigt (Winslow und Insel, 2004). So war nun von Interesse, die grundlegende Abhängigkeit der verbesserten Gedächtnisleistung vom vasopressinergen System auch in HAB-Ratten in Zusammenhang mit dessen Hyperaktivität zu zeigen. Um dies näher zu untersuchen, sollte das soziale Gedächtnis beider Zuchtlinien nach selektiver Unterdrückung der Funktion von AVP im lateralen Septum erneut getestet werden.

Um die Expression eines Peptids auf genetischer Ebene einerseits in einem eingeschränkten zeitlichen Rahmen des Effekts, der andererseits präzise auf bestimmte Gehirnareale begrenzt ist, zu unterdrücken, bietet sich die Applikation von kurzen, einsträngigen ODN (18-25 Basenpaare) an, die einem Bereich der gewählten Peptid-mRNA komplementär sind (Landgraf, 1996; Ogawa und Pfaff, 1996). Diese *antisense*-ODN (AS) reduzieren intrazellulär die Peptidexpression, indem sie die Translation sterisch oder konformatorisch behindern. So kommt es zur Anlagerung an die mRNA und einer damit verbundenen Inhibition der Translation, zur Formation von RNA/DNA-Hybriden, die durch RNAsen degradiert werden, oder auch zu einem Translationsarrest, der durch eine sterische Blockade von notwendigen Enzymen erreicht wird (Landgraf et al., 1997; Crooke, 2004). Damit wird die Synthese eines bestimmten Proteins gehemmt, ohne die Genexpression anderer Gene oder die Gensequenz selbst zu verändern.

Zur Etablierung einer für HAB/LAB-Ratten adäquaten AS-Sequenz wurden zwei dem AVP-Gen komplementäre ODN *in silico* entwickelt, die keine Homologien mit anderen Genen der „GenBank database“ aufwiesen (Biognostik, Göttingen, Deutschland). Diese waren zur Stabilisierung gegen intrazellulären Abbau, Reduzierung der Toxizität und Verbesserung der Transfektion mit Phosphorothioat modifiziert. Dieser Einbau von Schwefel in das DNA-Rückgrat erhöht die Halbwertszeit der AS auf über 48 h im Serum (Antisense & ISH Catalog 2006; Biognostik, Göttingen, Deutschland). Laut weiterer Angaben von Biognostik erreicht die zelluläre Aufnahme 10 h nach Injektion ein Optimum. Fluorescein-markierte AS (FITC AS) konnte intrazellulär 4 bis 24 h nach Applikation mittels Fluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen werden.

In einem Vorversuch ermittelten Wigger et al. (unveröffentlicht) *in vivo* die Wirksamkeit der oben beschriebenen AS bei subchronischer bilateraler ODN-Applikation in den PVN per Glasfaserkanüle. Als Kontrollsubstanzen von Wirkung und Zytotoxizität dienten funktionslose ODN-Sequenzen mit basengleicher, aber randomisierter Nukleotidzusammensetzung (*missense*, MS) sowie reine Applikationslösung (Biognostik, Göttingen, Deutschland). Mittels Mikrodialyse des PVN konnte eine supprimierte Ausschüttung von AVP in HAB-Ratten auf Grund der mehrfachen Applikation der in den folgenden Versuchen angewandten AS gezeigt werden. Im Vergleich zu den Kontrollsubstanzen war kein Effekt für die alternative ODN zu erkennen.

Im lateralen Septum freigesetztes AVP wird in den Somata des BNST exprimiert (De Vries und Buijs, 1983). Um die septale Sekretion von AVP selektiv durch die Reduzierung der vasopressinergen Projektion zu vermindern, sollte daher die entsprechende AS subchronisch, bilateral in den BNST injiziert werden.

Da Studien gezeigt haben, dass septales AVP auch Einfluss auf das Angstverhalten hat (Landgraf et al., 1995; Menard und Treit, 1996) und die Bindungskapazität des septalen V1aR in HABs erhöht ist (Keck et al., 2003; Wigger et al., 2004), sollten nach AS-Behandlung außerdem Angstparameter auf der EPM erhoben werden.

Die zelluläre Lokalisation der AS sollte per FITC AS untersucht werden.

Versuchsplan

Unmittelbar nach Implantation der Führungskanüle wurde mit der Applikation der Substanzen am noch narkotisierten Tier begonnen. Pro Injektionsseite wurde 1 µl Substanz in den BNST appliziert (1 nmol AS, n = 6; 1 nmol MS, n = 7; Vehikel, n = 6). Im Folgenden wurden die Tiere abends und morgens über 2 Tage hinweg behandelt (Abb. 26). An Tag 3 wurden 1 h nach einer weiteren abendlichen Applikation die Auswirkungen der jeweiligen Substanz auf das soziale Gedächtnis der Tiere mit Hilfe des SDis-Tests studiert.

Antisense-Applikation in den BNST

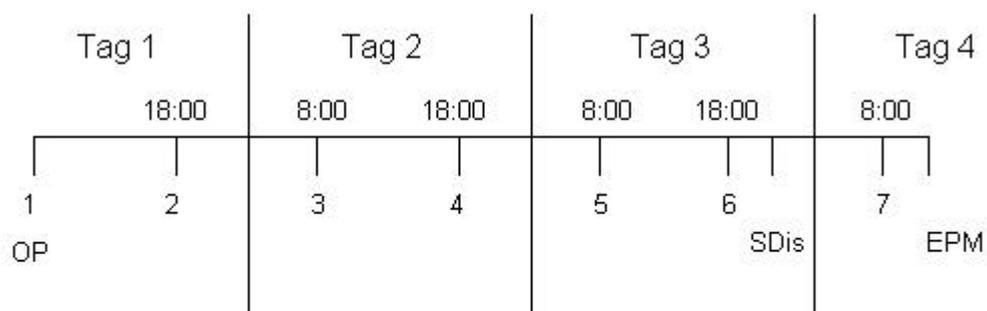


Abbildung 26. Zeitplan der Applikation von AVP *antisense*-Oligodeoxynucleotid (ODN)-Sequenzen, *missense* ODN oder Vehikel in den *bed nucleus* der *stria terminalis*. HABs und LABs wurden beginnend direkt nach der Implantation einer Führungskanüle (OP) täglich abends (18:00 Uhr) und morgens (8:00 Uhr) behandelt. Eine Stunde nach der abendlichen Applikation an Tag 3 wurde der *social discrimination* (SDis)-Test durchgeführt. Tags darauf nach der morgendlichen Applikation wurden die Tiere der *elevated plusmaze* (EPM) exponiert.

An Tag 4 wurden HABs und LABs 1 h nach der 7. Injektion der EPM exponiert.

Die histologische Verifizierung erfolgte mit Kresylviolett färbung.

Zur Identifizierung der zellulären Lokalisation der ODN wurde der BNST von zwei Tieren bilateral mit 1 µl FITC AS (1 nmol; Biognostik, Göttingen, Deutschland) behandelt. Diese wurde per Fluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen.

Ergebnisse

Die Injektion von AS in den BNST löscht die Kapazität zur kurzzeitigen Wiedererkennung von bereits explorierten Jungtieren sowohl in HABs als auch LABs gänzlich aus (Ab. 27). Eine innerhalb und zwischen den Gruppen nicht unterschiedliche Erstexplorationszeit zeigte, dass der explorative Antrieb durch die AS-Behandlung nicht beeinträchtigt war. Weder MS noch Vehikel hatten einen Einfluss auf die Gedächtnisbildung im sozialen Kontext, da sowohl HABs als auch LABs das erstexponierte Jungtier nach 10 min stets wiedererkennen konnten.

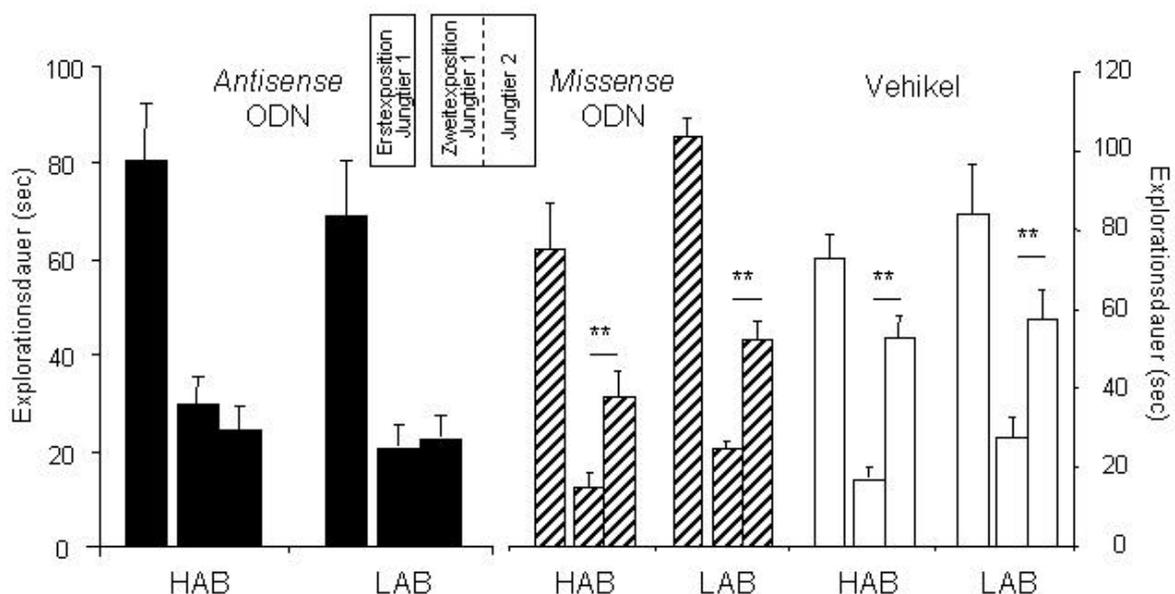


Abbildung 27. *Social discrimination*-Test an AVP *antisense*- bzw. kontrollbehandelten HAB- und LAB-Ratten.

Kognitive Fähigkeit adulter HABs und LABs, ein bereits für 4 min exploriertes Jungtier 1 von einem unbekanntem Jungtier 2 in der Zweitexposition nach einem Interexpositionsintervallen von 10 min zu unterscheiden. HABs und LABs wurden zuvor über drei Tage hinweg (entsprechend Zeitplan Abb. 26) AVP *antisense*-Oligodeoxynucleotid (ODN)-Sequenzen, *missense* ODN oder Vehikel in den *bed nucleus der stria terminalis* appliziert (Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$).

Das Angstverhalten auf der EPM war in AS-behandelten HAB-Ratten gegenüber den kontrollbehandelten Tieren tendenziell vermindert. Kein Effekt zeigte sich dagegen in LABs (Abb. 28). Keine der applizierten Substanzen hatte einen Einfluss auf die Lokomotion der Tiere auf der EPM.

Die Untersuchung der Injektionsstelle und der Verteilung der FITC AS zeigte, dass die Substanz sich diskret im Kerngebiet verteilt hatte (Abb. 29). In höherer Auflösung wurde sichtbar, dass die AS sich in den Zellkörpern des Kerngebiets akkumuliert hatte.

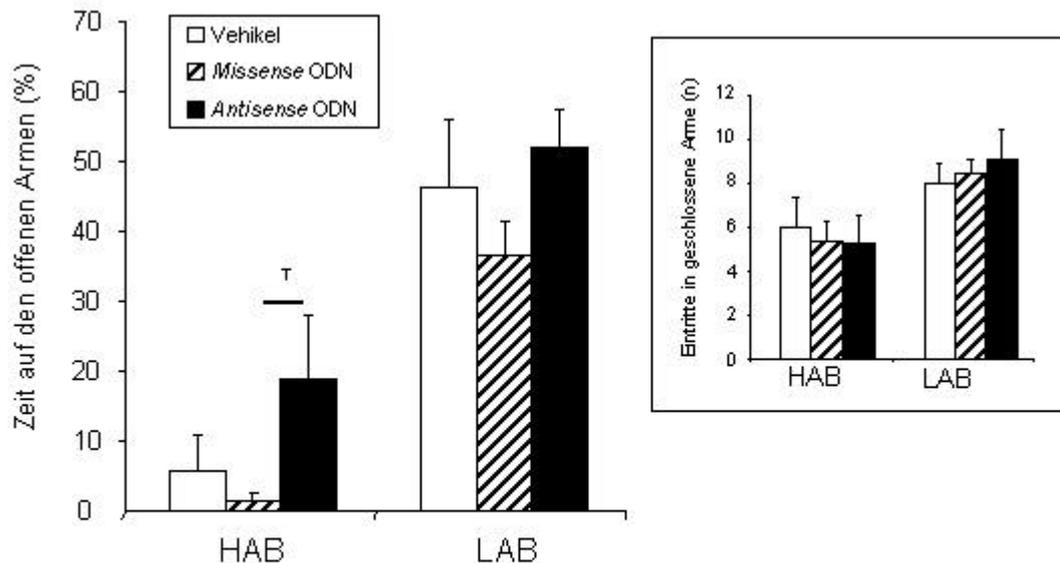


Abbildung 28. *Elevated plusmaze*-Test an AVP *antisense*- bzw. kontrollbehandelten HAB- und LAB-Ratten.

HABs und LABs wurden vor der Erfassung von Angstverhalten und Lokomotion über drei Tage hinweg (entsprechend Zeitplan Abb. 26) AVP *antisense*-Oligodeoxynucleotid (ODN)-Sequenzen, *missense* ODN oder Vehikel in den *bed nucleus* der *stria terminalis* appliziert (Mittelwerte \pm SEM; † $p < 0,1$).

Diskussion

In vorliegender Studie konnte gezeigt werden, dass das septale AVP-System grundlegend für die zuvor beschriebene verbesserte Gedächtnisleistung von HABs im sozialen Kontext ist (Abb. 27). Dieses konnte durch AS-Behandlung ebenso supprimiert werden wie jenes von LABs. Außerdem wurde in hyperängstlichen HABs ein tendenzieller anxiolytischer Effekt auf Grund der Manipulation von AVP im Septum nachgewiesen (Abb. 28). Die Verwendung von AS erwies sich als verhaltensrelevantes und effektives Werkzeug zur selektiven Suppression eines neuropeptidergen Systems.

Nach Expression in den Somata des BNST wird AVP über vasopressinerge Projektionen zu den freisetzenden Synapsen im lateralen Septum transportiert (De Vries und Buijs, 1983). Für die Behandlung mit AS wurden zwei mögliche Wirkmechanismen berichtet (Neumann, 1997). Einerseits wurden kurzzeitige Effekte gezeigt, die zu einer verringerten neuronalen Erregbarkeit führten (Neumann et al., 1995). Zum anderen wurde für die physiologischen Veränderungen eine Suppression der Translation und der damit verbundenen Peptidverfügbarkeit postuliert (Neumann, 1997). Zur Verminderung bzw. Erschöpfung des in den Synapsen verfügbaren AVP sollte daher eine Suppression

des Translationssystems im BNST durch subchronische Behandlung mit AS dienen. Eine effektive Depletion von AVP lässt sich einerseits auf Grund der reduzierten AVP-Sekretion bei Mikrodialyse in den Vorstudien vermuten (Wigger et al., unveröffentlicht). Andererseits lässt die verhaltensbiologische Wirkung in vorliegender Studie diesen Schluss zu. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten Resultaten um eine akute Suppression der AVP-Sekretion durch die unmittelbar vorhergehende AS-Applikation handelte.

Die Funktion von septalem AVP in der sozialen Kognition wurde in verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Techniken dargestellt (Insel und Fernald, 2004). So wirkte AVP, zentral oder peripher verabreicht, sowie die AVP-Sekretion aktivierende elektrische oder osmotische Stimulation von SON und PVN verstärkend auf das Gedächtnis. AVP-Antagonisten und anti-AVP-Serum hingegen führten zu dessen Suppression (Bielsky und Young, 2004). Dass eine Manipulation des AVP-Systems sowohl in HABs als auch in LABs zu einer gänzlichen Unfähigkeit zur Wiedererkennung des bekannten Jungtiers führte, zeigte, dass auch die stark verbesserte kognitive Kapazität von HABs grundlegend auf diesem System beruht. Ob diese jedoch auf der Mutation des AVP-Gens und einer damit möglicherweise verbundenen AVP-Überexpression im BNST basierte oder auf einer linienspezifisch divergenten Innervation des Kerngebiets, bleibt zu zeigen.

Dass keine der verabreichten Substanzen einen Einfluss auf das Explorationsverhalten der Tiere hatte und damit ein tatsächlicher Effekt im Angstverhalten beobachtet wurde, zeigte eine vergleichbare Dauer in der Erstexploration. Auch die intrazelluläre Lokalisation der AS als Voraussetzung für die Beeinträchtigung der AVP-Expression konnte auf Grund der zellulären Akkumulation der FITC-markierten AS angenommen werden (Abb. 29).

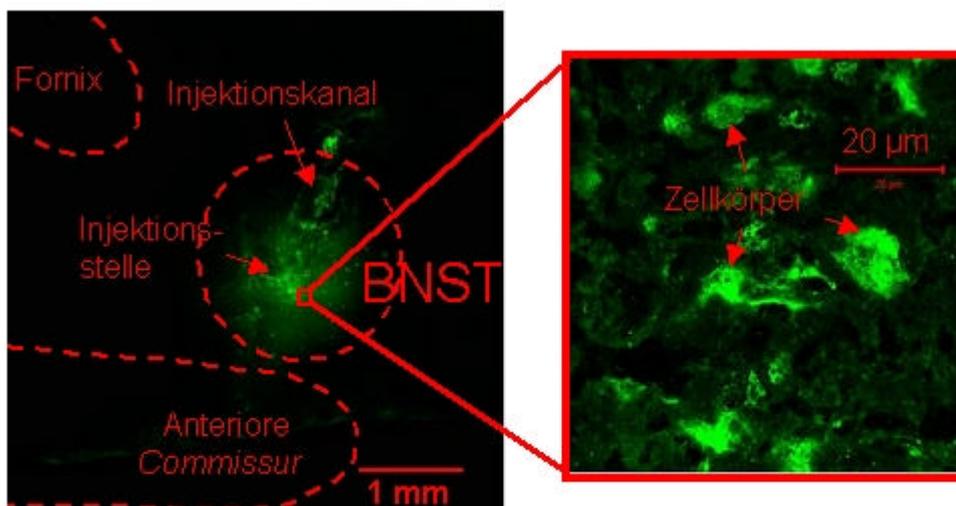


Abbildung 29. Via Fluoreszenzmikroskopie untersuchte Injektionsstelle und die Verteilung der Fluorescein-markierten AVP *antisense* Oligodeoxynucleotid-Sequenzen (grün) im *bed nucleus* der *stria terminalis* (BNST). In Vergrößerung konnte die Akkumulation der *antisense*-Sequenzen in den Zellkörpern gezeigt werden.

Neben den vasopressinergen Projektionen des BNST (De Vries und Buijs, 1983) wird das laterale Septum von der medialen Amygdala vasopressinerg innerviert (Caffe et al., 1987). Die Ergebnisse vorliegender Studie zeigen, dass schon alleine die Unterdrückung des AVP-Systems des BNST für eine vollkommene Extinktion des sozialen Kurzzeitgedächtnisses hinreichend ist. Ähnliches konnte für das oxytozinerge System in der medialen Amygdala an *knockout*-Tieren gezeigt werden (Ferguson et al., 2001). Die eventuell modulierende oder auch verstärkende Rolle des vasopressinergen Systems der medialen Amygdala bleibt noch zu zeigen. Dies ist besonders in Zusammenhang mit den Daten der SD-Studie zu beachten (Projekt A 2, Tabelle 2). Die mediale Amygdala wies hier den stärksten Unterschied zwischen HAB- und LAB-Ratten in der neuronalen Aktivität nach sozialer Unterwerfung auf. Diese stärkere Aktivierung könnte ein Korrelat für die Interaktion von olfaktorischer Chemosensorik (Coolen und Wood, 1998), Angstverhalten (Ebner et al., 2004) und (Dys-)Funktion des sozialen Gedächtnisses darstellen (Projekt A 1, Abb. 15).

Neben der grundlegenden Funktion in der sozialen Kognition wurde für das septale AVP-System auch eine Rolle im Angstverhalten gezeigt. Die reduzierte V1aR-Dichte auf Grund von AS-Behandlung wirkte ebenso anxiolytisch wie Läsionen im Septum (Landgraf et al., 1995; Menard und Treit, 1996). Des Weiteren konnten Liebsch et al. (1996) durch die Applikation eines V1R-Antagonisten in Wistar-Ratten deren auf den OA der EPM verbrachte %Zeit erhöhen. In einer jüngsten Studie mit einem selektiven V1bR-Antagonisten war jedoch kein Effekt auf das Angstverhalten festzustellen (Stemmelin et al., 2005), was auf eine überwiegende Funktionalität des septalen V1aR im Angstverhalten hinweist. Auch keine Wirkung zeigte die Applikation von synthetischem AVP mittels reverser Mikrodialyse auf das Angstverhalten (Liebsch et al., 1996). Dies reflektiert die Ineffektivität der AVP AS in LABs (Abb. 28). Wie von Liebsch et al. (1996) diskutiert, könnte die Wirksamkeit von einer septalen AVP-Applikation auf das Angstverhalten innerhalb eines geringen Spielraums liegen. In HABs ist die Bindungskapazität des V1R im Septum erhöht (Keck et al., 2003; Wigger et al., 2004). Somit könnte in diesen Tieren im Gegensatz zu LABs die Reduzierung des verfügbaren AVP auf Grund der höheren Sensitivität eine Veränderung des Angstverhaltens bedingen. Dass der leicht anxiolytische Effekt in HABs nicht auf einer Veränderung in der Lokomotion basierte, erwies sich in der vergleichbaren Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme der EPM (Abb. 28).

Die grundlegende Funktion des septalen AVP-Systems in der sozialen Kognition wurde durch vorliegende Experimente unterstrichen, ebenso wie die Effektivität der AS-Applikation als Methode zur selektiven Manipulation eines neuropeptidergen Projektionssystems.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass in LAB-Ratten kein kausaler Zusammenhang zwischen Angstverhalten und sozialer Kognition besteht, da ersteres unverändert war, während letztere in AS-behandelten Tieren supprimiert war. In HABs hingegen, als Tiermodell für psychopathologische Erkrankungen, zeigte sich gleichzeitig zur supprimierten Kognition im sozialen Kontext ein anxiolytischer Effekt auf der EPM. Die Interaktion bzw. Unabhängigkeit dieser beiden – auch in Psychopathologien beobachteten Phänomene (Grady und Keightley, 2002) – bleibt zu zeigen.

1. 2. Überexpression von V1a-Rezeptoren im Septum von NAB-Ratten: eine *social discrimination*-Studie

Das Spektrum der molekulargenetischen Methoden zur selektiven Veränderung der Expression eines Gens – ubiquitär oder punktuell, akut oder chronisch – ist vielfältig (Gerlai, 1996). Um ein Gen sowohl zeitlich als auch räumlich selektiv zu überexprimieren, wurde in den letzten Jahren die Methode der Transfektion spezieller Vektoren per gentechnisch veränderter Viren etabliert (adeno-assoziierte virale Vektoren, AAV). Diese nicht-pathogenen Viren dienen als ‘Genfähren’, indem sie in Zellen eindringen, ihr genetisches Material transferieren und die Synthese „ihres“ Gens in den Zellen fördern (Vasquez et al., 2001). Diese Art der Transfektion erlaubt nicht nur die Manipulation von adulten Neuronen, sondern auch eine speziesübergreifende Manipulation der Genexpression (Lightman et al., 2002).

Pitkow et al. (2001) haben einen V1aR-exprimierenden AAV für Wühlmäuse etabliert. Monogame Präriewühlmäuse weisen eine höhere V1aR-Dichte im ventralen Pallidum auf als nicht-monogame *montane*-Wühlmaus. Durch die Verabreichung des V1aR AAV in das ventrale Pallidum von letzteren wurde die dortige Rezeptordichte erhöht und damit einhergehend monogames Paarbindungsverhalten induziert.

Dass das septale AVP-System eine zentrale Rolle in der Ausprägung von sozialem Gedächtnis hat, wurde unter anderem im vorhergehenden Projekt gezeigt, wie auch mehrfach beschrieben (Engelmann et al., 1996). Freigesetzt im lateralen Septum, bindet es dort an V1aR und V1bR und ist grundlegend an der Ausprägung des sozialen Gedächtnisses beteiligt. Dies konnte insbesondere in der Untersuchung von V1aR *knockout*-Mäusen gezeigt werden (Bielsky et al., 2004). Die Funktionalität des septalen AVP-Systems wurde bisher vor allem an Studien beschrieben, in denen die Funktion des Systems unterdrückt wurde. So zeigte die selektive Reduktion der septalen Rezeptor-Expression durch V1aR *antisense*-Applikation, dass die Versuchstiere die Fähigkeit zur Wiedererkennung im sozialen Kontext eingebüßt hatten (Landgraf et al., 1995). Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch die Applikation eines V1R-Antagonisten per osmotischer Minipumpe ins laterale Septum. Dadurch wurde das soziale, nicht aber das räumliche Gedächtnis, vermindert (Everts und Koolhaas, 1999).

Nun stellt sich die Frage, ob auch durch die Erhöhung der Rezeptor-Dichte eine Verbesserung der sozialen Gedächtnisfähigkeit erreicht werden kann. Dies sollte im Gegensatz zu beschriebenen *loss of function*-Ansätzen durch einen *gain of function*-Ansatz untersucht werden.

Sofern oben beschriebener Wühlmaus-V1aR AAV speziesunabhängig in Ratten exprimiert wird, sollte durch dessen Injektion in das laterale Septum ein Einfluss auf das soziale Gedächtnis der Versuchstiere festzustellen sein.

In einem Vorversuch wurde gezeigt, dass die unilaterale Applikation des V1aR AAV in Ratten zu einer einseitig und weitgehend auf das laterale Septum beschränkten erhöhten Bindung eines radioaktiv markierten V1aR-Antagonisten führte (Landgraf et al., 2003).

Als Kontrolle der Wirkung sollte dem V1aR AAV ein lacZ-exprimierender Vektor (lacZ AAV) gelten. Auf Grund der Daten zur Expression eines AAV in verschiedenen Studien wurde als optimale Inkubationszeit eine Dauer von 3 Wochen gewählt (Ideno et al., 2003; Tenenbaum et al., 2004).

Versuchsplan

V1aR- oder lacZ AAV-Lösung (bereitgestellt von L. Pitkow und L. Young, Emory Universität) wurde NABs (jeweils $n = 7$) per Glasfaserkanüle bilateral in das laterale Septum appliziert.

Drei Wochen nach AAV-Behandlung wurden die Tiere jeden zweiten Tag im SDis-Test auf Veränderungen ihres sozialen Gedächtnisses untersucht. Beginnend mit einem IEI von 30 min wurden im Weiteren IEIs von 60 min und 120 min verwandt. Aufbauend auf dem IEI von 2 h wurden die Tiere außerdem einer weitergehenden Serie von SDis-Tests unterzogen. So wurde das erstexponierte Jungtier des 2 h-IEI nochmals nach weiteren 24 h und weiteren 72 h zusammen mit einem jeweils neuen, unbekanntes Jungtier der Versuchsratte präsentiert.

Anschließend an diese erste Serie von Verhaltenstests wurden alle Tiere mit einer Mikrodialyse-Sonde im linken Septum versehen (V1aR AAV $n = 6$; lacZ AAV $n = 7$). In der Aufwachphase, unmittelbar nach der Operation, wurden drei 30-minütige Dialysate zur Kontrolle der maximal freizusetzenden AVP- und Oxytocin-Menge gesammelt.

Nach drei Tagen wurde per inverser Mikrodialyse über 30 min synthetisches AVP (Sigma, Taufkirchen, Deutschland; ca. 2 ng/30min; Engelmann et al., 1992) in das linke Septum appliziert. Dies wurde 5 min vor der Erstexposition eines neuen Jungtiers begonnen. Die Zweitexpositionen zusammen mit jeweils neuen Jungtieren erfolgten 2 h bzw. weitere 24 h bzw. weitere 72 h später.

Für eine dritte und vierte SDis-Testung wurden am nächsten Tag bzw. drei Tage später bei der Erstexposition eines neuen Jungtiers der spezifische V1R-Antagonist (d(CH₂)₅ Tyr (Me)AVP, *Manning compound*; bereitgestellt von M. Manning, Medical College von Ohio) bzw. ein selektiver Oxytocin-Rezeptorantagonist (desGly-NH₂, d(CH₂)₅ [Try (Me)₂, Thr 4] OVT; bereitgestellt von M. Manning, Medical College von Ohio) oder Vehikel in das linke laterale Septum per inverser Mikrodialyse appliziert (ca. 5 ng/30 min, Engelmann et al., 1992). Die Zweitexposition dieses und eines unbekanntes Jungtiers erfolgte mit einem IEI von 30 min.

Vier Tage später wurde die soziale Interaktion der Tiere studiert (durchgeführt von Wigger et al., entsprechend Henniger et al. (2000), Landgraf et al. (2003)). Die Tiere wurden anschließend, 7 Wochen nach AAV-Applikation, dekapitiert.

Ergebnisse

Die V1aR AAV-behandelten Tiere zeigten sowohl bei einem IEI von 30 min, 60 min als auch 120 min die Fähigkeit, ein bekanntes Jungtier wiederzuerkennen (Abb. 30). Selbst nach 24 h zeigte sich eine entsprechende Tendenz. Nach 72 h war keine Unterscheidung der Jungtiere mehr

festzustellen. LacZ AAV-behandelte Tiere zeigten lediglich nach 30 min eine starke Tendenz zur Wiedererkennung, waren dazu aber bei allen anderen IEs nicht in der Lage.

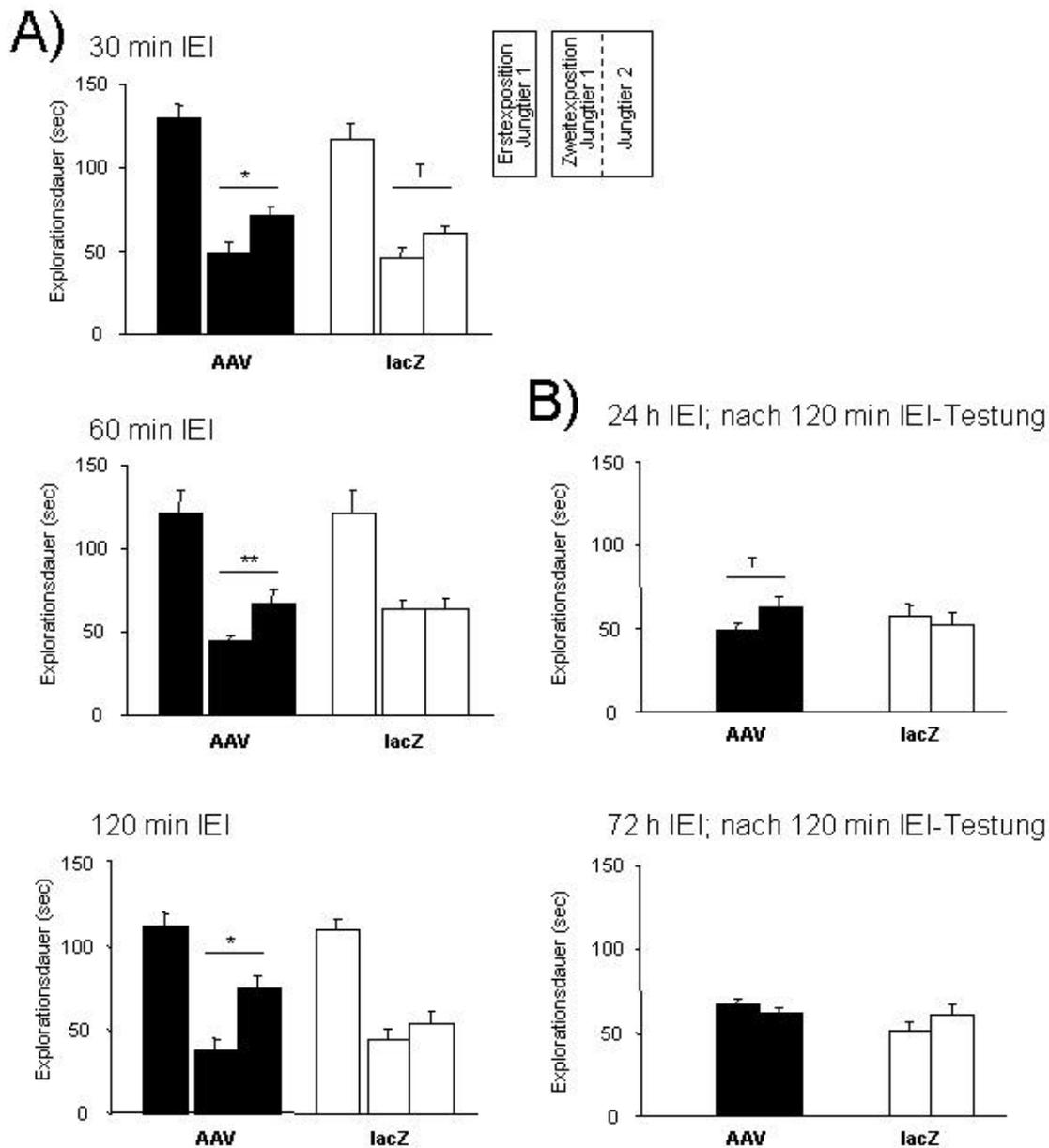


Abbildung 30. *Social discrimination*-Test an V1aR AAV- und lacZ AAV-behandelten Tieren. A) Kognitive Fähigkeit von V1aR AAV- und lacZ AAV-behandelten Ratten zur Wiedererkennung eines bereits für 4 min explorierten Jungtiers 1 in der Zweitexposition gegenüber einem unbekanntem Jungtier 2 bei Interexpositionsintervallen (IEL) von 30 min, 60 min und 120 min. B) Reexposition des beim 120 min-IEL exponierten Jungtiers 1 zur Exploration durch V1aR AAV- und lacZ AAV-behandelte Ratten zur Untersuchung der anhaltenden Kapazität zur Wiedererkennung nach 24 bzw. 72 Stunden gegenüber einem unbekanntem Jungtier 2 (Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, † $p < 0,1$).

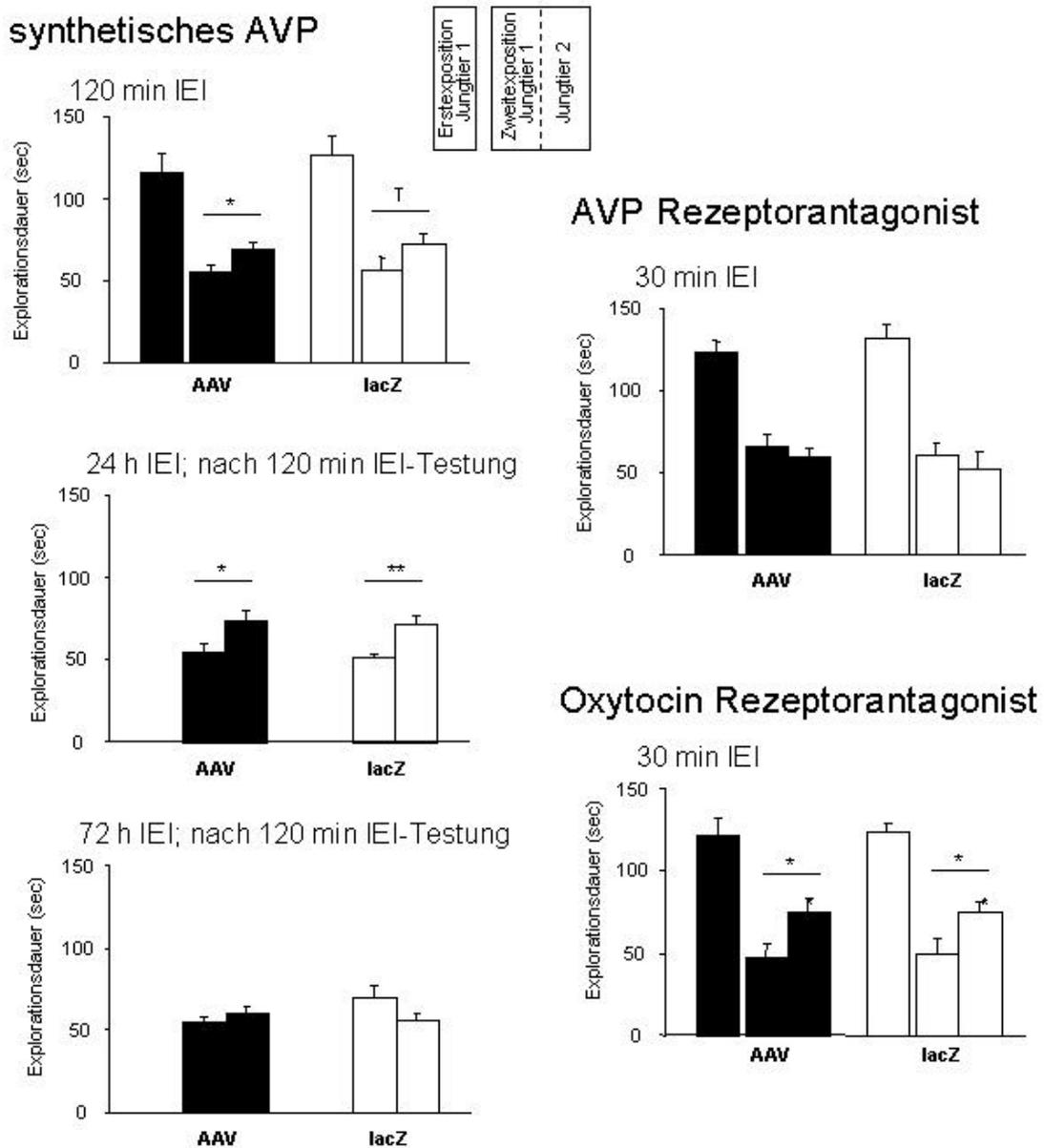


Abbildung 31. *Social discrimination*-Test an V1aR AAV- und lacZ AAV-behandelten Tieren nach Applikation von synthetischem AVP, V1R- oder Oxytocin-Rezeptor-Antagonisten per inverser Mikrodiyalse.

Kognitive Fähigkeit von V1aR AAV- und lacZ AAV-behandelten Ratten zur Wiedererkennung eines unter Applikation von synthetischem AVP bereits für 4 min explorierten Jungtiers 1 in der Zweitexposition gegenüber einem unbekanntem Jungtier 2 bei einem Interexpositionsintervall (IEL) von 120 min sowie bei wiederholter Reexposition des beim 120 min-IEL exponierten Jungtiers 1 nach 24 bzw. 72 Stunden gegenüber einem jeweils unbekanntem Jungtier 2.

Kognitive Fähigkeit von V1aR AAV- und lacZ AAV-behandelten Ratten zur Wiedererkennung eines unter Applikation von V1R- oder Oxytocin-Rezeptor-Antagonisten bereits für 4 min explorierten Jungtiers 1 in der Zweitexposition gegenüber einem unbekanntem Jungtier 2 bei einem Interexpositionsintervall (IEL) von 30 min (Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

Die Applikation von synthetischem AVP zeigte bei einem IEI von 2 h bei V1aR AAV-behandelten Ratten signifikante, bei lacZ AAV-behandelten tendenzielle Unterschiede (Abb. 31). Während beide Behandlungsgruppen nach 24 h zur Wiedererkennung des ersten Jungtiers in der Lage waren, war dies nach 72 h nicht mehr der Fall.

Während die Applikation des V1R-Antagonisten das soziale Gedächtnis unabhängig vom applizierten AAV bereits bei einem IEI von 30 min auslöschte, hatte der Oxytocin-Rezeptorantagonist darauf keinen Einfluss (Abb. 31).

Erstexplorationszeiten, indikativ für Ermüdungseffekte durch das wiederholte Testen, waren in allen Versuchen nicht unterschiedlich.

Die direkt in Anschluss an die Operation per Mikro dialyse gewonnenen Dialysate zeigten keine Unterschiede in der Ausschüttung von AVP und Oxytocin zwischen den Behandlungsgruppen (Abb. 32).

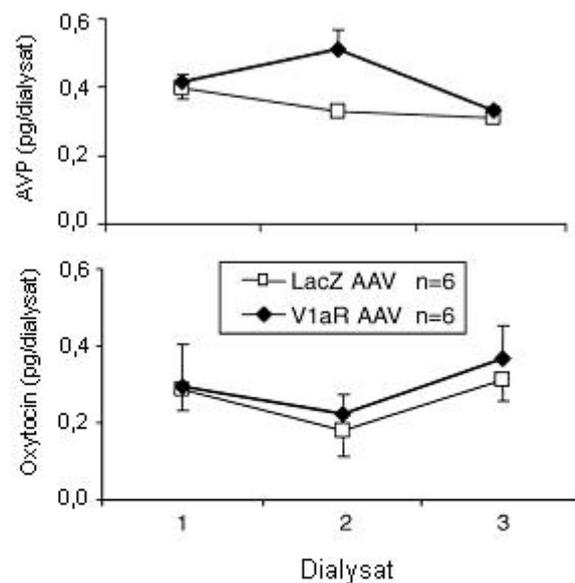


Abbildung 32. Mikro dialyse im lateralen Septum von V1aR AAV- und lacZ AAV-behandelten Ratten. Unmittelbar nach der Operation wurden drei 30-minütige Proben in den noch narkotisierten Tieren entnommen und auf ihren AVP- und Oxytocin-Gehalt hin untersucht (Mittelwerte \pm SEM).

Diskussion

Die Daten der vorliegenden Studie zeigen, dass das soziale Gedächtnis von Wistar-Ratten durch die selektive Erhöhung der Verfügbarkeit von V1aR im Septum deutlich verbessert werden konnte. So waren V1aR AAV-behandelte Ratten gegenüber Kontrolltieren zur Wiedererkennung von Jungtieren noch nach deutlich längeren Zeitintervallen in der Lage als lacZ AAV-behandelte (Abb.

30). Dieser Effekt kann eindeutig der V1aR-Überexpression zugeschrieben werden, da kein Unterschied in der basalen AVP- oder Oxytocin-Sekretion detektierbar war (Abb. 32). Des Weiteren konnte diese Fähigkeit in allen Tieren durch synthetisches AVP verbessert werden und durch einen V1aR-Antagonisten, nicht aber durch einen Oxytocin-Rezeptorantagonisten, selektiv supprimiert werden (Abb. 31). Insgesamt erwies sich der Wühlmaus-V1aR AAV somit nicht nur als spezieübergreifend effektiv und verhaltensrelevant, sondern auch als selektiv in septaler Lokalisation sowie resultierender Bindungskapazität für AVP.

Da die Gedächtnisleistung von NABs alleine durch die Behandlung mit V1aR AAV verbessert wurde, ließ dies vermuten, dass unter physiologischen Bedingungen nicht AVP, sondern der V1aR als limitierender Faktor fungieren könnte. Dass die AAV-Behandlung keine vermehrte AVP-Sekretion zur Folge hatte, erschließt sich aus den Ergebnissen der Mikrodialyse des lateralen Septums. Die Applikation von synthetischem AVP mittels reverser Mikrodialyse als Simulation einer physiologischen Freisetzung zeigte aber, dass auch das Neuropeptid selbst limitierend wirkte. Sowohl in V1aR AAV- als auch lacZAAV-behandelten Ratten verbesserte sich die Kognition gleichermaßen. Die Applikation von AVP bei der Erstexposition des Jungtiers ergab dabei, dass dieses bei der Informationsaufnahme eine verstärkende Wirkung hatte. Die verbesserte Gedächtnisleistung durch erhöhte V1aR-Dichte in verumbehandelten Ratten wie auch durch synthetisches AVP in kontrollbehandelten NABs weist auf eine im physiologischen Normbereich balancierte Interaktionshäufigkeit von Ligand und Rezeptor hin. Bei Überangebot eines Partners könnte diese auf Grund einer damit größeren Verteilungsdichte erhöht werden. Auch wäre die Existenz weiterer Mechanismen zur Förderung der kognitiven Leistung bei Überschuss des Liganden möglich. Die Beteiligung, aber nicht grundlegende Notwendigkeit des V1bR wurde an V1bR *knockout*-Tieren beschrieben. Diese zeigten eine reduzierte, aber nicht gänzlich supprimierte soziale Kognitionsleistung (Wersinger et al., 2002). Somit könnte vermehrte Verfügbarkeit von AVP die Kognition durch eine zusätzliche Aktivierung von V1bR verbessern oder auch durch für AVP weniger spezifische Rezeptoren, wie den Oxytocin-Rezeptor (Slusarz et al., 2006).

Der SDis-Test hat sich als sehr gut geeignet für die vielfach wiederholte Testung der Funktion des sozialen Gedächtnisses erwiesen. Es zeigten sich keinerlei Ermüdungs- oder Ausfallerscheinungen durch die invasive Manipulation – das Einsetzen der Mikrodialysesonde – wie schon zuvor von Versuchen an Brattleboro-Ratten berichtet (Engelmann und Landgraf, 1994). Auch die durch den V1aR-Antagonisten unterdrückte Gedächtnisleistung war nach 3 Tagen wiederhergestellt. Zusätzlich zeigte sich die hohe Selektivität des AAV durch die Ineffektivität eines Oxytocin-Rezeptorantagonisten in der Beeinflussung der Unterscheidungskapazität beider Behandlungsgruppen. Damit konnten alle beobachteten Veränderungen der Kognitionsleistung – unabhängig von technischen Einflüssen – der Funktion des AVP-Systems zugeschrieben werden.

Die Effektivität der Anwendung eines V1R-Antagonisten im lateralen Septum in der Suppression des sozialen Gedächtnisses wurde bereits gezeigt (Everts und Koolhaas, 1999). Dass in V1aR AAV-behandelten Tiere eine effektive Unterdrückung der Gedächtnisleistung unter V1aR-

Antagonisten-Behandlung erreicht werden konnte, unterstreicht die physiologisch konstitutive und verhaltensrelevante Expression des Wühlmaus-V1aR per AAV-Transfektion.

Insgesamt wurden die vorliegenden Ergebnisse durch weitere Studien an beschriebenen V1aR *knockout*-Mäusen unterstützt. Die septale Applikation desselben V1aR AAVs führte in diesen Tieren zur Wiederherstellung der Wiedererkennung eines Jungtiers. Auch konnte eine verbesserte Gedächtnisleistung im sozialen Kontext, wie sie in vorliegender Studie dargelegt wurde, an V1aR AAV-behandelten C57/BL6-Mäusen reproduziert werden (Bielsky et al., 2005).

Die dargelegten SDis-Experimente unter AAV-Behandlung an NABs zeigten somit, dass die V1aR-Dichte grundlegend, aber auch limitierend für die Leistung der kognitiven Fähigkeiten im sozialen Kontext ist. Auch erwies sich die Transfektion von Vektoren mittels viraler Genfähren als effektives, verhaltensrelevantes und gut zu handhabendes Werkzeug zur regional wie temporal selektiven Veränderung der Expression von Rezeptoren. Darauf basierend soll in weiteren Studien – bei Wiederverfügbarkeit von HAB/LAB-Ratten – die mögliche Manipulation sowohl der Kognition im sozialen Kontext als auch der Emotionalität der Zuchttiere weiter untersucht werden.

2. Effekte der Manipulation des AVP-Systems im PVN auf das Angstverhalten von HAB- und LAB-Ratten

2. 1. Suppression des hypothalamischen AVP Systems via *antisense*-Behandlung des PVN von HAB-Ratten

Gemütskrankungen wurden einer Überaktivität des Hypothalamus zugeschrieben (Steckler et al., 1999). Diese soll sowohl durch CRH als auch AVP vermittelt werden, die im PVN koexprimiert und dort synergistisch auf die Stressreaktion wirken (de Kloet et al., 2005). Da psychiatrische Erkrankungen in ihrer Genese deutlich durch eine vererbte Vulnerabilität geprägt sind, wird, wie einleitend beschrieben, verstärkt nach genetischen Ansatzpunkten für zukünftige therapeutische Interventionen gesucht (Botstein und Risch, 2003). Ein solcher Ansatzpunkt zeigte sich im AVP-Gen der HAB-Ratten (Murgatroyd et al., 2004). Die dort gefundenen Veränderungen der genetischen Sequenz, einhergehend mit einer AVP-Überexpression im PVN, spielen eine zentrale Rolle in der Ausprägung des Angstverhaltens von HAB-Ratten, auf das einleitend eingegangen wurde. Neben der Überexpression, die in dieser Arbeit reproduziert werden konnte (Projekt 4 A), und der vermehrten Ausschüttung von AVP in HABs im Gegensatz zu LABs konnten Wigger et al. (2004) zeigen, dass die Behandlung des PVN von HAB- und LAB-Ratten mit einem V1a/bR-Antagonisten nur erstere weniger ängstlich macht. Allerdings waren keine Unterschiede in der V1aR-Bindungskapazität festzustellen. Des bestätigte, dass vielmehr der Ligand als der Rezeptor ausschlaggebend in den Linienunterschied im Angstverhalten der Zuchtlinien involviert sein könnte. Des Weiteren zeigten die Studien von Keck et al. (2002), dass die Reduzierung der AVP mRNA-Expression auf Grund

andauernder Behandlung mit Antidepressiva sowohl mit einer Verhaltens- als auch einer HPA-Achsen-Veränderung einherging.

Diesen Studien entsprechend sollte nun untersucht werden, ob die direkte Intervention mit dem Hauptkandidaten-Gen für die genetische Prädisposition von Angstverhalten in HABs einen neuroendokrinen und/oder verhaltensbiologischen Effekt in HAB-Ratten bedingt. Dies sollte durch selektive Reduzierung des exprimierten AVPs im PVN per subchronischer AS-Applikation erreicht werden.

In der vorher beschriebenen Etablierung der für HAB/LAB-Ratten geeigneten AS untersuchten Wigger et al. (unveröffentlicht) neben der AVP-Ausschüttung auf Grund der AS-Behandlung bereits eventuelle neuroendokrine Auswirkungen. Sie konnten zeigen, dass die verwandte AS wie die Kontrollsubstanzen keinen Einfluss auf die HPA-Achsen-Aktivität von HABs oder LABs hatten, weder basal noch nach Exposition auf der EPF. Darauf basierend sollte in dieser Studie ein möglicher verhaltensbiologische Effekt im Vergleich zu MS bzw. zu reiner Applikationslösung untersucht werden.

Der vorangegangenen Studie entsprechend sollte die Lokalisation der AS per Fluorescins-Markierung untersucht werden.

Versuchsplan

Aus Gründen der Verfügbarkeit von Zuchttieren wurden in einem ersten Ansatz die Effekte von AS (n = 6) im Vergleich zu MS (n = 7) untersucht und in einem zweiten Set von Tieren die Wirkung von MS (n = 6) gegenüber einer Vehikel (n = 6)-Applikation.

Zur Vergleichbarkeit der Studien wurden die jeweiligen Ergebnisse der MS-behandelten Tiere als Referenz (100%) für die jeweilige in Vergleich befindliche Substanz angenommen.

Antisense-Applikation in den PVN

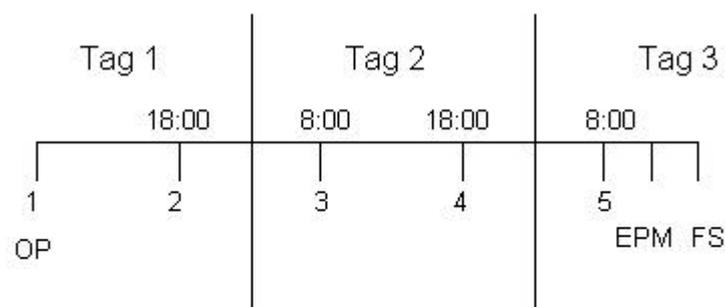


Abbildung 33. Zeitplan der Applikation von AVP *antisense*-Oligodeoxynucleotid (ODN)-Sequenzen, *missense* ODN oder Vehikel in den PVN.

HABs und LABs wurden, beginnend direkt nach der Implantation einer Führungskanüle (OP), täglich abends (18:00 Uhr) und morgens (8:00 Uhr) behandelt. Eine Stunde nach der morgendlichen Applikation an Tag 3 wurden die Tiere der *elevated plus maze* (EPM) und daran eine Stunde anschließend dem *forced swimming* (FS) exponiert.

Unmittelbar nach Implantation der Führungskanüle wurde mit der Applikation am noch narkotisierten Tier begonnen. Pro Injektionsseite wurde 1 µl Substanz in den PVN appliziert (100 nM AS; 100 nM MS; Vehikel). Im Folgenden wurden die Tiere abends und morgens über 2 Tage hinweg behandelt (Abb. 33). An Tag 3 wurden die Tiere 1 h nach der 5. Injektion der EPM und eine weitere Stunde danach dem FS-Test exponiert.

Die histologische Verifizierung erfolgte mit Kresylviolett färbung.

Zur Identifizierung der zellulären Lokalisation der ODN wurden der PVN von zwei Tieren bilateral mit FITC AS behandelt. Diese wurde per Fluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen.

Ergebnisse

AS-injizierte Tiere verbrachten signifikant mehr %Zeit auf den OA der EPM als MS-behandelte Tiere, die sich nicht von Tieren mit Vehikel-Applikation unterschieden (Abb. 34). Während die mit *floating* verbrachte Zeit im FS-Test durch AS-Behandlung gegenüber den sich nicht unterscheidenden Kontrollen reduziert war, war kein Einfluss einer applizierten Substanz auf den Parameter *struggling* zu erkennen. Keine Unterschiede wurden zwischen allen Gruppen in der Lokomotion auf der EPM gefunden.

Die Untersuchung der Injektionsstelle und der Verteilung der FITC AS zeigte, dass die Substanz sich diskret im Kerngebiet, aber auch im Injektionskanal verteilt hatte (Abb. 35).

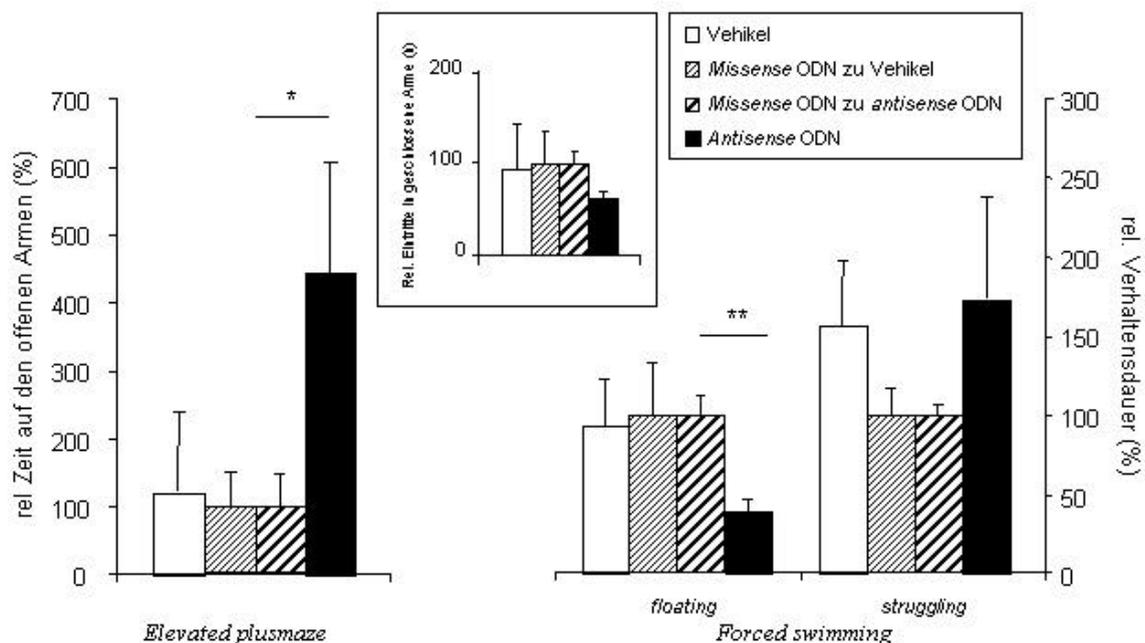


Abbildung 34. *Elevated plus maze*- und *forced swimming*-Test an AVP *antisense*- bzw. kontrollbehandelten HAB- und LAB-Ratten. HABs und LABs wurden vor der Erfassung von Angstverhalten und Lokomotion bzw. depressionsbezogenem Verhalten über drei Tage hinweg (entsprechend Zeitplan Abb. 30) AVP *antisense*-Oligodeoxynucleotid (ODN)-Sequenzen, *missense* ODN oder Vehikel in den PVN appliziert (Mittelwerte \pm SEM; ** p < 0,01, * p < 0,05).

Diskussion

Die dargelegte Manipulation des vasopressinergen Systems im PVN mittels AS reduzierte das angeborene angst- wie auch das depressionsbezogene Verhalten von HAB-Ratten (Abb. 34). Damit wurde gezeigt, dass alleine die selektive Reduktion des hyperaktiven AVP-Systems im PVN hinreichend ist, um das pathologisch übersteigerte Angstverhalten der Tiere zu normalisieren. Mehr noch führte die AS-Behandlung zu einer weniger passiven Stressbewältigungsstrategie im FS-Test, indikativ für die Reduktion des depressionsähnlichen Verhaltens von HAB-Ratten. Die hohe Selektivität und Effektivität der AVP AS erwies sich in der Wirkungslosigkeit von MS und auch im indirekten Vergleich zu Vehikel.

Wie auch für die AS-Injektion in den PVN konnte deren intrazelluläre Lokalisation als Voraussetzung für die Beeinträchtigung der AVP-Expression auf Grund der zellulären Akkumulation der FITC-markierten AS angenommen werden (Abb. 35).

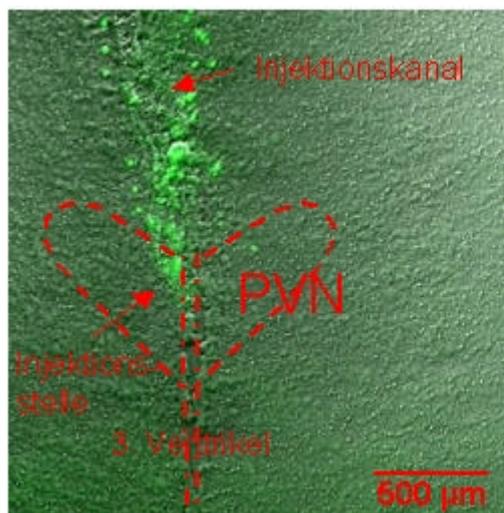


Abbildung 35.
Via Fluoreszenzmikroskopie untersuchte Injektionsstelle und die Verteilung der Fluoresceinmarkierten AVP antisense Oligodeoxynucleotid-Sequenzen (grün) im PVN.

Eine Rolle von AVP in Angsterkrankungen und affektiven Störungen, einhergehend mit einer dysregulierten HPA-Achse, wurde seit der Arbeit von Gold et al. (1978) vielfach angenommen (Scott und Dinan, 2002). Während sich erste Studien zur verhaltensbiologischen Wirkung von AVP im Zusammenhang von Angst und Depression auf das Septum konzentrierten (Landgraf et al., 1995; Appenrodt et al., 1998), zeigten Wotjak et al. (1996), dass AVP im PVN in Reaktion auf den emotionalen Stress einer SD-Exposition vermehrt sezerniert wird – unabhängig von der Sekretion in den peripheren Blutkreislauf. In gleicher Studie hatte ein per inverser Mikrodialyse verabreichter V1R-Antagonist jedoch keine Auswirkung auf das Angstverhalten im EPM-Test. Dies könnte aber durch die vorangegangene SD-Exposition bzw. den gleichzeitig verabreichten CRH-Rezeptorantagonisten maskiert worden sein. Der daraufhin von Landgraf et al. (1998) postulierte verhaltensbiologische Effekt von AVP im PVN wurde von Wigger et al. (2004) mittels eines V1R-Antagonisten an HAB/LAB-Ratten gezeigt. Dessen Applikation per inverser Mikrodialyse in den

PVN von HABs führte zur tendenziellen Reduzierung des Angstverhaltens auf der EPM wie auch zu vermehrt aktiver Stressbewältigung im FS-Test. Daran anknüpfend konnte in vorliegender Studie gezeigt werden, dass die Beeinflussung des Liganden einen klaren Verhaltenseffekt nach sich zieht. Durch beide Studien wurde verdeutlicht, dass die Interaktion Ligand-Rezeptor im AVP-System des PVN für die Ausbildung sowohl des hyperängstlichen wie auch des depressionsähnlichen Verhaltens von HAB-Ratten hinreichend verantwortlich ist. Dass keine der verabreichten Substanzen einen Einfluss auf die Lokomotion der Tiere hatte und damit ein tatsächlicher Effekt beobachtet wurde, zeigte die vergleichbare Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme der EPM.

Die verabreichte AS hatte keinen Einfluss auf die Sekretion von ACTH und CORT (Wigger et al., unveröffentlicht). Dies steht im Kontrast zu den Studien von Keck et al. (2002), die zeigen konnten, dass die pathologisch hyperaktive HPA-Achse von HABs im DEX/CRH-Test durch die Gabe eines V1R-Antagonisten in den PVN normalisiert werden konnte. Auch die Behandlung des PVN von normalen Wistar-Ratten mit einer Mischung aus AS-Sequenzen, die spezifisch die Translation der CRH, AVP und Oxytocin mRNA blockierten, hatten – im Gegensatz zur Injektion von MS und reiner Applikationslösung sowie zu unbehandelten Kontrollen – eine Reduzierung der stressinduzierten HPA-Achsen-Aktivität zur Folge (Neumann, 2000). Diese Resultate unterstreichen die mehrfach postulierte unabhängige Regulierung von verhaltensbiologischer und neuroendokriner Stressreaktion (Castanon et al., 1995; Courvoisier et al., 1996).

Die Studien von Wigger et al. (2004) und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eindeutig die verhaltensbiologische Relevanz von AVP im PVN in angst- und depressionsbezogenem Verhalten. Somit sind AVP im PVN und die im AVP-Gen bzw. der Promotorsequenz gefundenen Mutationen Hauptkandidaten für weitere genetische Studien zur Grundlage von Angst und komorbid depressionsbezogenem Verhalten am HAB/LAB-Modell.

2. 2. Intracerebrale Gabe von AVP in LAB-Ratten: Angstverhalten sowie Validierung der *elevated platform*

Im Gegensatz zur Reduzierung der Hyperängstlichkeit in HABs durch die Suppression des AVP-Systems sollte untersucht werden, ob die Manipulation des AVP-Systems in LAB-Ratten hinreichend ist, deren angeborenerweise sehr geringe Angst zu beeinflussen. Da zunächst eine generelle, regional unspezifische Wirksamkeit untersucht werden sollte, wurde AVP in den Ventrikel (intracerebroventrikulär, icv) appliziert. Durch Diffusion im Extrazellulärraum sollten damit alle stressverarbeitungsrelevanten und ventrikelnahen Strukturen, die auf AVP reagieren – u.a. der PVN –, beeinflusst werden.

Neben der weiteren Charakterisierung des Einflusses von AVP auf das Angstverhalten sollte damit gleichzeitig die Validität der *elevated platform* (EPF) in Angsttests gezeigt werden. Die EPF wurde erstmals in den 70er Jahren als Stressor im Zusammenhang von HPA-Achsen-Aktivität,

Serotonin im Hippocampus und Nikotin verwandt und erwies sich als stark stimulierend auf die CORT-Sekretion (Balfour et al., 1975). Auch wurde die EPF kürzlich als emotionaler Stressor gegenüber dem physiologischen FS-Test im Rahmen der Untersuchung der HPA-Achsen-Aktivität eingesetzt (Neumann et al., 2000; Umriukhin et al., 2002). Dennoch wurde die EPF bisher verhaltenbiologisch im Formenkreis Angst nicht näher validiert. Daher wurde den EPF-exponierten Tieren alternativ zu AVP entweder CRH, der anxiogen/panikogen wirkende inverse Benzodiazepin Agonisten FG-7142 oder Vehikel verabreicht. Da die anxiogene Wirkung von CRH und FG-7142 bereits erwiesen ist (Pellow et al., 1985; Spina et al., 2002; Campbell et al., 2003), dienten diese damit einerseits als Kontrollsubstanzen des AVP-Effekts und andererseits zur Validierung der EPF.

Versuchsplan

Vier bzw. sechs Tage nach der Implantation einer Führungskanüle wurden LAB-Ratten icv 5 µl CRH (3 µg/kg; Ferring, Kiel, Deutschland), AVP (150 ng/kg; Sigma, Taufkirchen, Deutschland) oder Vehikel (Ringers Lösung) appliziert. Die Substanzgabe fand jeweils 30 min vor dem Testdurchgang statt. Zunächst wurden die Tiere dann auf der EPF, 10 min später auf der EPM exponiert.

Die Injektion von CRH und AVP erfolgte in einem Kreuzdesign, so dass die Tierzahl minimiert werden konnte. Nach Gabe von CRH (n = 10) und Vehikel (n = 10) und der anschließenden Testung wurden die jeweiligen Gruppen geteilt und 2 Tage später zur Hälfte mit AVP (n = 7) oder Vehikel (n = 7) behandelt und getestet.

In einer zweiten Studie wurde den Tieren intraperitoneal (ip) 0,6 ml FG-7142-Lösung (7,5 mg/kg gelöst in 45 % Dextrin (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und 0,9 % NaCl; n = 5) oder das Dextrin/NaCl-Vehikel (n = 5) verabreicht. 30 min später fand der EPM- sowie 10 min daran anschließend der EPF-Test statt.

Zwischen Injektion und Stressorexposition wurden alle Ratten in den Heimkäfig zurückgesetzt. Die Lokalisationskontrolle erfolgte durch icv-Applikation von 5 µl Tinte (Pelikan, Hannover, Deutschland).

Ergebnisse

Nach Gabe von CRH zeigte sich in LABs gegenüber den vehikelbehandelten Tieren ein deutlich anxiogener Effekt auf der EPM (Abb. 36). Auch die *headdips* auf der EPF waren reduziert. Ebenso wirkte die Substanz FG-7142 deutlich anxiogen im EPM-Test und hatte deutlich weniger *headdips* zur Folge. Die Injektionen von CRH und FG-7142 hatten keinen Einfluss auf die Lokomotion (Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme: CRH-Vehikel $9,60 \pm 0,60$; CRH $8,50 \pm 0,87$; FG-7142-Vehikel $8,40 \pm 1,08$; FG-7142 $5,80 \pm 1,02$).

Die zunächst angesetzte Dosis von 1,5 µg/kg war letal für LAB-Ratten, so dass sie noch innerhalb des Versuchs auf 150 ng/kg gesenkt wurde. Da sich im Kreuzdesigns der CRH- und AVP-Gabe kein Einfluss von CRH- bzw. Vehikel-Vorbehandlung auf die Tiere innerhalb der AVP- bzw.

mit Vehikel behandelten Gruppen zeigte (Mann-Whitney-U-Test), wurden die jeweiligen Gruppen entsprechend der AVP-Behandlung zusammengefasst. Die Applikation des Nonapeptids führte in LAB-Ratten zu einem verstärkt ängstlichen Verhalten auf der EPM und reduzierte deutlich die *headdips*. Zusätzlich war die Lokomotion auf der EPM nach AVP-Gabe vermindert (Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme: AVP-Vehikel $9,00 \pm 1,08$; AVP $4,71 \pm 0,47$; $p < 0,05$).

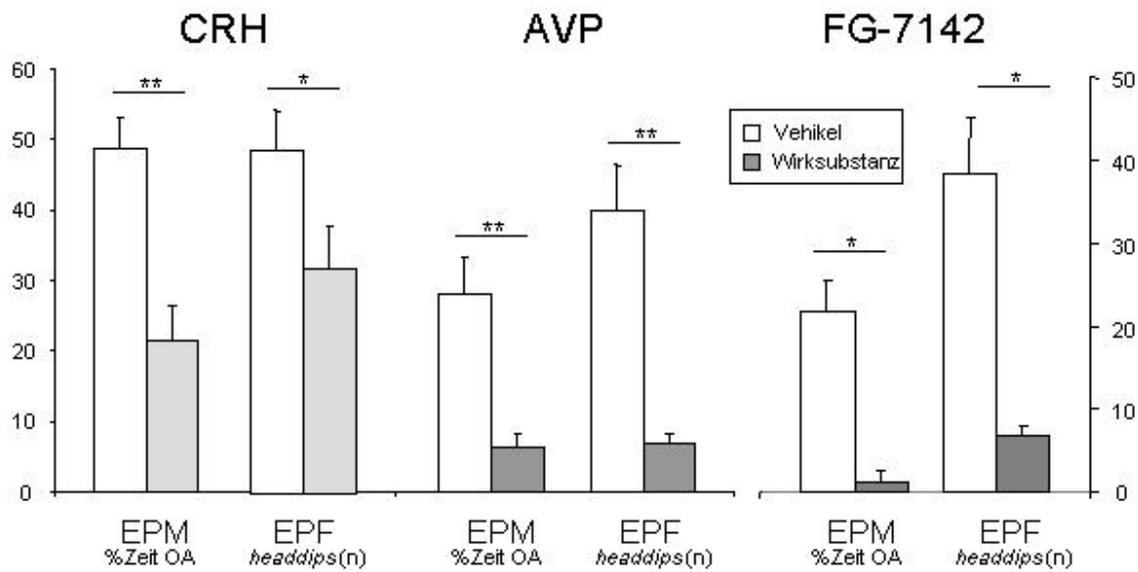


Abbildung 36. *Elevated plusmaze* (EPM)- bzw. *elevated platform* (EPF)-Test an LAB-Ratten nach Behandlung mit *Corticotropin releasing-Hormon* (CRH), AVP, FG-7142 oder dem jeweiligen Vehikel (Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

Diskussion

CRH, AVP und FG-7142 hatten einen deutlich anxiogenen Effekt auf LABs in der Testung auf der EPM, indem die auf den OA der EPM verbrachte %Zeit gegenüber vehikelbehandelten Tieren vermindert war (Abb. 36). Auch die Anzahl der *headdips* auf der EPF wurde durch alle Substanzen deutlich reduziert. Somit zeigen die Ergebnisse vorliegender Studien, dass AVP auch in Tieren mit besonders geringer Ängstlichkeit anxiogen wirkt. Außerdem hat sich die Anzahl der *headdips* auf der EPF als ein sehr sensibler Parameter für Ängstlichkeit bzw. Explorationsbereitschaft erwiesen.

Der deutlich anxiogene Effekt einer intracerebralen Applikation von CRH wurde auf der EPM 5 min, 30 min und 120 min nach der Injektion einer Dosis von mindestens $3 \mu\text{g/kg}$ gezeigt (Spina et al., 2002). Des Weiteren erwies sich die Schreckreaktion bei dreifacher Applikation des Peptids weiter verstärkt als nach einmaliger Gabe (Servatius et al., 2005). Diese Wirkung von CRH wurde vermutlich über die stressverarbeitenden Regionen in der zentralen Amygdala oder auch im BNST und dorsalen Raphekern vermittelt (Campbell et al., 2004; Servatius et al., 2005).

Im Zusammenhang mit der EPF-Exposition war von Interesse, dass icv appliziertes CRH in einer dem Tier vertrauten Umgebung keinen Effekt auf die Exploration hatte, während diese in einer

erstmaligen *open field*-Exposition als vermindert berichtet wurde (Campbell et al., 2004). Damit könnte die Reduktion der *headdips* auf der EPF auf Grund von CRH-Applikation sowohl ein reduziertes Angst- wie auch Explorationsverhalten widerspiegeln.

Der inverse Benzodiazepin-Agonist FG-7142 wirkt auf die panikogene Dimension innerhalb des Angstverhaltens. Dies wurde sowohl in Tierexperimenten als auch klinischen Studien belegt (Dorow et al., 1983; Dorow, 1987). Der anxiogene Effekt von FG-7142 auf der EPM wurde bereits mehrfach gezeigt (Pellow et al., 1985; Cole et al., 1995) und war auch in unseren Versuchen bei LAB-Ratten deutlich messbar. Die auch in den Kontrolltieren für LABs relativ geringe %Zeit auf den OA der EPM könnte einerseits durch die Injektion, andererseits durch die 2 Wochen nach der Standard-Testung wiederholte EPM-Exposition hervorgerufen worden sein (Hogg, 1996).

Kürzlich zeigten Salchner et al. (2006) an HAB/LAB-Ratten, dass in der neuronalen Aktivität auf Grund einer *air jet*-Exposition Parallelen zur Behandlung mit FG-7142 gezogen werden können. HABs zeigten dabei mehr Panik widerspiegelnde Fluchtreaktionen als LABs bei Anwendung des Druckluftstroms, was ein weiteres Indiz für die Abbildung psychopathologischer Angstformen bei ersteren ist. Somit könnte die durch FG-7142 induzierte Reduktion der *headdips* auf der EPF ein erhöhtes Panik-/Angstverhalten der LABs – abgebildet in reduziertem Explorationsverhalten gegenüber ihren Kontrollen – reflektieren. Da FG-7142 jedoch zu einer generellen Aktivierung fast aller untersuchten Gehirnareale, mit Ausnahme des Hippocampus und der *Substantia nigra*, führte (Salchner et al., 2006), kann dem beobachteten anxiogenen Effekt auf der EPF durch FG-7142 keine eindeutige neuronale Struktur zugewiesen werden. Allerdings erwiesen sich das mediale präoptische Areal, der anteriore Hypothalamus und der *Locus coeruleus* nach FG-7142-Applikation gleichermaßen verstärkt Fos-positiv in HABs, die auch eine geringere Anzahl von *headdips* auf der EPF zeigten (Projekt A 4). Ob EPF-Verhalten und vorgenannte Regionen in Zusammenhang stehen, bleibt zu zeigen.

Ebenso wie CRH und FG-7142 zeigte AVP eine deutliche Reduktion der %Zeit auf den OA der EPM. Dies wurde bereits für die icv-Injektion von AVP in normalen Ratten berichtet (Bhattacharya et al., 1998). Hier zeigte sich u.a. vermehrtes Angstverhalten auf der EPM, reduzierte soziale Interaktion und erhöhte Immobilität im *open field* einer Dosiswirkungskurve (100, 200 und 500 ng/Ratte) folgend. Auch wurde der Einfluss von AVP auf Herzfrequenz, Körpertemperatur, Lokomotion und *rearing* einer U-förmigen Dosiswirkungskurve (0,1 bis 100 ng pro Tier) folgend berichtet (Diamant und De Wied, 1993). Die Effekte bei der vergleichbaren Dosis von 30 ng spiegelten dabei weitgehend angstindizierende Werte wider, welche durch die Gabe eines V1R-Antagonisten invertiert wurden. Auch wurde bei icv-Applikation von AVP vermehrtes *freezing* sowie Putz- und Vergraberhalten von sowohl ungestressten als auch mehrfach immobilisierten Tieren berichtet (Chen und Herbert, 1995).

In der zunächst verwandten höheren Dosis von AVP (500 ng pro Tier) zeigten die Ratten deutliche *barrel rotation* (Drehen um die eigene Achse) und hohe Mortalität. Während für diese Dosis und für 1 µg AVP pro Tier weder *barrel rotation* noch Mortalität berichtet wurden, beobachteten dies andere bereits bei geringeren Dosen (Diamant et al., 1994; Bhattacharya et al., 1998). Die reduzierte

AVP-Dosis hatte im EPM-Test leicht sedierende Effekte auf LABs. Während die Lokomotion jedoch nur leicht reduziert war, war die %Zeit auf den OA der EPM um ein vielfaches niedriger als bei Kontrolltieren. Auch hier ist anzumerken, dass in diesem Versuch die %Zeit auf den OA in Kontroll-LABs relativ niedrig war. Dies könnte auf die nur 2 Tage zurückliegende EPM-Testung im CRH-Versuch zurückzuführen sein (Hogg, 1996). Somit ist insgesamt von einem anxiogenen Effekt von AVP auf der EPM auszugehen. Ähnliches gilt für die EPF, da auch hier AVP-behandelte LABs *headdips* zeigten, jedoch weit weniger als vehikelbehandelte Tiere.

Durch vorliegende Experimente wurde die EPF als valider Test zur Erfassung angstbezogenen Verhaltens erwiesen. Dies steht ergänzend zu den Untersuchungen von Degroot et al. (2004), die die EPF als Stressmodell mit dem hippocampalen cholinergen System als neuronales Korrelat validiert haben. Außerdem konnte in diesen Studien gezeigt werden, dass selbst bei extrem wenig ängstlichen LAB-Tieren die Manipulation des AVP-Systems hinreichend ist, deren Angstverhalten zu verstärken. Nun ist zu zeigen, ob dieser Effekt im Zusammenhang mit dem vasopressinergen System des PVN steht.

2. 3. Überexpression von AVP im PVN von LAB-Ratten: Angstverhalten, neuroendokrine und physiologische Parameter

Basierend auf der anxiogenen Wirkung von icv-appliziertem AVP in LAB-Ratten (Projekt B 2.2, Abb. 36) sollte in folgenden Untersuchungen komplementär zur selektiven Reduzierung von AVP mRNA im PVN von HAB-Ratten (Projekt B 2.1, Abb. 34) die verhaltensbiologische, physiologische und neuroendokrine Wirkung einer selektiven Erhöhung der Expression von AVP im PVN von LAB-Ratten mittels eines AAV untersucht werden.

Ideno et al. (2003) konnten zeigen, dass die Behandlung des SON mit einem AVP-exprimierenden AAV (AVP AAV) die Symptome eines zentralen Diabetes insipidus von AVP-defizitären Brattleboro-Ratten normalisierte. Dieser Effekt trat nach einer Inkubationszeit von 2 bis 3 Wochen auf und war langanhaltend. Stimulusabhängige Ausschüttung von AVP in transduzierten Ratten zeigte außerdem eine konstitutive Expression von AVP auf Grund der AAV-Behandlung.

Inbesondere letzteres bot die Möglichkeit, die Wirkweise des AVP-Systems unter basalen sowie in Stresssituationen eingehender zu charakterisieren, indem der PVN durch die Expression der vektorialen DNA zu einer physiologischen Hypersekretion von AVP sowohl innerhalb des PVN als auch in Steuerung der HPA-Achse angeregt werden könnte. Damit könnte die Beteiligung des AVP in diskreten Stresssituationen bzw. in Reaktion auf bestimmte Stressoren näher untersucht werden. Dazu sollte 4 Wochen nach Injektion des AVP AAVs das angst- und depressionsbezogene Verhalten der Tiere in einer Reihe von unterschiedlichen Verhaltenstests sowie im Heimkäfig untersucht werden.

Da bei einer Transfektion des PVN mit einem AVP AAV auch magnozellige Neuronen zu vermehrter Expression von AVP angeregt würden, könnte auch die Osmoregulation der Tiere

verstärkt aktiv werden. Daher sollte auch das Trinkverhalten als Korrelat der osmoregulatorischen Aktivität untersucht werden.

Wie zuvor dem V1aR AAV galt dem AVP AAV ein lacZ-exprimierender Vektor (lacZ AAV) zur physiologischen und zytotoxischen Kontrolle.

Die Expression von AVP mRNA sollte *post mortem* per AVP ISH geprüft werden.

Versuchsplan

Nach akuter bilateraler Applikation des jeweiligen AAV (1 µl AVP AAV bzw. lacZ AAV pro Injektionsseite; bereitgestellt von J. Ideno und K. Ozawa, Jichi Medical School) per Glasfaserkanüle in den PVN wurden alle Tiere in den ursprünglichen Gruppen gehalten. Trinkverhalten und Verhalten im Heimkäfig wurden einmalig vor der Operation, danach im Wochenrhythmus erhoben. Die Verhaltensparameter wurden ab der 4. Woche nach der Operation beginnend mit der DaLi-Testung untersucht. Nach weiteren 2 Wochen wurden die Tiere der EPM und 2 Tage anschließend dem FS-Test exponiert. Weitere 3 Wochen danach wurden die Tiere auf der EPF getestet und im direkten Anschluss daran neuroendokrine Parameter bei der Dekapitation erhoben sowie die Gehirne entnommen. Die histologische Lokalisation erfolgte durch den Nachweis des Vorhandenseins von Tintenpartikeln, die zuvor den Virus-Lösungen zugegeben worden waren (1 µl Kohlepartikel je 30 µl Lösung (Ideno et al., 2003)). Die AVP mRNA im PVN wurde per ISH quantifiziert.

Ergebnisse

Durch die histologische Verifizierung der korrekt lokalisierten Injektionen konnten 11 bilaterale Treffer, davon 7 lacZ AAV-behandelte und 4 AVP AAV-behandelte, und 8 unilaterale Treffer, davon 3 lacZ AAV-behandelte und 5 AVP AAV-behandelte, identifiziert werden.

In der Untersuchung der AVP-Expression nach Viren-Applikation zeigte sich, dass die bilateral getroffenen mit AVP AAV-behandelten LABs mehr AVP mRNA exprimierten als lacZ AAV-behandelte korrekt injizierte Tiere (Tabelle 4). In den unilateral injizierten LABs war dieser Unterschied nur tendenziell vorhanden. Betrachtete man beide Gruppen gemeinsam, so war die Differenz ebenfalls signifikant.

Während zwischen den bilateral getroffenen Behandlungsgruppen kein Unterschied in einem der getesteten Parameter zu finden war, wiesen unilateral AVP AAV-behandelte LABs weniger DaLi-rearings auf als lacZ AAV-behandelte.

Sofern in einem Käfig mehr als die Hälfte der Tiere zumindest eine einseitige Injektion in den PVN aufwiesen, wurden die Tiere in die Analyse des Heimkäfig- und Trinkverhaltens integriert. Vor der Operation waren das Heimkäfigverhalten aller LABs im Vergleich zu HABs untersucht worden (Tabelle 5). Im Linienvergleich zeigten HAB-Ratten tendenziell weniger rearings sowie vermehrtes Schlafen/Ruhen. Zwischen den später unterschiedlich behandelten LAB-Käfiggruppen waren keine Unterschiede vorab im Verhalten festzustellen.

Manipulation des AVP-Systems in HAB-, LAB- und NAB-Ratten

Tabelle 4. Verhalten und neuroendokrine Parameter von LAB-Ratten, deren PVN uni- bzw. bilateral mittels viralem Vektor (AAV) mit AVP bzw. lacZ transfiziert worden war (Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ^T $< 0,1$).

	bilaterale Injektion		unilaterale Injektion	
	lacZ AAV (n=7)	AVP AAV (n=4)	lacZ AAV (n=3)	AVP AAV (n=5)
EPM: Zeit auf den OA (%)	39,6 \pm 7,42	48,9 \pm 13,2	17,5 \pm 7,40	21,5 \pm 4,17
EPF: <i>headdips</i> (n)	31,3 \pm 14,7	31,2 \pm 10,0	53,0 \pm 0,00	45,6 \pm 11,1
DaLi: Zeit im Hellen (sec)	65,2 \pm 17,5	88,6 \pm 30,3	40,3 \pm 7,41	53,5 \pm 15,0
DaLi: <i>rearing</i> pro Zeit im				
Dunklen (n)	4,63 \pm 0,61	4,11 \pm 0,68	6,13 \pm 0,74	4,70 \pm 0,16 *
FS: <i>struggling</i> (sec)	182 \pm 29,0	137 \pm 25,5	182 \pm 24,5	146 \pm 15,3
FS: <i>floating</i> (sec)	108 \pm 21,6	70,0 \pm 14,8	70,6 \pm 15,3	79,9 \pm 21,7
Fs: <i>floating</i> -Latenz (sec)	101 \pm 10,2	105 \pm 16,8	90,8 \pm 14,9	113 \pm 13,6
ACTH (pg/ml)	568 \pm 93,9	518 \pm 141	220 \pm 22,8	245 \pm 15,4
CORT (ng/ml)	185 \pm 14,1	195 \pm 43,8	226 \pm 43,7	236 \pm 31,2
AVP mRNA-Gehalt im PVN				
(rel. Intensität)	23,9 \pm 1,68	48,9 \pm 2,58 **	27,4 \pm 2,38	38,3 \pm 4,18 ^T
Lokomotion DaLi (n)	15,1 \pm 2,45	16,7 \pm 2,01	16,3 \pm 1,97	14,8 \pm 1,29
Lokomotion EPM (n)	6,28 \pm 0,99	5,00 \pm 1,29	4,00 \pm 0,57	7,40 \pm 1,63

	Zusammenfassung von bi- und unilateraler Injektion	
	lacZ AAV (n=10)	AVP AAV (n=9)
EPM: Zeit auf den OA (%)	33,0 \pm 6,38	33,7 \pm 7,57
EPF: <i>headdips</i> (n)	38,5 \pm 10,3	39,2 \pm 7,57
DaLi: Zeit im Hellen (sec)	57,7 \pm 12,7	69,0 \pm 15,9
DaLi: <i>rearing</i> pro Zeit im		
Dunklen (n)	5,08 \pm 0,51	4,44 \pm 0,30
FS: <i>struggling</i> (sec)	182 \pm 20,8	142 \pm 13,2
FS: <i>floating</i> (sec)	96,5 \pm 16,3	75,5 \pm 13,1
Fs: <i>floating</i> -Latenz (sec)	97,9 \pm 8,07	109 \pm 10,0
ACTH (pg/ml)	452 \pm 84,1	367 \pm 75,4
CORT (ng/ml)	197 \pm 16,1	218 \pm 25,3
AVP mRNA-Gehalt im PVN		
(rel. Intensität)	24,9 \pm 1,40	43,0 \pm 3,07 **
Lokomotion DaLi	15,4 \pm 1,75	15,6 \pm 1,12
Lokomotion EPM	5,60 \pm 0,77	6,33 \pm 1,09

Nach AAV-Behandlung zeigten sich in der 2. Woche AVP AAV-behandelte LABs mehr schlafend/ruhend (Tabelle 6). Dieser Unterschied wurde nochmals in der 8. Woche nach Injektion beobachtet. Hier wurden lacZ AAV-behandelte Tiere auch öfters beim Fressen/Saufen beobachtet.

Auf die konsumierte Wassermenge der Tiere hatte die unterschiedliche Behandlung keinen Einfluss (Tabelle 7).

Tabelle 5. Verhalten im Heimkäfig HAB- und LAB-Ratten. Die Parameter wurden in 4 Beobachtungen pro Tag (je zwei Observationen eine Stunde vor bzw. nach Licht-Aus) erhoben und zur Anzahl der gesamt beobachteten Verhaltensparameter sowie zur Anzahl der Tiere pro Käfig in Relation gesetzt (n ist die Anzahl der beobachteten Käfige mit 2-5 Tieren/Käfig; Mittelwerte \pm SEM; $p < 0,05$, $T < 0,1$).

Anteilige Parameter am Verhaltensspektrum im Heimkäfig (%)		
HAB vs LAB	HAB (n = 6)	LAB (n = 9)
Kämpfen	0,00 \pm 0,00	7,40 \pm 7,40
Drohen	12,5 \pm 12,5	25,9 \pm 12,1
Soziales Putzen	4,16 \pm 4,16	2,77 \pm 2,77
<i>rearing</i>	30,5 \pm 13,9	72,2 \pm 16,3 T
Schnüffeln	47,2 \pm 18,5	50,0 \pm 9,91
Graben	9,72 \pm 6,24	5,55 \pm 3,67
Selbstputzen	59,7 \pm 20,5	100 \pm 19,4
Schlafen/Ruhen	113 \pm 35,7	25,0 \pm 10,7 *
Fressen/Saufen	40,3 \pm 16,4	22,2 \pm 12,8

Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Studien zeigen, dass die Applikation des von Ideno et al. (2003) etablierten AVP AAV in den PVN von LAB-Ratten keinerlei Auswirkungen auf die untersuchten Verhaltens-, neuroendokrinen und physiologischen Parameter hatte (Tabelle, 4, 6 und 7). Das Vorhandensein von deutlich vermehrter Bindung an AVP mRNA-spezifische ODN in AVP AAV-behandelten Tieren wurde 8 Wochen nach der Injektion der AAV per ISH gezeigt.

Die Verwendung von AAV-Genfähren für eine langanhaltende Veränderung der Genexpression hat sich insbesondere für das Nervensystem als praktikabel und sehr nützlich erwiesen (Daly, 2004). Der AAV bietet die Möglichkeit, Proteine – Enzyme, Neurotransmitter, Rezeptoren und andere – unabhängig von der Blut-Hirn-Schranke an ihren Wirkort zu transferieren und dort über lange Zeit wirksam zu exprimieren (Tenenbaum et al., 2004). Auf Grund dieser Voraussetzungen bildete der von Ideno et al. (2003) als effektiv in der AVP-Expression gezeigte AAV ein Werkzeug, den Einfluss von AVP insbesondere auf das Angstverhalten von hypoängstlichen LAB-Tieren zu zeigen.

Tabelle 6. Verhalten im Heimkäfig von LAB-Ratten, deren PVN mittels viralem Vektor mit AVP bzw. lacZ transfiziert worden war vor der Operation sowie in der 1. bis 7. Woche danach. Die Parameter wurden in 4 Beobachtungen pro Tag (je zwei Observationen eine Stunde vor bzw. nach Licht-Aus) erhoben und zur Anzahl der gesamt beobachteten Verhaltensparameter sowie zur Anzahl der Tiere pro Käfig in Relation gesetzt (n ist die Anzahl der beobachteten Käfige mit 2-5 Tieren pro Käfig, wobei mehr als die Hälfte der Tiere zumindest eine unilateral verifizierte Injektion erhalten hatten; Mittelwerte \pm SEM; *p < 0,05).

		Anteilige Parameter am Verhaltensspektrum im Heimkäfig (%)	
		lacZ AAV (n = 3)	AVP AAV (n = 3)
vor OP	Kämpfen	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
	Drohen	33,3 \pm 19,2	11,1 \pm 11,1
	Soziales Putzen	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
	<i>rearing</i>	86,1 \pm 43,1	38,9 \pm 20,0
	Schnüffeln	36,1 \pm 21,7	69,4 \pm 19,4
	Graben	8,33 \pm 8,33	0,00 \pm 0,00
	Selbstputzen	114 \pm 19,4	136 \pm 36,1
	Schlafen/Ruhen	22,2 \pm 22,2	30,6 \pm 19,4
	Fressen/Saufen	33,3 \pm 33,3	25,0 \pm 25,0
Woche 1	Kämpfen	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
	Drohen	11,1 \pm 11,1	25,0 \pm 14,4
	Soziales Putzen	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
	<i>rearing</i>	103 \pm 52,8	86,1 \pm 27,4
	Schnüffeln	106 \pm 47,5	125 \pm 38,1
	Graben	0,00 \pm 0,00	8,33 \pm 8,33
	Selbstputzen	80,6 \pm 10,0	94,4 \pm 33,8
	Schlafen/Ruhen	47,2 \pm 13,9	22,2 \pm 22,2
	Fressen/Saufen	30,6 \pm 19,4	27,8 \pm 14,7
Woche 2	Kämpfen	16,7 \pm 16,7	0,00 \pm 0,00
	Drohen	11,1 \pm 11,1	0,00 \pm 0,00
	Soziales Putzen	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
	<i>rearing</i>	111,1 \pm 11,1	88,9 \pm 30,9
	Schnüffeln	83,3 \pm 25,5	69,4 \pm 32,7
	Graben	11,1 \pm 11,1	8,33 \pm 8,33
	Selbstputzen	77,8 \pm 22,2	44,4 \pm 5,55
	Schlafen/Ruhen	52,8 \pm 23,7	153 \pm 23,7 *
	Fressen/Saufen	25,0 \pm 25,0	36,1 \pm 7,34

Manipulation des AVP-Systems in HAB-, LAB- und NAB-Ratten

Woche 3	Kämpfen	22,2 ± 22,2	38,9 ± 20,0
	Drohen	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Soziales Putzen	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	<i>rearing</i>	77,8 ± 22,2	77,8 ± 40,1
	Schnüffeln	61,1 ± 5,55	58,3 ± 22,0
	Graben	11,1 ± 11,1	11,1 ± 11,1
	Selbstputzen	114 ± 19,4	58,3 ± 30,0
	Schlafen/Ruhen	19,4 ± 10,0	61,1 ± 20,0
	Fressen/Saufen	50,0 ± 28,8	94,4 ± 54,0
Woche 4	Kämpfen	66,7 ± 38,5	0,00 ± 0,00
	Drohen	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Soziales Putzen	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	<i>rearing</i>	75,0 ± 26,8	72,2 ± 14,7
	Schnüffeln	47,2 ± 13,9	33,3 ± 33,3
	Graben	44,4 ± 29,4	0,00 ± 0,00
	Selbstputzen	94,4 ± 27,8	97,2 ± 16,9
	Schlafen/Ruhen	33,3 ± 19,2	106 ± 24,2
	Fressen/Saufen	19,4 ± 10,0	83,3 ± 16,7
Woche 5	Kämpfen	38,9 ± 20,0	33,3 ± 33,3
	Drohen	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Soziales Putzen	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	<i>rearing</i>	30,6 ± 2,77	19,4 ± 10,0
	Schnüffeln	19,4 ± 10,0	0,00 ± 0,00
	Graben	30,6 ± 2,77	0,00 ± 0,00
	Selbstputzen	128 ± 30,9	103 ± 40,9
	Schlafen/Ruhen	97,2 ± 85,0	156 ± 55,6
	Fressen/Saufen	44,4 ± 29,4	72,2 ± 14,7
Woche 6	Kämpfen	44,4 ± 22,2	0,00 ± 0,00
	Drohen	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Soziales Putzen	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	<i>rearing</i>	16,7 ± 16,7	30,5 ± 19,4
	Schnüffeln	8,33 ± 8,33	0,00 ± 0,00
	Graben	11,1 ± 11,1	16,7 ± 16,7
	Selbstputzen	75,0 ± 26,8	75,0 ± 43,3
	Schlafen/Ruhen	203 ± 16,9	244 ± 53,0
	Fressen/Saufen	19,4 ± 10,0	25,0 ± 14,4

Woche 7	Kämpfen	77,8 ± 48,4	0,00 ± 0,00
	Drohen	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Soziales Putzen	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	<i>rearing</i>	8,33 ± 8,33	66,7 ± 33,3
	Schnüffeln	11,1 ± 11,1	36,1 ± 7,34
	Graben	38,9 ± 5,55	0,00 ± 0,00
	Selbstputzen	114 ± 32,0	100 ± 57,7
	Schlafen/Ruhen	150 ± 9,62	206 ± 100
	Fressen/Saufen	11,1 ± 11,1	0,00 ± 0,00
Woche 8	Kämpfen	22,2 ± 22,2	16,7 ± 16,7
	Drohen	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Soziales Putzen	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	<i>rearing</i>	30,6 ± 19,4	27,8 ± 14,7
	Schnüffeln	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Graben	22,2 ± 22,2	0,00 ± 0,00
	Selbstputzen	169 ± 2,77	175 ± 14,4
	Schlafen/Ruhen	25,0 ± 25,0	147 ± 65,7 *
	Fressen/Saufen	119 ± 10,0	16,7 ± 16,7 *

Um einen Effekt des AAV über die Zeit hinweg zu detektieren, wurde das Heimkäfing- und Trinkverhalten der Tiere im Wochenrhythmus gemessen. Es zeigten sich marginale Verhaltenseffekte, die auf eine geringe Annäherung AVP AAV-behandelter LABs an den HAB-Phänotyp hindeuteten. Diese waren jedoch nicht beständig zu beobachten. Keinerlei Effekt fand sich im Trinkverhalten der Tiere als Hinweis auf eine vermehrte AVP-Expression bzw. -Sekretion über die magnozellularen Neurone des PVN mit Auswirkung auf die Osmoregulation der Tiere.

Auch in den Verhaltenstests war kein Effekt des AVP AAV festzustellen. Das verminderte *rearing* in der DaLi bei unilateral korrekt injizierten Tieren konnte weder bei der Untersuchung der bilateralen Treffer noch bei gemeinsamer Betrachtung beider Gruppen reproduziert werden. Ebenso wiesen die neuroendokrinen Parameter keinerlei Veränderung auf Grund der viralen Behandlung auf.

Für den von Ideno et al. (2003) verwandten Cytomegalovirus (CMV)-Promotor wurde berichtet, dass er regional wie auch zellspezifisch unterschiedlich abgelesen wird. So zeigten Studien an Hippocampus und Septum, dass die Expression des integrierten Peptids bei Verwendung eines CMV-Promotors weit geringer war als unter einem Neuron-spezifischen Enolase (NSE)-Promotor (Klein et al., 1998). Auch wurde in diesen Untersuchungen eine Zellspezifität der Promotoren gezeigt. Die Injektion des AVP AAV führte in der ISH zu einer weit stärkeren Bindung der AVP ODN-Sonde als bei lacZ-injizierten Tieren; dies könnte jedoch auch die Folge einer Bindung an nicht translatierte virale mRNA sein. Immunhistochemische Studien sollen dies in weiteren Experimenten differenzieren. Auch wäre bei Wiederverfügbarkeit von Zuchttieren die konstitutive Expression des AVP AAV in HAB/LAB-Ratten zu zeigen, wie auch der mögliche Einfluss des septalen AVP-

Systems auf die anxiogene Wirkung des icv-verabreichten AVP im vorhergehenden Projekt. Dazu könnte der AVP AAV – in Inversion des AVP AS-Versuchs (Projekt B 2.1, Abb. 34) – in den BNST appliziert werden. Auch könnte dies zur weiteren Differenzierung von sozialer Gedächtnisleistung und Angstverhalten (entsprechend Projekt B 1.1, Abb. 15) beitragen.

Tabelle 7. Wasseraufnahme von LAB-Ratten, deren PVN mittels viralem Vektor mit AVP bzw. lacZ transfiziert worden war in der 1. bis 7. Woche nach der Operation (n ist die Anzahl der beobachteten Käfige mit 2-5 Tieren pro Käfig, wobei mehr als die Hälfte der Tiere zumindest eine unilateral verifizierte Injektion erhalten hatten; Mittelwerte \pm SEM).

	Trinkmenge (ml / 3 Tage)	
	lacZ AAV (n = 3)	AVP AAV (n = 3)
Woche 1	27,6 \pm 1,92	32,9 \pm 3,49
Woche 2	28,7 \pm 2,29	30,8 \pm 3,33
Woche 3	25,6 \pm 1,36	28,8 \pm 1,52
Woche 4	28,1 \pm 1,63	30,8 \pm 2,27
Woche 5	27,7 \pm 1,78	30,0 \pm 2,79
Woche 6	29,9 \pm 2,58	28,3 \pm 1,54
Woche 7	28,6 \pm 2,35	29,5 \pm 2,45

Die Manipulation des AVP-Systems von HAB-Ratten zeigte, dass die selektive Reduktion von AVP durch AS sowohl im lateralen Septum als auch im PVN einen anxiolytischen Effekt auf hyperängstliche Tiere hatte (Projekte B 1.1 und 2.1, Abb. 28 und 34). Auch zeigte die icv-Applikation von AVP dessen anxiogene Wirkung in LABs (Projekt 2.2, Abb. 36). Jedoch hatte die Injektion eines AVP AAV in den PVN insbesondere keinerlei Effekt auf Angstverhalten und neuroendokrine Parameter. Damit war diese Art der Manipulation des AVP-Systems von hochselektierten, hyperängstlichen Tieren nicht ausreichend, um einen den HAB-Ratten entsprechenden pathogenen Zustand herbeizuführen.

C. Zuchtprojekte

1. Zucht transgener HAB/LAB-Ratten durch *backcrossing*

Psychiatrische Erkrankungen weisen eine starke genetische Komponente auf. Wie einleitend beschrieben, haben Angehörige ihrem Verwandtschaftsgrad entsprechend ein mehr oder weniger hohes Erkrankungsrisiko. So ist die Lebenszeitprävalenz einer psychiatrischen Störung für unmittelbar Verwandte gegenüber der Kontrollbevölkerung durchschnittlich bis zum 5-fachen erhöht, was auch für monozygote gegenüber dizygoten Zwillingen berichtet wird (Merikangas und Low, 2005).

Dass auch das Angstverhalten von HAB- und LAB-Ratten eine starke genetische Prädisposition aufweist, die im AVP-Gen manifestiert sein könnte, wurde mehrfach gezeigt (Wigger et al., 2001; Landgraf und Wigger, 2003; Murgatroyd et al., 2004). Wie in dieser Arbeit dargelegt (Projekte B 1.1 und 2.1, Abb. 28 und 34) hatte die invasive Veränderung des AVP-Systems, insbesondere mittels AS, einen deutlichen verhaltensbiologischen Effekt in den Zuchttieren. Nun galt es, *in vivo* den quantitativen Einfluss der in HABs ermittelten Mutation(en) im AVP-Gen bzw. seines Promotors (Murgatroyd et al., 2004) auf sowohl Verhaltensparameter, neuroendokrine Faktoren als auch auf das AVP-Expressionsprofil zu studieren. Um dieses Gen vom restlichen HAB- bzw. LAB-Genom abzuheben, sollten transgene Tiere erzeugt werden, die ein LAB-Genom aufwiesen, aber das HAB-AVP-Allel (incl. Promotorregion) in sich trugen und *vice versa* für das HAB-Genom.

Die Manipulation des Maus-Genoms zur Generierung selektiver *knockout*- bzw. *knockin*-Tiere hat sich im letzten Jahrzehnt zu einem Standardverfahren etabliert. Auch für Ratten existieren viele der Maus vergleichbare Techniken zur gentechnischen Erzeugung transgener Tiere, die jedoch weit weniger standardisiert, weitaus komplexer und ineffizienter sind (Tesson et al., 2005). Zum Startzeitpunkt dieses Projekts (Januar 2003) waren weder das Rattengenom entschlüsselt (Gibbs et al., 2004; Zimdahl et al., 2004) noch Techniken zur standardmäßigen Transmutation etabliert. Daher sollten transgene Ratten mittels eines auf klassischen Zuchtmethoden basierenden Zuchtschemas unter einem hypothesengeleiteten Ansatz erzeugt werden.

Ausgangspunkt waren 11 Generationen ingezüchteter HAB/LAB-Ratten und das in diesen Tieren homozygote Vorhandensein des Wildtyp- bzw. mutierten Allels bezüglich des SNPs im AVP-Gen (Abb. 37; Murgatroyd et al., 2004). Aus diesen Tieren sollten *congenic strains*, d. h. gngleiche Tiere bezüglich des AVP-Gens mit einerseits HAB-genomischem und andererseits LAB-genomischem Hintergrund gezüchtet werden.

Zur Erzeugung von *congenic strains* gibt es mehrere klassische Zuchtmethoden (Flaherty, 1981). Unter der Voraussetzung eines verfolgbaren genetischen Markers für ein kurzes chromosomales Segment bzw. das zu selektierende Allel ist eine der als am einfachsten beschriebenen Methoden das sog. *backcrossing* (BC)-Schema. Dazu werden die homozygoten Ausgangslinien zu einer F1-Generation kreuzverpaart. Weibliche Nachkommen aus dieser Generation werden mit einem

Männchen der jeweiligen Ausgangslinien verpaart. In den Folgegenerationen wird entsprechend verfahren, indem heterozygote Weibchen bezüglich des untersuchten Allels mit Männchen der entsprechenden väterlichen Linie verpaart werden.

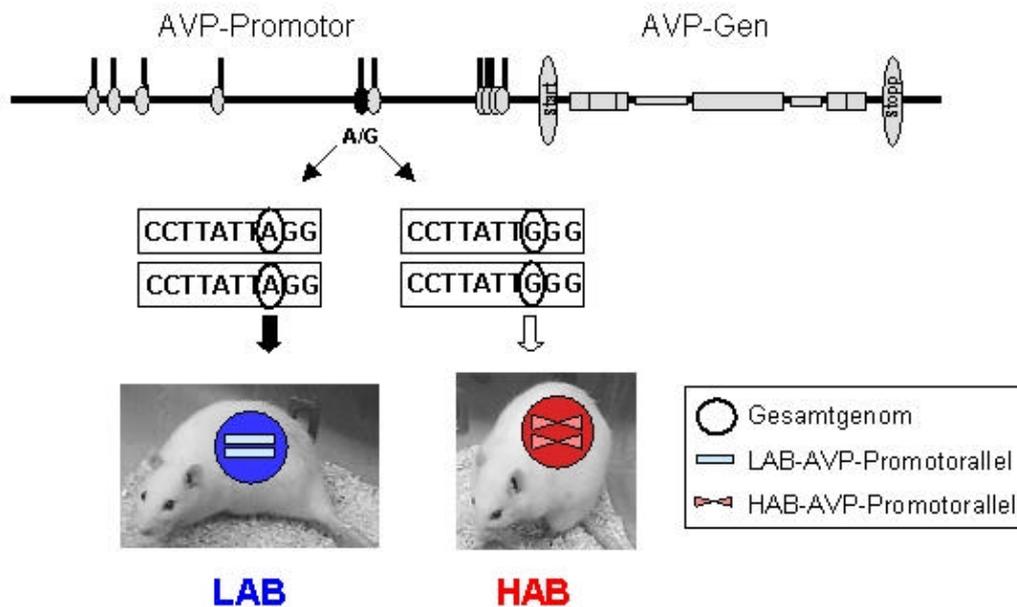


Abbildung 37. Schematische Darstellung der *single nucleotide*-Polymorphismen im AVP-Gen sowie dessen Promotorregion. HAB-Ratten weisen im Polymorphismus A(-1276)G eine Mutation gegenüber LAB- und NAB-Ratten auf (Murgatroyd et al., 2004).

Bei diesem Verfahren sollte in jeder Generation jeweils die Hälfte des mütterlichen Genoms durch väterliches ersetzt werden, mit Ausnahme des betreffenden Allels und mit diesem in Kopplungsungleichgewicht stehenden Regionen (Bennett und Johnson, 1998). Dies beruht einerseits auf der freien Segregation der Chromosomen sowie homologe Rekombination (*crossing-over*) in der Meiose, die zur Weitergabe kleiner, selektierter Gensequenzen unabhängig vom Gesamtgenom führt. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Genen der nicht-väterlichen Linie ist damit bei nicht-verlinkten Genen $(1-0,5)^{n-1}$ mit n als Anzahl der BC-Generationen beginnend mit der F1-Generation (Flaherty, 1981).

Damit sollten bereits nach 5 Generationen von BC aus kreuzgezüchteten HAB/LAB-Tieren transgene Ratten entstanden sein, deren Gesamtgenome zu 93,75 % denen einer HAB- bzw. LAB-Ratte entsprechen, die jedoch heterozygot sowohl das HAB- als auch LAB-AVP-Allel in sich tragen. Diese Ratten sollten schließlich geschwisterverpaart werden, so dass letztlich homozygot transgene Tiere vorliegen, die weitgehend ein LAB-Genom aufweisen, aber das HAB-AVP-Promotorallel tragen und *vice versa* für HAB-Ratten. Um das Ausmaß des genetischen Einflusses der Mutation im HAB-AVP-Allel abschätzen zu können, sollten diese in einer Reihe von Verhaltenstests, neuroendokrinologisch sowie bezüglich ihrer AVP-Expression untersucht werden.

Durch die Geschwisterverpaarung in der letzten BC-Generation entstanden einerseits, wie beschrieben, homozygote Tiere mit inversen AVP-Allelen, heterozygote sowie homozygote Tiere mit den dem genomischen Hintergrund entsprechenden AVP-Allelen erzeugt werden. Diese sollen als interne Kontrollen der genetischen Prädisposition in der letzten Generation gelten.

Als weitere Kontrollen wurden gleichzeitig Tiere entsprechend der HAB/LAB-Standard-Zucht gezüchtet, die jedoch nicht auf Grund ihres EPM-Verhaltens, sondern nur nach ihrem Genotyp selektiert wurden (*random controls*, RC).

Versuchsplan

Zu Beginn des Projekts wurden jeweils 4 homozygote HAB- und LAB-Tiere (je 2 Weibchen bzw. Männchen) kreuzgepaart. Die F1-Generation wurde auf der EPM und im FS-Test phänotypisch charakterisiert. Die Heterozygotie bezüglich des AVP-Promotorallels der F1-Tiere wurde durch die genetische Analyse einer ausgewählten Teilpopulation nachgewiesen (C. Murgatroyd, unveröffentlicht). Aus dieser heterozygoten F1-Generation wurden jeweils 2 HAB/LAB-Weibchen (HAB-Mutter, LAB-Vater) bzw. 2 LAB/HAB-Weibchen (LAB-Mutter, HAB-Vater) mit einem HAB- oder LAB-Männchen gepaart (*backcrossing*; Abb. 38), so dass sich folgende vier Konstellationen ergaben: BC_HAB-Linie: HAB/LAB x HAB und LAB/HAB x HAB bzw. BC_LAB-Linie: HAB/LAB x LAB und LAB/HAB x LAB.

Als Väter dienten in allen Generationen die Paarungsmännchen der parallel laufenden Standard-HAB/LAB-Zucht, die somit alle Kriterien der jeweiligen Linienzugehörigkeit erfüllten.

Da es nicht gänzlich auszuschließen war, dass maternale Effekt-Gene oder oozytale Determinanten einen Einfluss auf den Phänotyp haben, wurden die Nachkommen der vier Ausgangspaarungen in jeweils separaten Familien weitergeführt.

Die Genotypisierung aller weiblichen Jungtiere sowie der männlichen Jungtiere jeder 2. Generation erfolgte am Tag der Trennung von der Mutter (21 Tage postnatal) durch die Abnahme von Schwanzspitzengewebe.

Um das HAB-Allel in der BC_LAB-Linie bzw. das LAB-Allel in der BC_HAB-Linie zu erhalten, wurden zur Weiterzucht jeweils heterozygote Weibchen gewählt.

Im Alter von 10 Wochen wurden die weiblichen Tiere aller Generationen und zusätzlich die Männchen jeder 2. Generation der Standard-EPM-Testung unterzogen.

Das Resultat der EPM-Testung hatte jedoch keinen Einfluss auf die Auswahl der BC-Zuchttiere für die Weiterzucht, sondern galt nur der Verfolgung einer eventuellen Veränderung des Phänotyps. Somit sollte die Erzeugung eines HAB/LAB-ähnlichen Phänotyps vermieden werden, der nicht rein auf der genetischen Prädisposition beruhte, sondern Folge einer verhaltensbiologischen Selektion gewesen wäre.

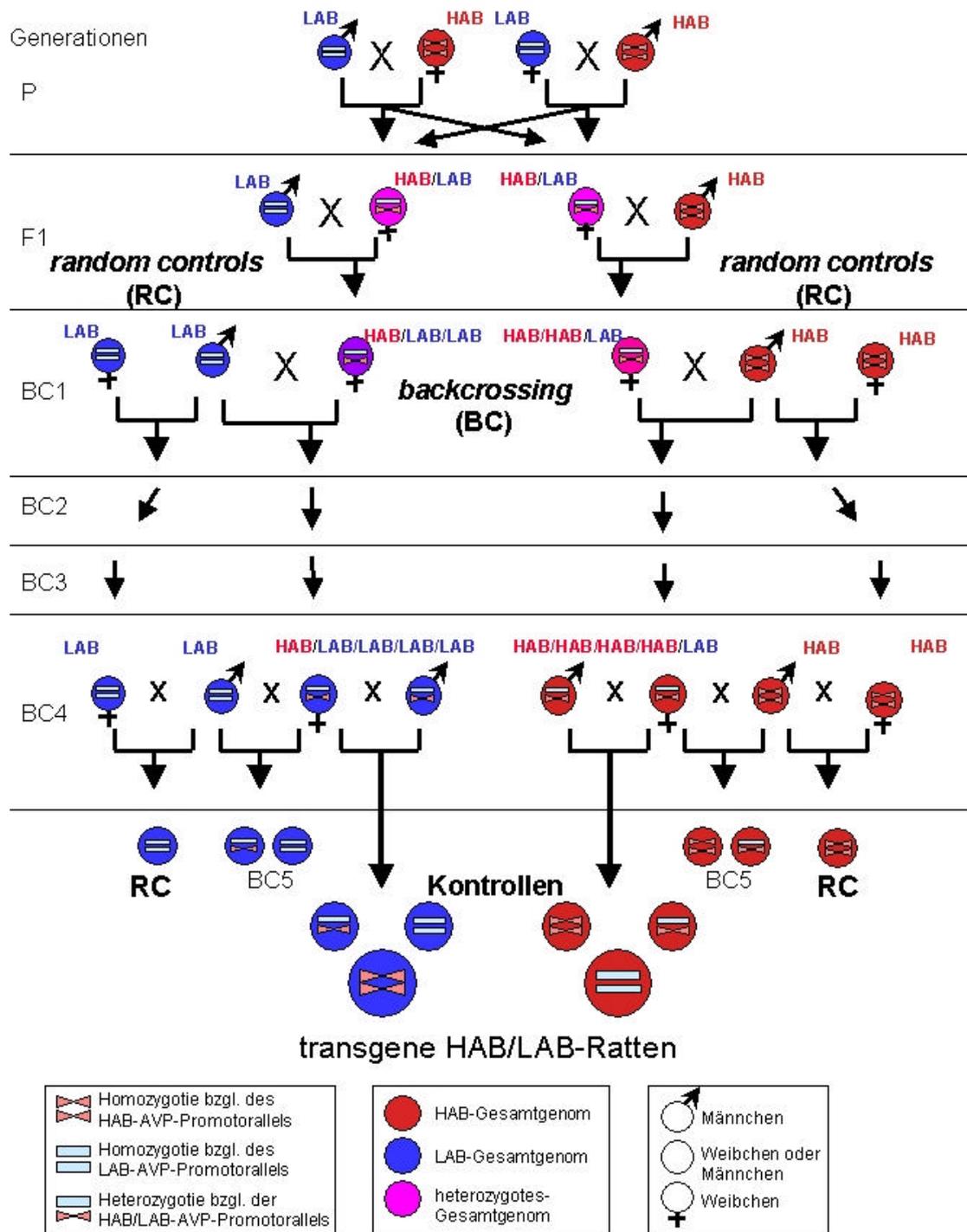


Abbildung 38. Schematische Abbildung des *backcrossing*-Zuchtschemas. Ausgehend von HAB- und LAB-Ratten wurde eine kreuzgepaarte F1-Generation erzeugt. Durch Rückkreuzung (*backcrossing*, BC) von bezüglich des Wildtyp- bzw. mutierten AVP-Promotorallels heterozygoten Weibchen jeder Generation mit HAB- bzw. LAB-Vätern wurden beide Allele unabhängig vom genomischen Hintergrund erhalten. Parallel dazu wurden Kontrolltiere der HAB/LAB-Zucht entsprechend gezüchtet (*random controls*, RC, Details dazu in der Projektbeschreibung). Von der 4. Generation ausgehend wurden neben einer 5. *backcrossing*-Generation (BC5) durch strenge Geschwisterverpaarung heterozygoter Tiere transgene Ratten bezüglich des AVP-Promotorallels erzeugt. Als Kontrollen dienten deren nicht transgene Geschwister und Tiere mit homozygoten Eltern aus der 4. Generation (nicht abgebildet).

Als Kontrollen wurden parallel dazu nach demselben Zeit- und Versuchsschema RC-Ratten gezüchtet (HAB-Linie: RC_HAB, LAB-Linie: RC_LAB). Die Ausgangstiere waren dabei homozygote HAB- bzw. LAB-Ratten der Standard-Zucht. Ebenso wie die BC-Tiere wurden die Ratten zur Weiterzucht nicht auf Grund ihres Phänotyps, sondern randomisiert zur Paarung ausgewählt. Auch für diese Linien wurden die gewählten weiblichen Nachkommen jeweils mit denselben, aber liniengleichen Vätern der BC-Tiere verpaart.

In der 5. Generation sollten heterozygote BCs, sofern sie einen väterlichen Phänotyp aufwiesen als Hinweis auf ein weitgehend väterliches Genom, geschwisterverpaart werden. Damit sollten die Nachkommen in beiden Linien zu einem Viertel jeweils homozygot für das HAB- bzw. LAB-AVP-Allel sein sowie zur Hälfte heterozygot bezüglich der beiden Allele. Heterozygote sowie homozygote Nachkommen, die die Allele der väterlichen Linie aufwiesen, sollten als geschwisterinterne Kontrolle dienen. Als weitere Kontrolle sollten in dieser letzten Generation ebenfalls homozygote BCs verpaart werden, die den rein väterlichen Genotyp aufwiesen (BC_HAB-Linie: C_HAB, BC_LAB-Linie: C_LAB).

Alle Tiere der geschwisterverpaarten Generation sowie der parallel weitergeführten BC-Zucht wurden schließlich in einer Testreihe auf Veränderungen des Verhaltens und der neuroendokrinen Parameter untersucht. Zunächst wurden die Jungtiere 11 Tage nach der Geburt dem USV-Test unterzogen. In der 10. Woche wurden die Tiere der EPM und am darauffolgenden Tag dem FS exponiert. Eine Woche später durchliefen sie den DaLi-Test und eine weitere Woche darauf die EPF-Exposition. Unmittelbar im Anschluss daran wurden die Tiere unter letaler Halothannarkose dekapitiert, Blut zur Bestimmung der HPA-Achsen-Aktivität gewonnen sowie die Gehirne für die Untersuchung des Expressionsprofils der AVP mRNA im PVN mittels ISH entnommen. Die genetische Analyse erfolgte aus bei der Dekapitation gewonnenem Schwanzgewebe.

Ergebnisse

1. bis 5. BC-Generation

Die Elterntiere der 1. BC-Generation (BC1) wurden der kreuzverpaarten F1-Generation des F2-Projekts entnommen (zu deren Phänotypisierung siehe Zuchtprojekte C 2). Pro HAB/LAB-Parentalpaar wurde eine Tochter zufällig aus der F1-Generation ausgewählt. Diese Tiere waren gegenüber ihren Schwestern in der F1-Generation durchschnittlich ängstlicher auf der EPM, aber entsprechend ihrem heterozygoten Genotyp intermediär im FS-Test (Tabelle 8). Die Genotypen spalteten sich in allen 5 BC-Generationen annähernd im Verhältnis 1:1 auf. Die Untersuchung der 2., 4. und 5. RC-Generation ergab stets einen reinen HAB- bzw. LAB-Genotyp der Kontrolltiere (Abb. 40). Sofern pro Familie ein weibliches heterozygoten Tier zur Weiterzucht identifiziert war, wurden auf Grund technischer Probleme fehlende Genotypen nicht in einem 2. Ansatz ergänzt. Wegen begrenzter Haltungskapazität wurde in Generation 1 und 2 nur ein Weibchen pro Familie zur Weiterzucht herangezogen. Daraus resultierten pro Generation, Linie und Genotyp relativ geringe

Individuenzahlen. Nach der 2. Generation musste infolge von Zuchtproblemen auf das Weiterführen von zwei BC-Familien (LAB/HAB x HAB und HAB/LAB x LAB; Abb. 39) und jeweils einer RC-Familie pro Linie verzichtet werden. Im Weiteren wurden daher mehrere Weibchen pro Generation weiterverpaart und bei gegebenem Zuchterfolg eine zufällig gewählte Familie weitergeführt.



Abbildung 39. Überblick über den Stammbaum der *backcrossing*-Zucht. Durch Zuchtprobleme mussten zwei Familien sowohl der *backcrossing*-Tiere als auch der Kontrollen (*random controls*, RC) aufgegeben werden. Zur Erzeugung homozygot transgener Ratten wurden aus der 4. Generation heraus Geschwisterverpaarungen vorgenommen. Als Kontrollen dienten deren nicht transgene Geschwister und Tiere mit homozygoten Eltern aus der 4. Generation sowie geschwisterverpaarte RC-Tiere.

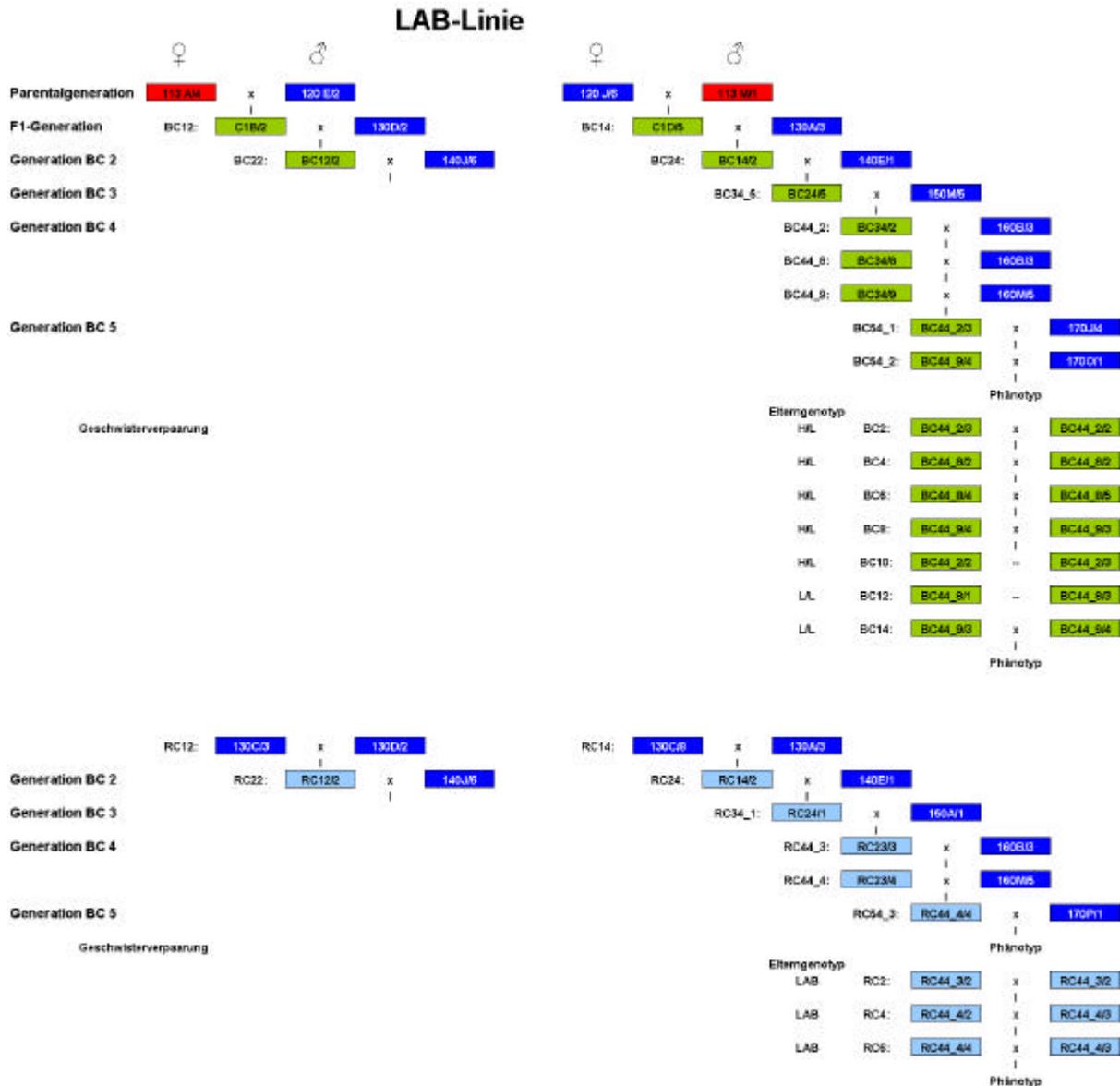


Abbildung 39

In allen Generationen mit Ausnahme der 3. Generation zeigte sich im Angstverhalten in den unabhängig von der EPM-Testung gezüchteten, aber reinerbigen weiblichen RCs der erwartete HAB/LAB-Unterschied. RC_HABs waren durchschnittlich 5 - 12 %, RC_LABs 32 - 55 % der Testdauer auf den OA der EPM (Abb. 41).

Im Weiteren wird folgende Nomenklatur in Bezug auf das AVP-Allel verwandt:

- H_HAB: für das HAB-Allel homozygote Tiere der BC_HAB-Linie
- H_LAB: für das HAB-Allel homozygot transgene Tiere der BC_LAB-Linie
- h_HAB: heterozygote Tiere der BC_HAB-Linie
- h_LAB: heterozygote Tiere der BC_LAB-Linie
- L_HAB: für das LAB-Allel homozygot transgene Tiere der BC_HAB-Linie
- L_LAB: für das LAB-Allel homozygote Tiere der BC_LAB-Linie

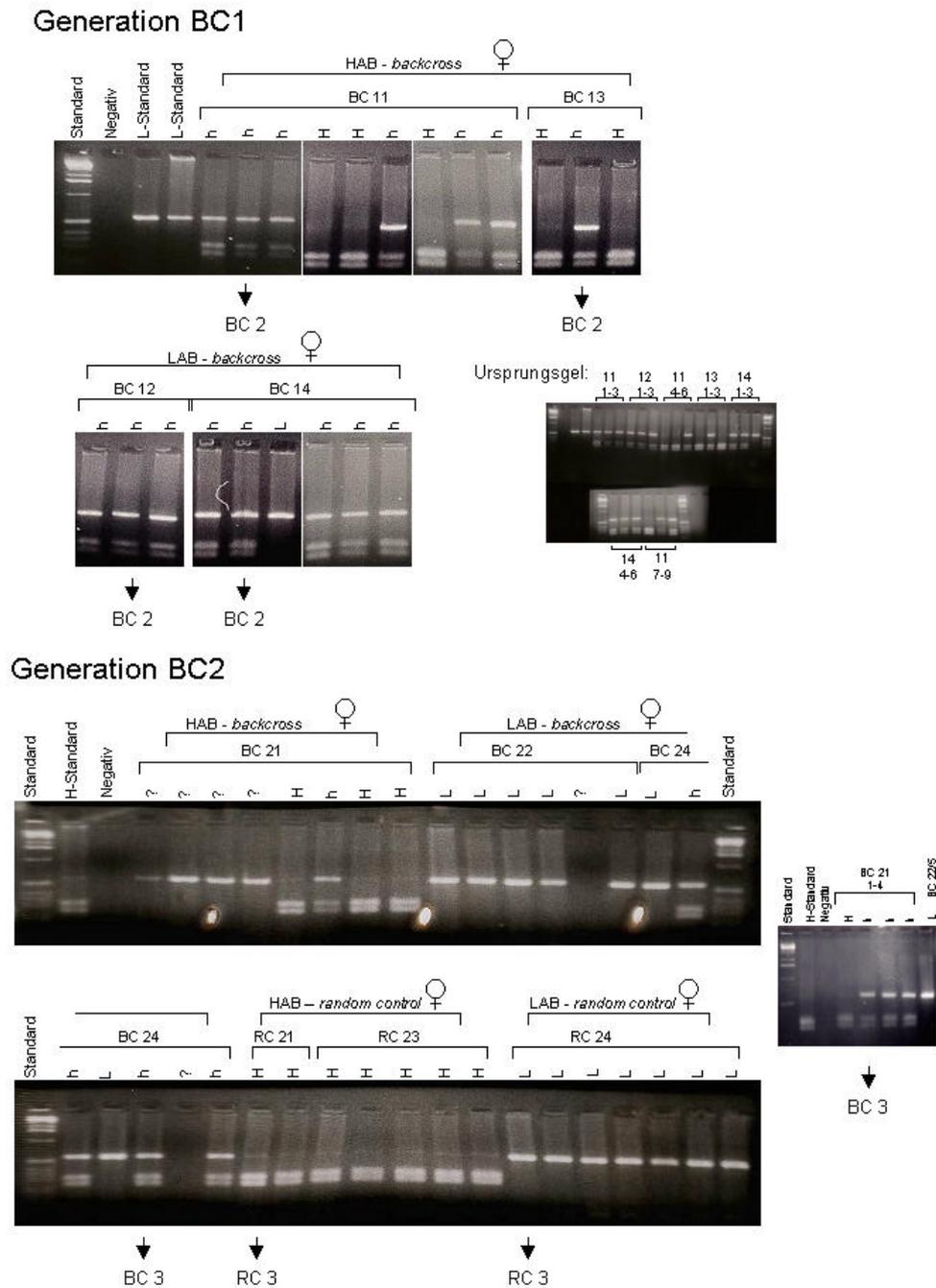


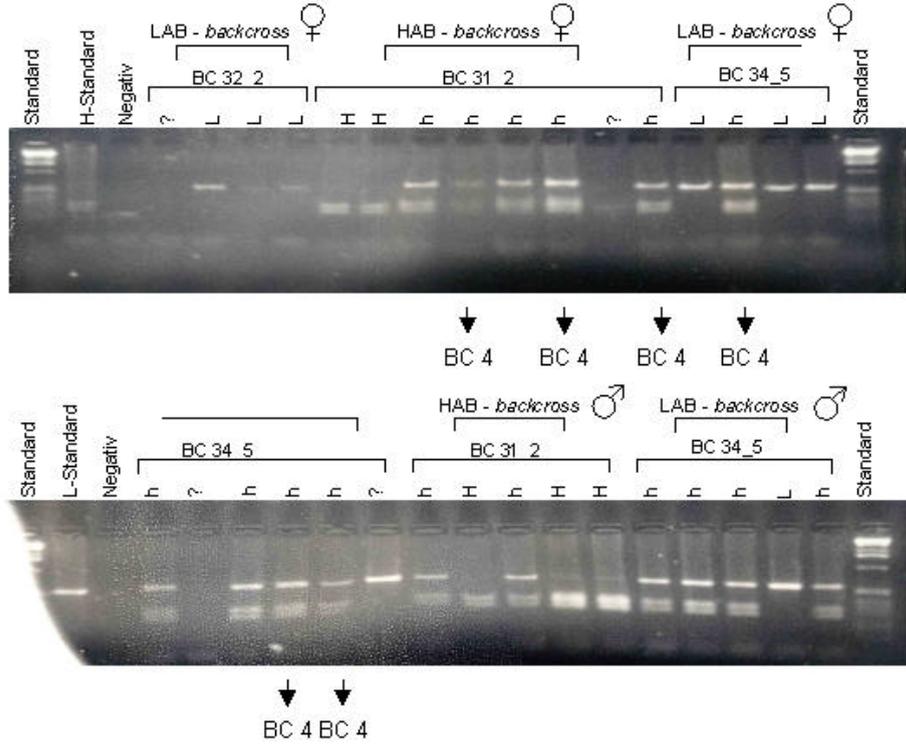
Abbildung 40. Gelelektrophoretische Auftrennung von Genfragmenten zur Bestimmung des Genotyps der *backcrossing*-Zucht bezüglich des AVP-Promotorallels (Abb. 14). Gezeigt sind die Ergebnisse der Generationen 1 bis 4. Das Vorliegen von Homozygotie bezüglich des LAB-AVP-Promotorallels ist durch das Auftreten nur einer Bande ersichtlich.

Bei Vorliegen von Homozygotie bezüglich des HAB-AVP-Promotorallels trennen sich zwei durch ein selektives Restriktionsenzym zerteilte, kürzere Genfragmente auf.

Bei heterozygoten Tieren lassen sich dementsprechend drei Banden identifizieren.

Als Kontrollen dienen leere Negativ-Proben sowie Standard-HAB-DNA (H-Standard) und Standard-LAB-DNA (L-Standard). Mit Pfeil gekennzeichnet sind die für die Weiterverpaarung zufällig gewählten, heterozygoten Weibchen. In Generation 4 wurden Tiere für die Weiterzucht gewählt (BC 5), sowie zur Geschwisterverpaarung von heterozygoten Ratten zur Erzeugung transgener Tiere (HET) bzw. homozygoter Ratten als interne Kontrollen (C). Auch wurden *random control* (RC)-Ratten als Referenzgeschwisterverpaart.

Generation BC3



Generation BC4

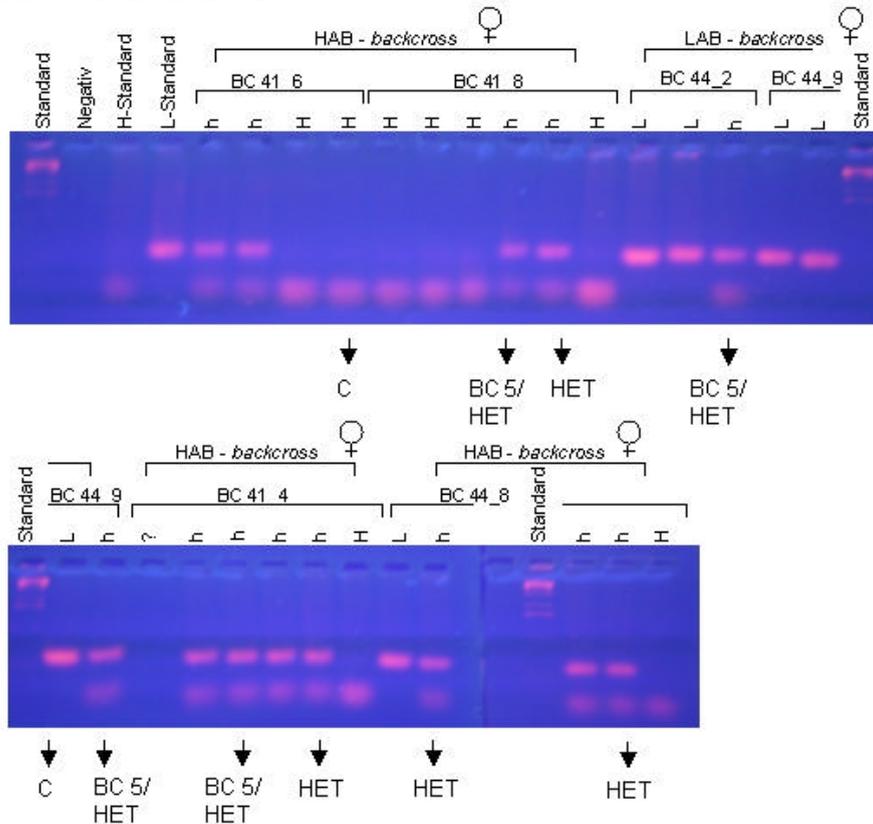


Abbildung 40 Fortsetzung.

Generation BC4

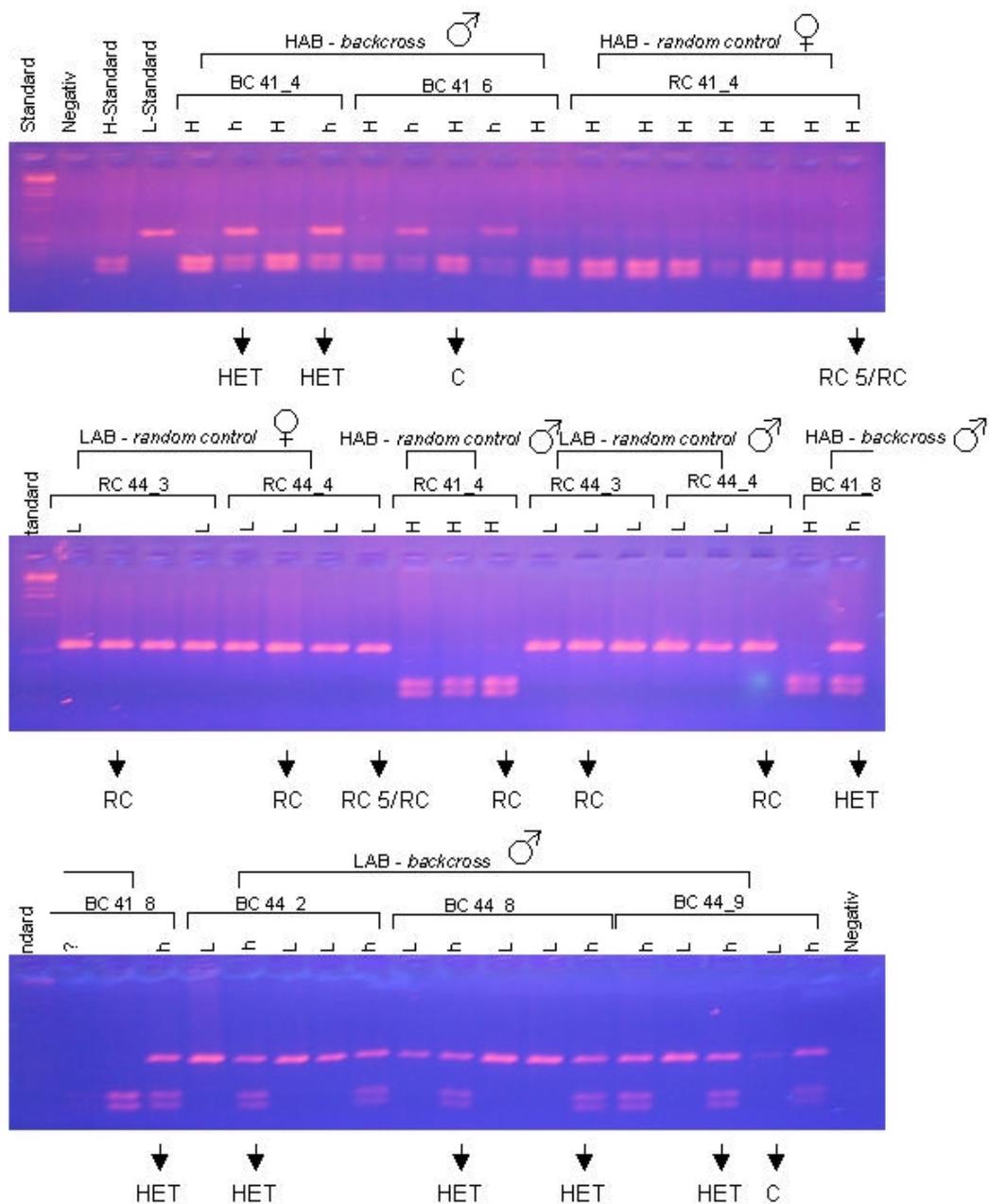


Abbildung 40 Fortsetzung.

In Generation 1 waren die BC-Ratten nicht untereinander oder von RC_HABs verschieden, aber von RC_LABs. In Generation 2 zeigte sich ein ähnliches Bild, wobei h_LABs zusätzlich von RC_HABs verschieden waren, nicht aber h_LABs und L_LABs von RC_LABs. In Generation 3 waren keine Unterschiede der jeweiligen Linie zu ihren Kontrollen festzustellen und h_HABs waren signifikant ängstlicher als h_LABs und L_LABs.

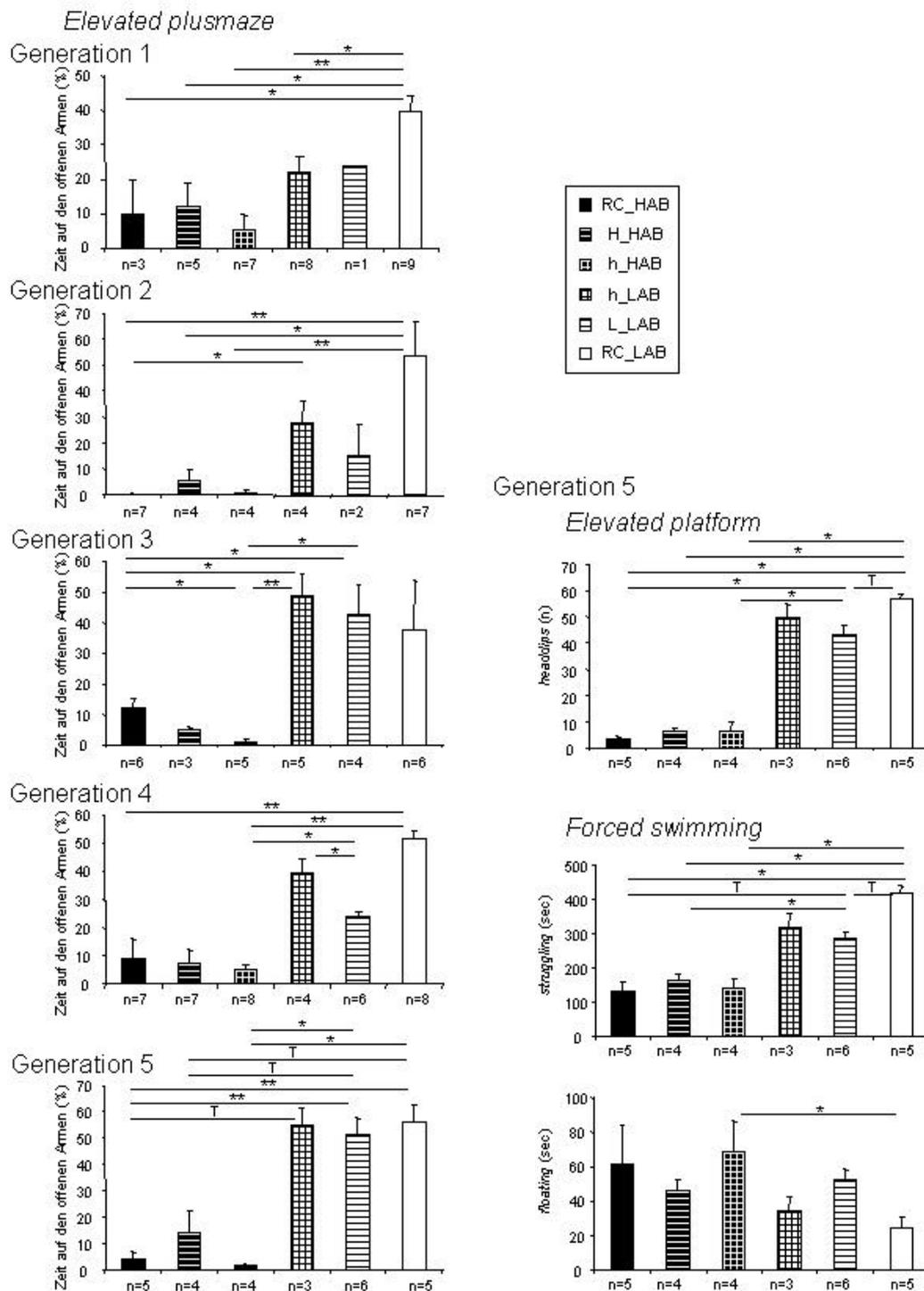


Abbildung 41. *Elevated plusmaze*-Test an den Weibchen der 1. bis 5. *backcrossing* (BC)-Generation sowie weitere Charakterisierung der 5. Generation.

Die Gruppen wurden nach Genotyp und väterlicher Linie unterschieden (Details dazu in der Projektbeschreibung). Als Referenzen dienten rein nach dem Genotyp selektiert und gezüchtete HAB/LAB-Ratten (RC). H homozygot bzgl. HAB-AVP-Promotorallel, L homozygot bzgl. LAB-AVP-Promotorallel, h heterozygot (Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, † $p < 0,1$)

In Generation 4 zeigten sich ähnliche Ergebnisse mit deutlichen Unterschieden zwischen der BC_HAB- und der BC_LAB-Linie, allerdings mit etwas ängstlicheren L_LABs. In Generation 5 waren die Kontrollen nicht von den linienzugehörigen BC-Ratten zu unterscheiden, während sie sich von den jeweils nicht-linienzugehörigen Kontrolltieren signifikant bzw. tendenziell unterschieden.

Tabelle 8. Verhalten der zufällig aus der F1-Generation entnommenen Weibchen als Mütter für die 1. BC-Generation. Die 4 gewählten Ratten verbrachten im Durchschnitt weniger %Zeit auf den OA der EPM als alle F1-Weibchen (** p < 0,01).

	Zeit auf den OA (%)	<i>struggling</i> (sec)	<i>floating</i> (sec)
LAB/HAB-Weibchen	0,00	71,4	185
LAB/HAB-Weibchen	0,00	108	60,4
HAB/LAB-Weibchen	2,68	77,8	31,0
HAB/LAB-Weibchen	1,50	117	41,4
Alle F1-Weibchen (Mittelwert ± SEM)	15,4 ± 3,36 **	91,2 ± 5,08	57,7 ± 9,07

Geschwisterverpaarung aus der 4. BC-Generation

Da sich das Angstverhalten auf der EPM in der 4. Generation deutlich dem Verhalten der jeweiligen Kontrollgruppe angenähert hatte, konnte nun eine Geschwisterverpaarung durchgeführt werden, um den Einfluss eines homozygot vorliegenden HAB- bzw. LAB-AVP-Allels zu verfolgen.

Aus der 4. BC-Generation heraus wurden untereinander einerseits heterozygote und andererseits homozygote Geschwister bezüglich des jeweiligen AVP-Allels sowie RC-Geschwister untereinander verpaart.

Auf Grund unerklärlich hoher Letalität der trächtigen Muttertiere, konnten nur 4 Würfe pro heterozygoter BC-Linie, ein Wurf pro homozygoter BC-Linie sowie zwei Würfe pro RC-Linie genotypisch charakterisiert werden.

Die Verpaarung der heterozygoten Tiere resultierte annähernd in einer Aufspaltung der Genotypen im Verhältnis 1:2:1 (HH: 1,25; LH: 1,67; LL: 1,07).

Der Vergleich der Genotypen der heterozygoten Geschwisterpaar-Nachkommen unabhängig von der väterlichen Linie ergab ohne Berücksichtigung des Geschlechts tendenzielle Unterschiede im Parameter Anzahl der USV und *struggling*-Dauer. Im einzelnen unterschieden sich homozygote HAB-Allel-Träger (HH) von den homozygoten LAB-Allel-Trägern (LL) tendenziell in diesen beiden Parametern, wobei HHs mehr vokalisiert, allerdings auch eine längere Zeit mit *struggling* verbrachten. Die Betrachtung der ausschließlich männlichen Nachkommen zeigte, dass diese sich ebenfalls im Parameter Anzahl der USV sowie tendenziell in der %Zeit auf der EPM unterschieden. Diese Unterschiede fanden sich im Vergleich von sowohl männlichen HHs mit LLs als auch für die Anzahl der USV der HHs mit den heterozygoten (HL) Männchen. HH-Männchen verbrachten weniger %Zeit auf den OA der EPM als LLs und vokalisiert mehr als die beiden anderen Gruppen.

Weibchen zeigten Unterschiede im CORT-Gehalt sowie tendenzielle Einflüsse des Genotyps auf die Zeit im hellen Areal der DaLi. HH-Weibchen wiesen einen höheren CORT-Gehalt auf und verbrachten mehr Zeit im hellen Bereich der DaLi als LL-Weibchen (Daten nicht im einzelnen aufgeführt).

Sofern sich Unterschiede zwischen den Geschlechtern zeigten, wurden die jeweiligen Parameter unter Berücksichtigung des Geschlechts analysiert. Dies war der Fall bei der Anzahl der *headdips* bei C_LABs, der Dauer im hellen Areal der DaLi der L_LABs und H_LABs, der *struggling*-Dauer der h_LABs, der *floating*-Latenz der h_HABs, beim CORT-Gehalt der H_LABs, h_LABs, L_LABs, C_HABs und RC_LABs, der Lokomotion auf der EPM bei RC_LABs, dem Adultgewicht der H_LABs, h_LABs, L_LABs, C_LABs, RC_HABs und RC_LABs und der Linienübertretungen in der DaLi bei H_LABs, h_LABs, L_LABs und RC_LABs (Tabelle 9).

Die Untersuchung ausschließlich dieser Parameter für angegebene Tiergruppen getrennt nach Geschlecht der Ratten ergab, dass bei den Weibchen die H_LABs und L_LABs tendenziell mehr Zeit im Hellen verbrachten als C_HABs und RC_HABs, die *struggling*-Dauer der h_LABs tendenziell länger war als von h_HABs sowie die *floating*-Latenz der h_HABs kürzer als die von RC_LABs. Der CORT-Gehalt von L_HABs, h_HABs und C_LABs war gegenüber H_LABs, h_LABs und RC_LABs erniedrigt. Die Lokomotion auf der DaLi war in H_LABs tendenziell niedriger als in C_HABs. Keine Unterschiede fanden sich im Adultgewicht.

Bei Männchen zeigte sich in jenen Parametern, dass C_LABs mehr *headdips* aufwiesen als H_HABs, h_HABs, C_HABs und RC_HABs. Des Weiteren war die *struggling*-Dauer in h_LABs gegenüber RC_LABs erniedrigt. Der CORT-Gehalt von h_HABs sowie C_LABs war niedriger gegenüber allen BC_LABs sowie RC_LAB. Erhöht war die Plasmakonzentration in RC_HABs gegenüber h_HABs, h_LABs und den LAB-Kontrollen. Während die Lokomotion in der DaLi keine Unterschiede aufwies, war das Adultgewicht von C_HABs höher als das von h_LABs, L_LABs und RC_HABs, das wiederum niedriger war als das von RC_LABs.

Die Betrachtung aller Parameter unabhängig vom Geschlecht ergab, dass die Linienzugehörigkeit, nicht aber die Genotypen einen Einfluss auf das Angstverhalten der adulten Ratten hatten (Abb. 42). So verbrachten H_LABs, h_LABs und L_LABs sowie die LAB-Kontrollen eine deutlich längere %Zeit auf den OA der EPM als H_HABs, h_HABs, L_HABs und die HAB-Kontrollen. Zwischen den heterozygoten Geschwisterpaar-Nachkommen einer Linie und den zugehörigen Kontrollen fanden sich keine Unterschiede (außer zwischen h_HABs und C_HABs).

Dasselbe Resultat zeigte sich bei der Anzahl der *headdips*. H_HABs, h_HABs, L_HABs und die HAB-Kontrollen zeigten deutlich weniger *headdips* als H_LABs, h_LABs und L_LABs sowie die LAB-Kontrollen (nur zwischen L_LABs und H_HABs war der Unterschied nicht signifikant). Wieder waren Kontrollen von den heterozygoten Geschwisterpaar-Nachkommen der jeweiligen Linie nicht zu unterscheiden.

Tabelle 9. Gruppengröße und Verhalten von durch *backcrossing* (BC) erzeugten, transgenen Ratten (BC_HAB-Linie: L_HAB; BC_LAB-Linie: H_LAB) bzw. ihrer nicht transgenen Geschwister (BC_HAB-Linie: H_HAB, h_HAB; BC_LAB-Linie: h_LAB; L_LAB). Als Kontrollen dienten Tiere mit homozygoten Eltern aus der 4. Generation (C) und HAB/LAB-Zuchtkontrollen (RC) (Signifikanzen und Tendenzen sind in Bezug auf die den in der Tabelle den Gruppen zugeordneten Buchstaben angegeben; Großbuchstaben für $p < 0,01$, Kleinbuchstaben für $p < 0,05$, T-Zusatz $p < 0,1$).

	BC_HAB		
	H_HAB (A)	h_HAB (B)	L_HAB (C)
Weibchen und Männchen (n)	7	1	6
Anzahl AVP ISH	6	0	3
<i>headdips</i> (n)	3,67 ± 0,76	3,40 ± 0,58 ^h	2,00 ± 1,03 ^k
DaLi-im Hellen (sec)	29,6 ± 14,2	58,2 ± 10,31	31,8 ± 17,7
<i>struggling</i> (sec)	124 ± 9,10	115 ± 4,14	133 ± 13,2
<i>floating</i> -Latenz (sec)	102 ± 9,95	103 ± 6,93 ^l	125 ± 20,6
Lokomotion EPM (n)	3,71 ± 0,71 ^l	5,09 ± 0,9	4,00 ± 0,68 ^{IT}
Weibchen (n)	2	6	4
Anzahl AVP ISH	1	0	1
<i>headdips</i> (n)	1,00 ± 0,00	2,80 ± 0,73	2,50 ± 1,55
DaLi-im Hellen (sec)	71,3 ± 11,7	74,3 ± 11,5	47,8 ± 23,0
<i>struggling</i> (sec)	130 ± 4,60	99,1 ± 15,6 ^{eT}	132 ± 20,6
<i>floating</i> -Latenz (sec)	76,1 ± 7,80	90,0 ± 5,31 ^j	95,4 ± 12,0
Lokomotion EPM (n)	3,00 ± 1,00	5,67 ± 1,45	4,50 ± 0,87 ^{IT}
Männchen (n)	5	5	2
Anzahl AVP ISH	5	0	2
<i>headdips</i> (n)	4,20 ± 0,66 ^k	4,00 ± 0,89 ^k	1,00 ± 0,00
DaLi-im Hellen (sec)	12,9 ± 12,9	39,0 ± 14,7	0,00 ± 0,00
<i>struggling</i> (sec)	121 ± 12,9	134 ± 23,8	135 ± 7,55
<i>floating</i> -Latenz (sec)	113 ± 10,2	119 ± 10,1	185 ± 3,20
Lokomotion EPM (n)	4,00 ± 0,95	4,40 ± 1,03	3,00 ± 1,00

	BC_LAB		
	H_LAB (D)	h_LAB (E)	L_LAB (F)
Weibchen und Männchen (n)	14	17	12
Anzahl AVP ISH	11	0	9
<i>headdips</i> (n)	26,6 ± 3,02 ^H	24,8 ± 2,88	17,5 ± 3,18
DaLi-im Hellen (sec)	82,3 ± 12,8 ^{G I}	85,9 ± 10,2	84,4 ± 13,9 ^{G I}
<i>struggling</i> (sec)	226 ± 12,6	173 ± 10,9	155 ± 14,6
<i>floating</i> -Latenz (sec)	120 ± 9,3	104 ± 7,94	126 ± 16,1
Lokomotion EPM (n)	8,71 ± 0,71	7,94 ± 0,46	7,75 ± 0,77
Weibchen (n)	7	6	3
Anzahl AVP ISH	5	0	2
<i>headdips</i> (n)	32,4 ± 4,46	29,2 ± 3,66	24,0 ± 6,11
DaLi-im Hellen (sec)	112 ± 10,9 ^{GT II}	114 ± 6,80	78,3 ± 23,5 ^{GT I}
<i>struggling</i> (sec)	233 ± 16,9 ^b	194 ± 21,7 ^{bT}	184 ± 49,8
<i>floating</i> -Latenz (sec)	114 ± 12,9	103 ± 17,7	98,3 ± 25,8
Lokomotion EPM (n)	9,14 ± 1,14	7,50 ± 0,56	10,3 ± 1,20
Männchen (n)	7	11	9
Anzahl AVP ISH	6	0	7
<i>headdips</i> (n)	20,7 ± 2,87	22,4 ± 3,89	15,3 ± 3,62
DaLi-im Hellen (sec)	52,2 ± 17,1	70,6 ± 13,4	86,5 ± 17,5
<i>struggling</i> (sec)	220 ± 19,6	163 ± 11,4 ^J	146 ± 11,8
<i>floating</i> -Latenz (sec)	127 ± 13,9	105 ± 8,36	136 ± 19,3
Lokomotion EPM (n)	8,29 ± 0,89	8,18 ± 0,64	6,89 ± 0,77

	C		RC	
	C_HAB (G)	C_LAB (H)	RC_HAB (I)	RC_LAB (J)
Weibchen und Männchen (n)	10	11	10	21
Anzahl AVP ISH	5	9	5	9
<i>headdips</i> (n)	2,10 ± 0,78 ^H	18,7 ± 3,04 ^{B C D G I}	1,80 ± 0,36 ^H	26,2 ± 3,03
DaLi-im Hellen (sec)	0,00 ± 0,00 ^{D F}	118 ± 15,4	4,48 ± 3,06 ^{D F}	89,5 ± 9,48
<i>struggling</i> (sec)	98,0 ± 13,3	222 ± 18,4	168 ± 22,0	262 ± 14,6
<i>floating</i> -Latenz (sec)	91,2 ± 14,5	124 ± 10,4	114 ± 19,1	154 ± 11,3 ^b
Lokomotion EPM (n)	2,70 ± 0,63	8,27 ± 0,47	5,20 ± 0,95	7,10 ± 0,53 ^{a c t g}
Weibchen (n)	4	5	4	6
Anzahl AVP ISH	2	3	3	5
<i>headdips</i> (n)	2,50 ± 1,32	28,7 ± 4,18	2,25 ± 0,63	32,0 ± 6,50
DaLi-im Hellen (sec)	0,00 ± 0,00 ^{d t r}	136 ± 11,5	0,00 ± 0,00 ^{d t r}	97,8 ± 9,62
<i>struggling</i> (sec)	76,6 ± 14,5	222 ± 21,9	141 ± 10,7	223 ± 29,2
<i>floating</i> -Latenz (sec)	62,9 ± 4,65	115 ± 14,8	94,1 ± 18,7	144 ± 9,52 ^b
Lokomotion EPM (n)	1,75 ± 0,75	9,00 ± 0,71	4,25 ± 1,44	9,33 ± 0,61 ^{c t g}
Männchen (n)	6	6	6	15
Anzahl AVP ISH	3	6	2	4
<i>headdips</i> (n)	1,83 ± 1,05 ^h	13,7 ± 1,91 ^{a b g i}	1,50 ± 0,43 ^h	23,9 ± 3,30
DaLi-im Hellen (sec)	0,00 ± 0,00	106 ± 24,3	7,47 ± 4,86	86,2 ± 12,8
<i>struggling</i> (sec)	112 ± 18,5	223 ± 30,3	188 ± 35,1	279 ± 15,6 ^D
<i>floating</i> -Latenz (sec)	110 ± 21,1	132 ± 14,9	128 ± 29,4	159 ± 15,4
Lokomotion EPM (n)	3,33 ± 0,88	7,67 ± 0,56	5,83 ± 1,30	6,20 ± 0,55

Ein ähnliches Bild zeigten die Tiere in der DaLi. Dort verbrachten H_LABs, h_LABs und L_LABs sowie die LAB-Kontrollen mehr Zeit im hellen Areal als H_HABs, h_HABs, L_HABs und die HAB-Kontrollen. Dieser Unterschied wurde jedoch nur zwischen den Kontrollen selbst und den jeweils nicht zugehörigen Linien signifikant. Während sich die LAB-Kontrollen nicht von den LAB-stämmigen heterozygoten Geschwisterpaar-Nachkommen unterschieden, waren h_HABs längere Zeit im hellen Areal als die HAB-Kontrollen.

Die Untersuchung des Angstverhaltens im Jungtierstadium zeigte einen gewissen Zusammenhang mit dem Genotyp. Während sich H_LABs und h_LABs nicht von C_HABs unterschieden, vokalisiert L_LABs weniger als C_HABs sowie H_HABs. Dies bestätigte sich jedoch nicht in RC_HABs, die sich nicht wie C_HABs von den LAB-Kontrollen unterschieden. Auch vokalisiert L_HABs mehr als die LAB-Kontrollen und waren nicht von H_HABs oder C_HABs zu

unterscheiden. Die Lokomotion, gemessen an den Linienübertretungen im dunklen Areal relativ zur dort verbrachten Zeit, war in L_HABs geringer als in allen anderen Gruppen, teilweise tendenziell, mit Ausnahme von RC_LABs. Letztere bewegten sich weniger als alle Gruppen der LAB-Linie sowie alle Kontrollen. Das Gewicht am postnatal-Tag 11 war in RC_HABs niedriger als in allen anderen Gruppen mit Ausnahme von h_HABs und L_HABs. Das Gewicht von L_HABs wiederum war niedriger als das von C_HABs sowie C_LABs. RC_LABs wogen mehr als h_HABs, L_HABs sowie L_LABs.

Während sich im FS-Test in der *floating*-Dauer zwischen den LAB-Kontrollen und C_HABs nur tendenzielle Unterschiede fanden, waren H_LABs und h_LABs signifikant länger immobil als RC_LABs und tendenziell L_LABs. H_HABs, h_HABs und L_HABs zeigten gegenüber C_HABs einen geringen Trend zu verringerter Immobilität, aber keinen Unterschied zu den LAB-Kontrollen. Eine sehr geringe *floating*-Dauer zeigten RC_HABs gegenüber C_HABs. Betrachtete man die *floating*-Latenz, so zeigte sich, dass RC_LABs die längste Latenz aufwiesen mit signifikanten Unterschieden zu C_HABs, H_HABs, h_HABs sowie h_LABs. Im Gegensatz zur *floating*-Dauer, waren HAB-stämmige heterozygote Geschwisterpaar-Nachkommen im *struggling* auf dem Niveau der C_HABs. Auch in diesem Parameter war ein Trend zu einem erhöhten *struggling* von RC_HABs gegenüber C_HABs festzustellen. So unterschieden sich die LAB-Kontrollen signifikant von C_HABs, jedoch nur RC_LABs und nicht aber C_LABs von RC_HABs. Während H_LABs ein mit LAB-Kontrollen vergleichbares *struggling* aufwiesen, waren h_LABs und L_LABs intermediär zwischen C_HABs und den LAB-Kontrollen.

Die Betrachtung der Lokomotion als Eintritte in die geschlossenen Arme der EPM ergab eine geringere Anzahl bei C_HABs wie auch bei allen HAB-stämmigen heterozygoten Geschwisterpaar-Nachkommen gegenüber den LAB-Kontrollen. LAB-stämmige heterozygote Geschwisterpaar-Nachkommen zeigten ähnlich viele Eintritte wie die LAB-Kontrollen.

Die Lokomotion, gemessen in der DaLi als Linienübertretungen im dunklen Areal, zeigte keinerlei Unterschiede zwischen allen Gruppen. Die Untersuchung der neuroendokrinen Parameter ergab, dass im ACTH-Gehalt lediglich RC_LABs ein geringeres Niveau als die HAB-Kontrollen, L_HABs sowie C_LABs aufwiesen. Hingegen war der Plasma-CORT-Gehalt in RC_LABs gegenüber C_LABs, h_HABs und L_HABs erhöht und auf dem Niveau der HAB-Kontrollen. Während H_HABs nicht von den HAB-Kontrollen zu unterscheiden waren, wiesen h_HABs und L_HABs einen (tendenziell) niedrigeren CORT-Gehalt auf. H_HABs und H_LABs zeigten keinen Unterschied, allerdings hatten h_LABs und L_LABs, vergleichbar mit den HAB-Kontrollen, jeweils mehr CORT als h_HABs und L_HABs.

Die Analyse des AVP mRNA-Gehalts im PVN aller Tiere zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen allen Linien. Unter Außerachtlassung der Bonferroni-Korrektur zeigte sich der AVP mRNA-Gehalt in L_HABs sowie RC_LABs erniedrigt gegenüber C_HABs und RC_HABs.

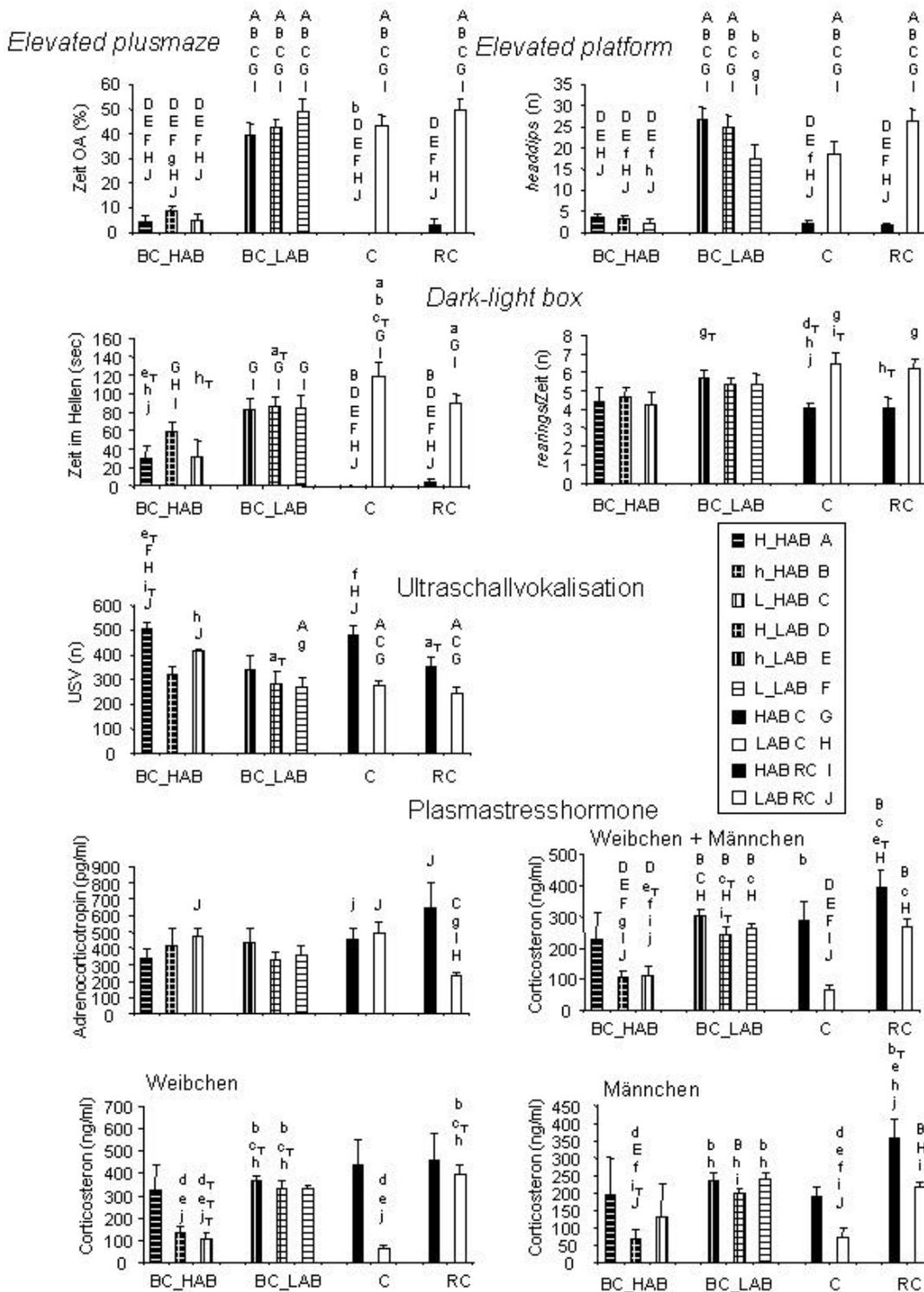


Abbildung 42. Charakterisierung von durch *backcrossing* (BC) erzeugten, transgenen Ratten (BC_HAB-Linie: L_LAB; BC_LAB-Linie: H_LAB) bzw. ihrer nicht transgenen Geschwister (BC_HAB-Linie: H_HAB, h_HAB; BC_LAB-Linie: h_LAB; L_LAB). Als Kontrollen dienten Tiere mit homozygoten Eltern aus der 4. Generation (C) und HAB/LAB-Zuchtkontrollen (RC) (Signifikanzen und Tendenzen sind in Bezug auf die den in der Tabelle den Gruppen zugeordneten Buchstaben angegeben; Großbuchstaben für $p < 0,01$, Kleinbuchstaben für $p < 0,05$, T-Zusatz für $p < 0,1$).

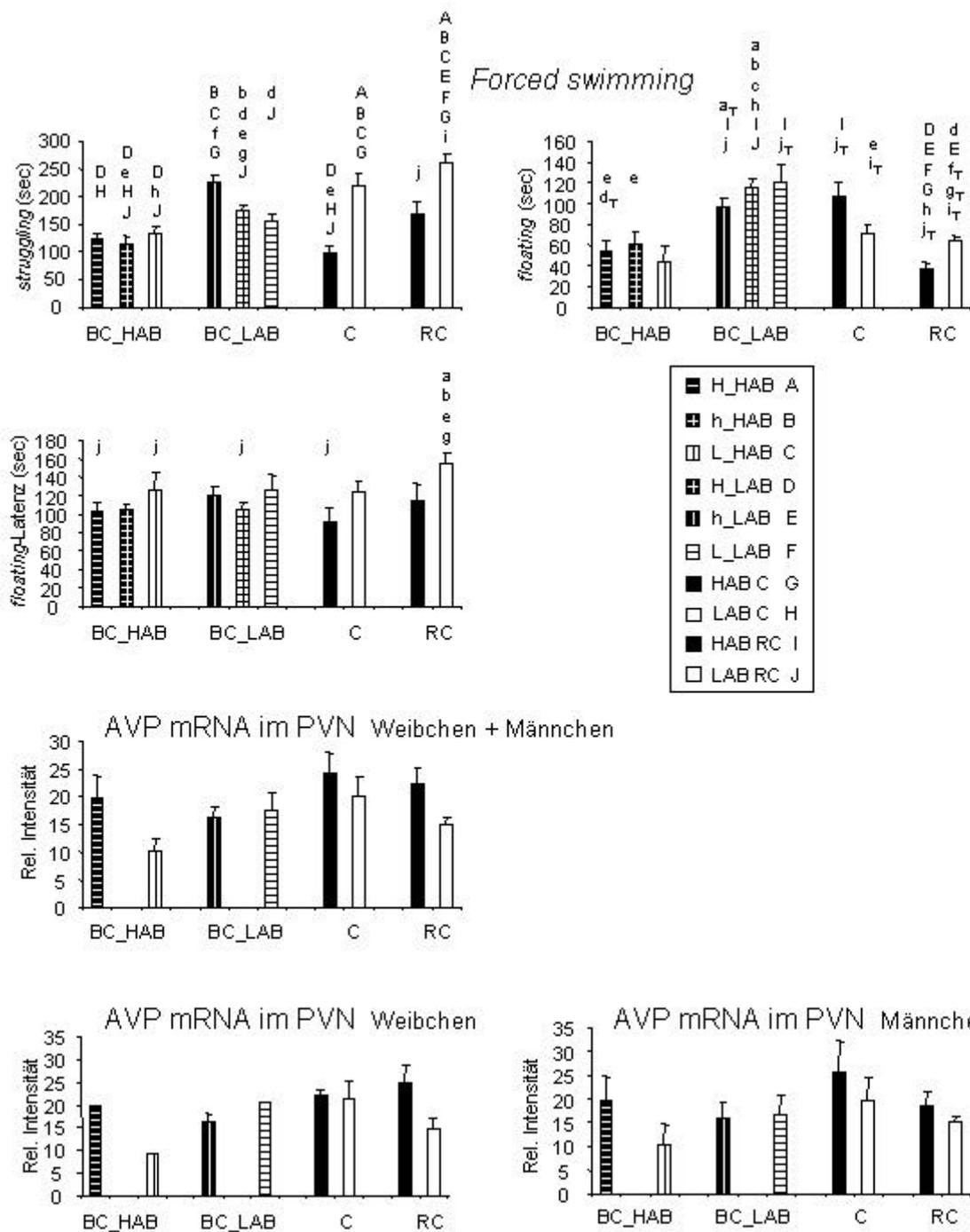


Abbildung 42 Fortsetzung.

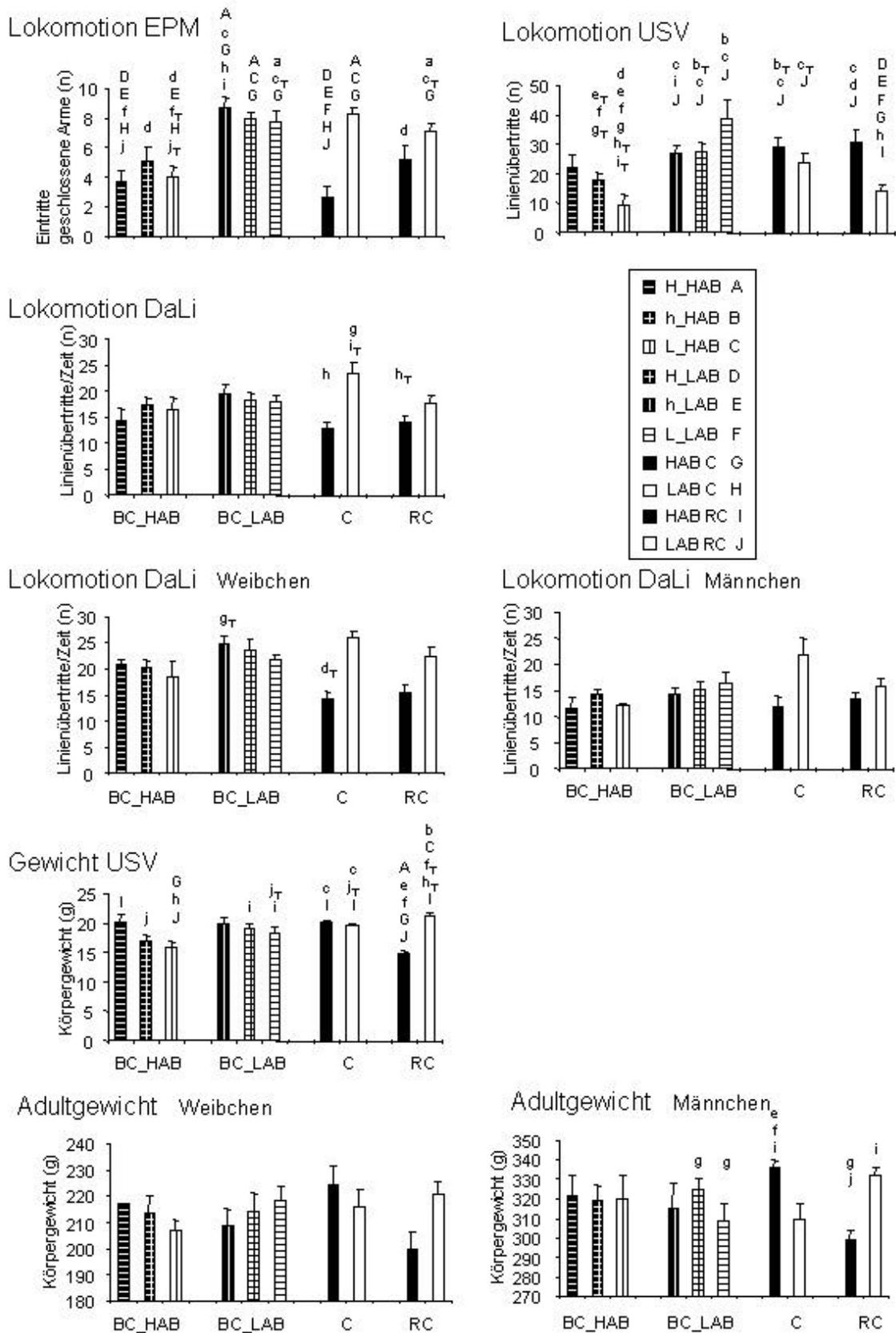


Abbildung 42 Fortsetzung.

Diskussion

Die in diesem Projekt erhobenen Daten zeigen, dass in HAB/LAB-Ratten eine starke genetische Prädisposition für das jeweilige Verhaltensextrem in Bezug auf Angst besteht. RC-Tiere, die unabhängig von ihrem Verhalten auf der EPM gezüchtet wurden, erwiesen sich über 5 Generationen stabil in ihrem Angstverhalten und weitgehend in depressionsbezogenen und neuroendokrinen Parametern (Abb. 41). Die ab der 3. Generation deutliche Divergenz der BC-Linien im Angstverhalten auf der EPM entsprechend des eingekreuzten Vaters unterstreicht die Ausprägung und Prädisposition zum jeweiligen Phänotyp in den HAB/LAB-Zuchtlinien. Auch die Tiere der *congenic strains*, d. h. die Tiere mit inversem AVP-Allel relativ zu ihrem genomischen Hintergrund, entsprachen in allen Parametern mit wenigen Ausnahmen der eingekreuzten väterlichen Linie – unabhängig vom AVP-Allel. Somit war festzustellen, dass die SNPs im AVP-Gen einen geringeren Einfluss auf die Ausbildung der für die Zuchttiere gezeigten extremen Parameter hatte als andere Faktoren des jeweils inversen Extremums und diese nicht aufwiegen konnten.

Die Ausgangstiere der BC-Zucht aus der F1-Generation wiesen einen tendenziell ängstlichen Phänotyp relativ zum erwarteten intermediären Verhalten von heterozygoten Ratten auf. Dass dies jedoch von keiner weiteren detektierbaren Bedeutung war, zeigte sich im Verlauf der BC-Generationen. Während die Tiere unabhängig vom Genotyp bzw. der eingekreuzten väterlichen Linie ein weitgehend intermediäres Verhalten auf der EPM aufwiesen, spaltete sich der Angstphänotyp über 5 Generationen hinweg entsprechend der Abstammung des Vaters auf. Damit wurde bestätigt, dass das Angstverhalten von HAB- und LAB-Ratten weder maternalen Determinanten noch einem Einfluss des mütterlichen Verhaltens unterliegt (Wigger et al., 2001).

Studien zeigten, dass die Selektion von Individuen auf die phänotypische oder auch morphologische Ausprägung eines bestimmten Merkmals bereits ab 4 Generationen zu dessen Aufspaltung führte (Conover und Munch, 2002; Schjolden et al., 2005). Dass eine derartige Divergenz auch innerhalb weniger Generationen durch Einkreuzung nur eines hoch-selektierten Individuums in eine nicht phänotypisch selektierte Linie hervorzurufen war, unterstreicht die dominante Manifestation des jeweiligen Phänotyps in HAB- und LAB-Ratten. Die Untersuchung der Tiere der 5. BC-Generation bestätigte dies für eine Reihe von sowohl angst- als auch depressionsbezogenen Parametern. Dieses rasche Divergieren der Linien erlaubte es, bereits in der 5. Generation den Einfluss des AVP-Gens auf das Angstverhalten von in dieser Generation erzeugten transgenen HAB/LAB-Ratten zu studieren.

Um die Untersuchungsergebnisse sowohl auf ungewollte Nebeneffekte, die auf der Zucht der Tiere basieren könnten, als auch auf solche, die die Testung selbst betreffen könnten, kontrollieren zu können, wurden einerseits parallel die RC-Tiere geführt. Zum anderen wurden in der Geschwisterverpaarung der 5. Generation neben heterozygoten Tieren homozygote Tiere verpaart. Damit war es möglich, genotypische Effekte klar von versuchstechnischen Einwirkungen zu unterscheiden. Zusätzlich sollten zur Abgrenzung von maternalen und paternalen Einflüssen 4 Familien basierend auf der jeweiligen Kreuzungskonstellation in der F1-Generation gezüchtet werden. Durch Infertilität und Letalität der Muttertiere in der 2. BC-Generation musste jedoch eine Familie

pro BC-Linie aufgegeben werden. Ähnliche Probleme wurden bei der Erzeugung von *congenic strains* bezüglich Alkoholkonsums berichtet (Carr et al., 2006). Da dies jeweils eine der beiden HAB/LAB-F1-Paarungskonstellationen betroffen hat, ging der Vergleich des Einflusses von Determinanten der Parentalgeneration zwar innerhalb der BC-Linie, aber nicht zwischen diesen verloren.

Auch die Geschwisterverpaarung in der 5. BC-Generation brachte Infertilität und Mortalität mit sich, so dass die angestrebte Individuenzahl von 20-25 Männchen pro Familie deutlich verfehlt wurde. Eine Nachverpaarung war auf Grund von Haltungskapazitäten nicht möglich. Da zwischen weiblichen und männlichen Ratten innerhalb der jeweiligen Gruppen nur in wenigen untersuchten Größen Unterschiede festzustellen waren, wurden die Geschlechter daher zur Erhöhung der Stichprobenzahl in den Gruppenvergleichen, wenn die statistischen Voraussetzungen erfüllt waren, gemeinsam betrachtet.

In allen angstbezogenen Parametern der adulten Tiere und teilweise im FS-Test zeigten sowohl die RC-Ratten als auch die C-Ratten die von der Standard-HAB/LAB-Zucht bekannten Charakteristika. Auch in den BC-Tieren waren die Extreme im Angstverhalten zu finden, allerdings vollkommen unabhängig von der Verteilung der AVP-Allele und vielmehr in klarer Zuordnung zur väterlichen Linie der BC-Generationen.

Dies ist insofern bemerkenswert, als nicht nur das homozygote Vorhandensein des AVP-Allels, sondern auch die Präsenz von mehr als 6 % des genetischen Materials der inversen Linie (Flaherty, 1981) keinerlei Einfluss auf die Ausprägung des Angstverhaltens entsprechend der jeweiligen BC-Väter zur Folge hatte. Damit wird die Rigidität des angstbezogenen Verhaltens in HAB/LAB-Ratten und die Anhäufung genetischen Materials, das zu dessen pathologischer Ausprägung beiträgt, verdeutlicht. Auch Carr et al. (2006) berichteten das Vorhandensein des inversen Allels in einigen Familien der *congenic strains*, ohne jegliche Verhaltensauswirkung. So ist nicht auszuschließen, dass es dominante genetische Faktoren gibt, die durch zufällige Selektion die zu untersuchende genetische Mutation in ihrem Effekt überdecken bzw. durch Epistase die direkte Genfunktion nicht detektiert werden kann. Des Weiteren bestätigen die vorliegenden Ergebnisse erneut, dass es sich beim Angstverhalten um ein komplex genetisches Charakteristikum handelt, bei dem einzelne Gene nur wenige Prozent zum Phänotyp beitragen.

Auch im FS-Test waren keine Einflüsse der AVP-Allele bzw. des inversen genetischen Materials zu erkennen. Dennoch war der parentale Phänotyp weniger stark ausgeprägt, was auf einen Verlust der Komorbidität von angst- und depressionbezogenem Verhalten in den BC-Tieren hindeutet.

Interessanterweise war ein geringer Trend zu vermehrter Vokalisation der Jungtiere mit homozygotem HAB-Allel in der BC_HAB-Linie festzustellen (Abb. 42). Dies könnte auf einen gewissen Einfluss der Mutation im AVP-Gen hinweisen, der mit der Ausprägung der neuronalen Verknüpfungen im Laufe der Ontogenese kompensiert wird. Eine endgültige Aussage dazu kann aber auch hier auf Grund der durch Zuchtprobleme relativ geringen Tierzahl nicht getroffen werden.

Die Erhebung der HPA-Achsen-Parameter nach Stressexposition ergab in RC-Tieren für ACTH und in G-Tieren für CORT den erwarteten Unterschied, wie er sich in HAB-Ratten mit erhöhter Sekretion gegenüber LAB-Ratten zeigte (Projekt 1 D und Landgraf et al., 1999). Während in den BC-Tieren kein Unterschied in der ACTH-Ausschüttung festzustellen war, ist es nicht zu erklären, warum in Tieren der BC_LAB-Linie mehr sezerniertes CORT als in Tieren der BC_HAB-Linie zu detektieren war. Dies zeigt dennoch, dass kein kausaler Zusammenhang zwischen Angstverhalten und HPA-Achsen-Reaktivität in diesen Tieren bestand, wie mehrfach postuliert wurde (Courvoisier et al., 1996).

Auch in diesem Kontext war es von Interesse, die Expression von AVP mRNA im PVN zu untersuchen, um einen Hinweis auf deren Einfluss entweder auf das Angstverhalten oder die HPA-Achsen-Aktivität zu ergründen. Während sich in der Untersuchung der RC-Tiere der Unterschied der AVP-Expression mit HABs überexprimierend gegenüber LABs finden ließ, waren keine weiteren Unterschiede in allen anderen Tieren festzustellen. Ein geringer Trend zu einer verminderten Expression war in L_HAB-Tieren als Indiz für die geringe AVP-Expression bei Vorhandensein des Wildtypallels zu erkennen. Doch auch hier ist eine endgültige Aussage nicht zu treffen, da nicht nur Zuchtprobleme, sondern auch technische Schwierigkeiten die Probenzahl minimiert haben.

So ist zu vermuten, dass in der Zucht der HAB- und LAB-Ratten Vulnerabilitätsfaktoren selektiv angehäuft wurden, aber bei Kreuzung und freier Segregation in der F1-Generation aufgespalten wurden und auch durch *backcrossing* nicht wieder in ursprünglicher Ausprägung kongregiert werden konnten.

Die Lokomotion ist in der Standard-HAB/LAB-Zucht nicht unterschiedlich und hat damit keinen Einfluss auf das gezeigte Angstverhalten auf der EPM (Liebsch et al., 1998b). Dies zeigte sich auch in den RC-Ratten. In den BC-Ratten waren jedoch deutliche Unterschiede in den Eintritten in die geschlossenen Arme der EPM zwischen BC_HABs und BC_LABs zu erkennen. Diese Unterschiede zeigten sich nicht in der Aktivität in der DaLi-Box, was die Notwendigkeit der Anwendung von Testreihen und der Mehrfacherhebung verhaltensbiologischer Parameter im selben Tier unterstreicht, um emotionale von lokomotorischen Charakteristika klar differenzieren zu können. Eindeutig war aber, dass weder die Lokomotion und das Gewicht der juvenilen Ratten Einfluss auf die Vokalisation im USV-Test hatten, noch das Adultgewicht auf die Ausprägung von aktivem oder passivem Verhalten im FS-Test. Dies lässt erkennen, dass die Emotionalität der Tiere unabhängig von konstitutionellen Parametern erfasst werden konnte.

Die vorliegende Studie zeigt, dass die klassische Zucht von *congenic strains* für Ratten ein adäquates Werkzeug ist, die Einflussgröße eines Kandidatengens auf die Ausprägung eines selektierten Merkmals zu studieren. Um die benötigte Generationenzahl und damit die Dauer zur Verfügbarkeit transgener Tiere weiter zu beschleunigen, wurde ein erweitertes *backcrossing*-Modell vorgeschlagen (Markel et al., 1997). Durch die generationsweise Untersuchung der Tiere sowohl auf Kandidatenallele als auch auf Marker für den inversen genomischen Hintergrund kann der Zuchterfolg deutlich früher als nach den von Flaherty (1981) vorgeschlagenen 7 bis 10 Generationen erzielt werden. Dies bietet eine gute Alternative zur Erzeugung transgener Tiere zu gentechnischen

Verfahren und den damit verbundenen Schwächen. Die Erzeugung von *congenic strains* gewinnt insbesondere in der Untersuchung von gut charakterisierten Rattenmodellen, die nur ungenügend auf Mausmodelle übertragen werden können, an Bedeutung (Potenza et al., 2004), dies einhergehend mit QTL-Analysen oder gesamtgenomischen SNP-Untersuchungen (Carr et al., 2006). Für das HAB/LAB-Ratten-Modell konnte in einem ersten Ansatz gezeigt werden, dass das AVP-Gen *per se* geringen Einfluss auf die Ausprägung der Extreme im Angstverhalten sowie in depressions- und neuroendokrinen Parametern hat. Um die daher in HABs sowie LABs interagierenden genetischen Determinanten einzugrenzen, könnten erneut *congenic strains* etabliert werden. Diese könnten bestimmte Haplotypen bzw. Gen-Kombinationen transgen in sich tragen, die in QTL-Analysen und SNP-Untersuchungen in HAB/LAB- bzw. HAB/LAB-F2-Ratten detektiert werden könnten, um deren Wirkgröße auf Angst, Depression und neuroendokrine Parameter sowie deren Interaktionen zu erfassen.

2. Untersuchung einer kreuzgezüchteten F1- und frei segregierenden F2-Generation aus HAB- und LAB-Ratten

Die Selektion eines bestimmten Phänotyps führt einerseits zur Anreicherung von kausal involvierten Genen, bedingt aber auch die Koselektion primär phänotypunabhängiger genetischer Marker bzw. genotypunabhängiger Phänotypen (Mormede et al., 2002). Insbesondere können parentale epigenetische Effekte – sowohl molekulare als auch umweltbedingte – starken Einfluss auf die Verhaltensausrprägung nehmen (Francis et al., 2003). Zur Dissoziation der kausalen Zusammenhänge von genetischen, epigenetischen und phänotypischen Phänomenen und deren Interaktionen ist das Mittel der Wahl das Studium einer frei segregierenden F2-Generation (Mormede et al., 2002).

Die über viele Generationen durchgeführte Selektion auf Grund der Ausprägung eines bestimmten Phänotyps in strikter Inzucht zielt darauf ab, Individuen zu erzeugen, die bezüglich der genetischen Grundlage des Selektionskriteriums nur noch eine begrenzte Auswahl an Allelen besitzen. Im optimalen Fall werden zwei extreme Phänotypen durch Tiere repräsentiert, die in allen entscheidenden Genen jeweils homozygot für ein bestimmtes Allel sind. Kreuzt man diese Individuen, so sollten sich – ohne ausgeprägte Dominanzeffekte bestimmter Allele – laut der Mendelschen Gesetze intermediäre Phänotypen ergeben. Werden nun wiederum die F1-Tiere untereinander gekreuzt, so entstehen in der F2-Generation durch freie Segregation der Chromosomen sowie *crossing over*-Ereignisse Individuen, in denen genetische, epigenetische und damit einhergehende phänotypische Ausprägungen zufällig verteilt und neu kombiniert sind. So können die Einflüsse einzelner genetischer Faktoren bzw. Haplotypen als auch epigenetische Effekte auf selektive verhaltensbiologische und neuroendokrine Parameter sowie auch deren Zusammenhänge studiert werden.

Auf diesem Ansatz basierend, sollte – parallel zur Erzeugung und Untersuchung der transgenen HAB/LAB-Ratten – der genetische Einfluss des AVP-Allels auf Verhaltensparameter und

HPA-Achsen-Aktivität in F2-Ratten gezeigt werden, die aus einer kreuzgepaarten HAB/LAB-F1-Generation erzeugt wurden. Mittels weiterer Korrelationsanalysen sollten die Zusammenhänge von Angstverhalten sowie depressionsbezogenen und neuroendokrinen Parametern in der F2-Generation untersucht werden. Diese Studien dienen außerdem als Grundlage für Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zukünftiger Kandidatengene mit psychopathologischen (Endo-)Phänotypen.

Versuchsplan

Zu Beginn des Projekts wurden jeweils 4 homozygote HAB- und LAB-Ratten kreuzgepaart (je 2 HAB- bzw. LAB-Mütter mit je 2 LAB- bzw. HAB-Vätern). Die F1-Generation wurde auf der EPM und im FS-Test phänotypisch charakterisiert.

Die Heterozygotie bezüglich des AVP-Promotorallels der F1-Tiere wurde durch die genetische Analyse einer ausgewählten Teilpopulation nachgewiesen.

Durch strikte Geschwisterpaarung von F1-Tieren wurde eine F2-Generation gezüchtet. Folgende Untersuchungen wurden an den F2-Tieren durchgeführt: Im Jungtierstadium (Tag 11 postnatal) wurde ein Ultraschallvokalisationstest durchgeführt. In der 10. postnatalen Woche fand eine EPM-Exposition sowie eine daran sich (nach 1 h) anschließende FS-Testung statt. Schließlich wurden die Ratten der EPF exponiert, und über direkt anschließende Abnahme von Dekapitationsblut wurde die HPA-Achsen-Reaktivität untersucht. Durch DNA-Extraktion aus Schwanzspitzengewebe wurde der Genotyp bezüglich des AVP-Allels der F2-Tiere identifiziert (technische Durchführung von C. Murgatroyd, MPI München).

Ergebnisse

Die Parentaltiere waren auf Grund ihres extremen Verhaltens auf der EPM als Ausgangspunkt für die F2-Generation ausgewählt worden ($n = 2$ pro Linie und Geschlecht). So waren die ausgesuchten HAB-Tiere ohne Eintritt in die OA der EPM, wohingegen die LABs dort zwischen 47 % und 67 % der Testzeit verbrachten. Dabei unterschieden sie sich nicht in der Lokomotion (Abb. 43; Eintritte in die geschlossenen Arme der EPM (n): HAB Väter $4,50 \pm 0,50$; LAB Väter $5,50 \pm 3,50$; HAB Mütter $5,50 \pm 0,50$; LAB Mütter $5,00 \pm 2,00$).

Die kreuzgezüchtete F1-Generation zeigte in den angstbezogenen Parametern einen intermediären Phänotyp relativ zu den Parentaltieren. Der Vergleich der Geschlechter in der F1-Generation ergab, dass Männchen in ihrem Verhalten auf der EPM ängstlicher waren, aber aktiver im FS-Test als Weibchen. Keine Unterschiede zeigten sich in der *floating*-Dauer und in der Lokomotion (Abb. 43; Eintritte in die geschlossenen Arme der EPM (n): F1 Männchen $6,00 \pm 0,48$; F1 Weibchen $6,09 \pm 0,35$).

Die Genotypen der F2-Generation resultierten mit 49 homozygoten HAB-Allel-Trägern, 121 heterozygoten und 56 homozygoten LAB-Allel-Trägern annähernd in einem Verhältnis von 1:2:1.

Eine Normalverteilung der gemessenen Werte lag lediglich in der Anzahl der USV sowie dem Jungtier- und Adultgewicht vor (Abb. 44). Annähernd normalverteilt waren die Eintritte in die

geschlossenen Arme. Alle anderen Parameter zeigten eine Linksverschiebung (positive Schiefe). Auf Grund dessen wurden nicht-parametrische statistische Tests auch für alle weiteren Analysen gewählt.

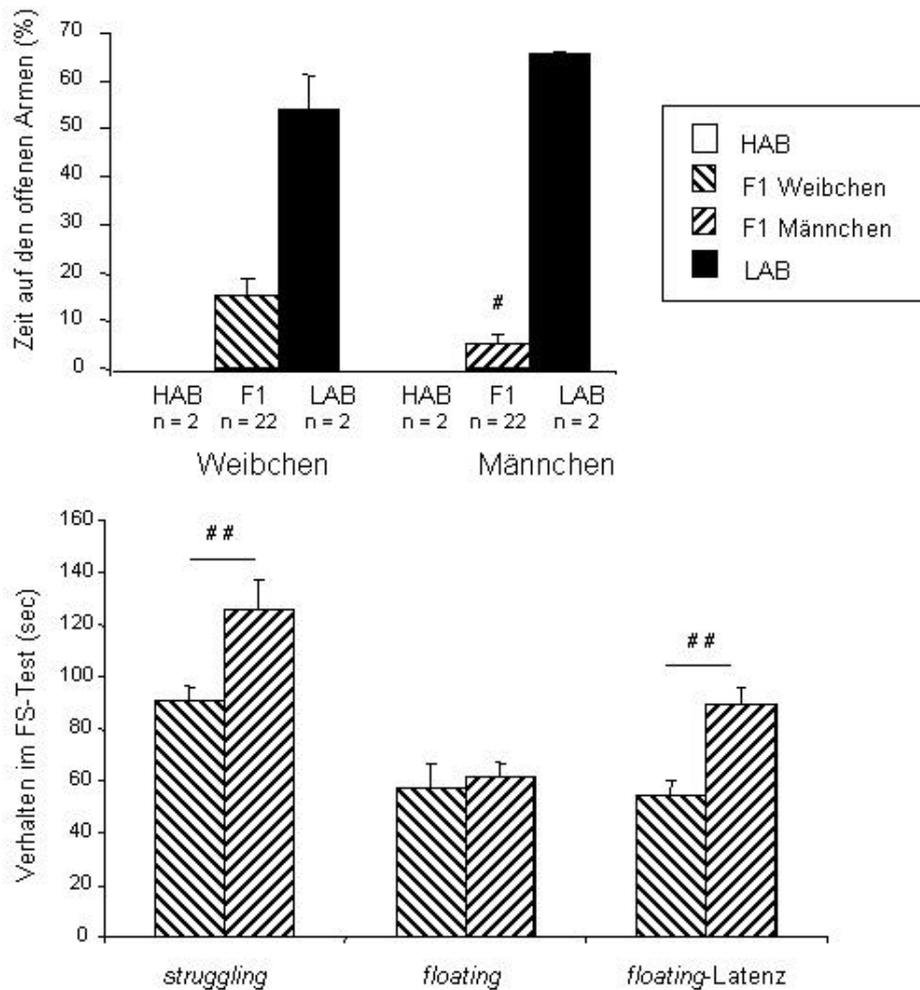


Abbildung 43. *Elevated plusmaze*-Test an den parental HAB- und LAB-Ratten sowie an durch deren Kreuzverpaarung gezüchteten F1-Tieren.

Auf Grund der geringen Zahl an parental Tieren wurden statistische Untersuchungen nur mit F1-Tieren durchgeführt (Mittelwerte \pm SEM; ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ vs. Weibchen).

Im Vergleich der Verhaltensparameter der drei den jeweiligen Genotypen zugeordneten F2-Ratten (homozygote LAB-AVP-Allel-Träger (LL), homozygote HAB-AVP-Allel-Träger (HH) und heterozygote Tiere (HL)), zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in einem der betrachteten Parameter (Tabelle 10). Dieser Befund bestätigte sich in einer LOD-Score-Analyse (Müller-Myhsok,, Frank, Keßler, unveröffentlicht).

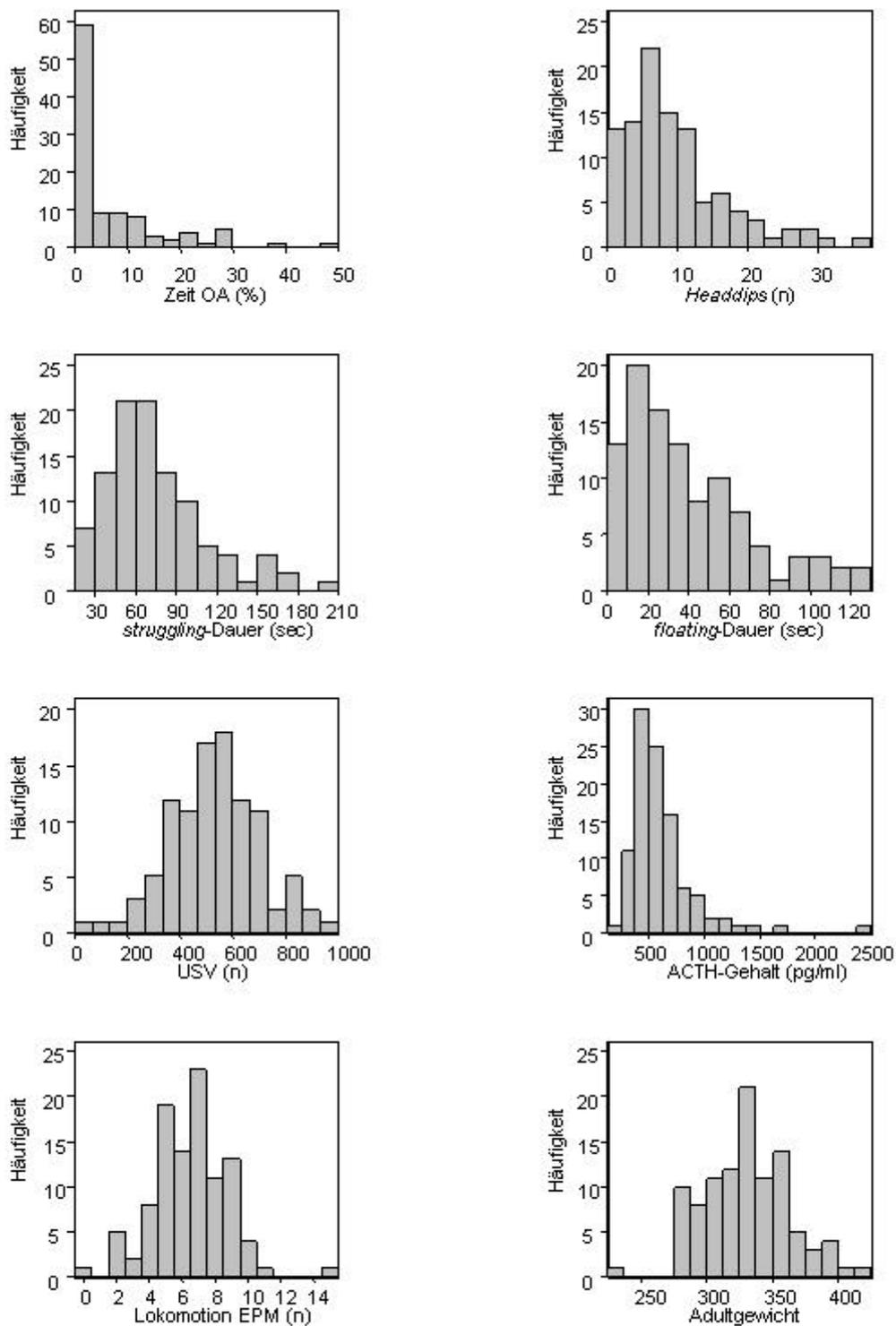


Abbildung 44. Häufigkeitsverteilung einer Auswahl der in der Charakterisierung der HAB/LAB-F2-Generation erhobenen Parameter.

Tabelle 10. Verhalten, neuroendokrine und physiologische Parameter von HAB/LAB-F2-Ratten. Verglichen wurden Tiere, die homozygot bezüglich des mutierten HAB-AVP-Allels (H/H) oder des LAB-AVP-Allels (L/L) waren bzw. heterozygot beide Allele (H/L) aufwiesen.

Genotypen	H/H	H/L	L/L
Zeit OA (%)	8,70 ± 1,60	6,60 ± 0,80	8,40 ± 1,80
<i>headdips</i> (n)	9,90 ± 1,10	10,4 ± 0,70	9,20 ± 1,10
USV (n)	507 ± 31,3	504 ± 17,6	501 ± 25,5
<i>struggling</i> -Dauer (sec)	88,1 ± 5,00	84,2 ± 3,50	85,2 ± 5,60
<i>floating</i> -Dauer (sec)	37,0 ± 3,60	40,2 ± 2,90	50,6 ± 4,80
<i>floating</i> -Latenz (sec)	77,2 ± 9,10	76,8 ± 4,80	86,0 ± 8,20
ACTH	559 ± 28,8	583 ± 27,4	537 ± 32,2
Lokomotion EPM (n)	6,70 ± 0,30	6,60 ± 0,30	6,40 ± 0,30
Lokomotion USV (n)	20,6 ± 2,70	18,3 ± 1,00	20,5 ± 1,90
Gewicht USV-Test (g)	19,4 ± 0,40	19,8 ± 0,30	19,4 ± 0,40
Adultgewicht (g)	330 ± 5,70	330 ± 4,40	333 ± 6,90

Die zeitliche Ausdehnung des Projekts und die doppelte Verpaarung der Tiere hatte keinen Einfluss auf die untersuchten Parameter. Während sich außerdem kein Effekt der Gruppengröße von 3-5 Tieren auf die Ausprägung des Verhaltens zeigte, war ein starker Käfigeffekt festzustellen (Einzeldaten nicht gezeigt). So interagierten im Vergleich der 53 Käfige, *floating*-Dauer, Lokomotion im USV-Test sowie das Jungtier- wie auch Adultgewicht mit der Käfigzugehörigkeit (jeweils $p < 0,01$, Einzeldaten nicht gezeigt).

Auch zeigte sich ein geringer Einfluss der großelterlichen Linie (Tabelle 11). Die Paarung von parental LAB-Weibchen und HAB-Männchen resultierte in weniger *headdips*, mehr ACTH und geringerer Lokomotion und Gewicht im USV-Test im Vergleich zu HAB-Weibchen gepaart mit LAB-Männchen. Wurde die F2-Generation zusätzlich innerhalb der großelterlichen Linien nach Genotypen unterschieden, so war innerhalb der homozygoten HAB-AVP-Allel-Träger die *floating*-Latenz länger sowie das USV-Gewicht niedriger bei Abstammung von HAB-Großvätern. Bei heterozygoten Tieren gleicher Abstammung lagen weniger *headdips*, ein höherer ACTH-Gehalt und ein niedrigeres Jungtiergewicht als bei großväterlichen LABs vor, und in homozygoten LAB-AVP-Allel-Trägern war die Lokomotion im USV-Test erniedrigt.

Eine Korrelationsanalyse über alle F2-Tiere hinweg zeigte eine schwache positive Korrelation von %Zeit auf den OA der EPM und der Anzahl der *headdips* auf der EPF ($R = 0,31$, $p < 0,01$). Stärker negativ korreliert waren *floating*-Dauer und -Latenz ($R = -0,47$, $p < 0,01$) sowie das Gewicht im Jungtierstadium mit dem Adultgewicht ($R = 0,52$, $p < 0,01$).

Tabelle 11. Verhalten, neuroendokrine und physiologische Parameter von HAB/LAB-F2-Ratten. Verglichen wurden Tiere, die homozygot bezüglich des mutierten HAB-AVP-Allels (H/H) oder des LAB-AVP-Allels (L/L) waren bzw. heterozygot beide Allele (H/L) aufwiesen und der großväterlichen Abstammung zugeordnet worden waren (Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

	Großväter HAB	Großväter LAB
Anzahl	133	93
Zeit OA (%)	7,39 \pm 0,96	7,41 \pm 1,01
headdips (n)	8,38 \pm 0,56 **	12,0 \pm 0,91
USV (n)	508 \pm 17,1	478 \pm 21,2
struggling-Dauer (sec)	81,6 \pm 3,35	87,5 \pm 4,07
floating-Dauer (sec)	43,6 \pm 2,82	38,0 \pm 2,97
floating-Latenz (sec)	81,2 \pm 4,94	73,0 \pm 5,67
ACTH (pg/ml)	590 \pm 25,3 *	506 \pm 21,6
Lokomotion EPM (n)	6,47 \pm 0,22	6,44 \pm 0,28
Lokomotion USV (n)	16,3 \pm 0,9 **	22,8 \pm 1,71
Gewicht USV-Test (g)	18,8 \pm 0,28 **	19,9 \pm 0,44
Adultgewicht (g)	324,5 \pm 8,2	312 \pm 9,52
	H/H	H/H
Anzahl	27	22
Zeit OA (%)	9,22 \pm 2,18	8,05 \pm 2,40
headdips (n)	8,85 \pm 1,47	11,2 \pm 1,72
USV (n)	544 \pm 40,3	464 \pm 48,0
struggling-Dauer (sec)	82,1 \pm 5,85	95,4 \pm 8,42
floating-Dauer (sec)	38,1 \pm 5,08	35,7 \pm 5,08
floating-Latenz (sec)	94,6 \pm 13,5 *	55,9 \pm 10,3
ACTH (pg/ml)	556 \pm 43,5	560 \pm 36,8
Lokomotion EPM (n)	6,63 \pm 0,47	6,86 \pm 0,40
Lokomotion USV (n)	15,7 \pm 2,24	26,6 \pm 5,03
Gewicht USV-Test (g)	18,3 \pm 0,37 **	20,8 \pm 0,54
Adultgewicht (g)	328 \pm 7,99	331 \pm 8,40

	H/L	H/L
Anzahl	68	53
Zeit OA (%)	5,18 ± 0,97	8,00 ± 1,39
<i>headdips</i> (n)	8,50 ± 0,70 **	13,5 ± 1,24
USV (n)	536 ± 22,2	501 ± 28,04
<i>struggling</i> -Dauer (sec)	92,9 ± 4,65	85,7 ± 5,54
<i>floating</i> -Dauer (sec)	37,1 ± 4,22	34,8 ± 3,64
<i>floating</i> -Latenz (sec)	72,7 ± 6,64	75,8 ± 6,77
ACTH (pg/ml)	638 ± 41,0 **	497 ± 27,0
Lokomotion EPM (n)	6,35 ± 0,31	6,38 ± 0,42
Lokomotion USV (n)	14,9 ± 1,25	20,5 ± 1,67
Gewicht USV-Test (g)	18,8 ± 0,29 *	20,3 ± 0,48
Adultgewicht (g)	294 ± 6,91	322,6 ± 4,62
	L/L	L/L
Anzahl	38	18
Zeit OA (%)	9,87 ± 2,51	5,42 ± 2,16
<i>headdips</i> (n)	9,16 ± 1,13	9,35 ± 2,35
USV (n)	512 ± 32,7	479 ± 41,0
<i>struggling</i> -Dauer (sec)	82,2 ± 7,25	91,7 ± 8,41
<i>floating</i> -Dauer (sec)	48,8 ± 5,58	54,5 ± 9,26
<i>floating</i> -Latenz (sec)	81,7 ± 8,85	95,5 ± 18,0
ACTH (pg/ml)	547 ± 37,7	512 ± 62,5
Lokomotion EPM (n)	6,23 ± 0,39	6,78 ± 0,61
Lokomotion USV (n)	17,1 ± 1,70 *	27,33 ± 4,42
Gewicht USV-Test (g)	19,2 ± 0,43	19,7 ± 0,82
Adultgewicht (g)	337 ± 8,45	324 ± 11,8

Diskussion

Die vorliegenden Daten zeigen die Notwendigkeit der Untersuchung einer frei segregierenden F2-Generationen, um komorbide von koselektierten Charakteristika in divergierenden Populationen voneinander abgrenzen zu können. Für die in ihrem Angstverhalten extremen HAB- und LAB-Ratten zeigte sich, dass die in den Parentaltieren eindeutig mit dem Selektionskriterium zusammenhängenden depressionsähnlichen und neuroendokrinen Parameter in der F2-Generation weitgehend unabhängig voneinander auftreten (Tabelle 10). Auch waren in den untersuchten Charakteristika großelterliche Einflüsse festzustellen, was auf epigenetische Faktoren hinweist (Tabelle 11). Problematisch war das Auftreten von Käfigeffekten sowie die nicht-existente Normalverteilung der Daten. Eine erste Genotyp-Phänotyp-Analyse bezüglich der Polymorphismen im AVP-Gen – Hauptkandidat für die genetische Prädisposition in HAB/LAB-Ratten – zeigte keinen Zusammenhang mit den untersuchten Parametern.

Die Untersuchung der F1-Generation ergab ähnlich intermediäre Phänotypen der kreuzgepaarten HAB/LAB-Ratten wie bereits in Projekt A 4 beschrieben. Lediglich männliche F1-Ratten neigten zu vermehrt ängstlichem Verhalten. Durch die Weiterverpaarung möglichst intermediärer Individuen sollte dies in Bezug auf die F2-Generation ausgeglichen werden. Aber auch hier zeigte sich entgegen der erwarteten Normalverteilung mit einem Median bei ca. 30 % Zeit auf den OA der EPM (Wigger et al., 2001) eine starke Verschiebung der Verhaltensausprägung zu vermehrter Ängstlichkeit. Da sich dies auch in den *headdips* widerspiegelte, ist somit von Dominanzeffekten oder einer größeren Anzahl anxiogener Faktoren auszugehen.

Die Erzeugung einer frei segregierenden F2-Generation aus divergierenden, ingezüchteten Populationen ermöglicht die Abgrenzung von nicht-kausalen, koselektierten Charakteristika der Ausgangstiere sowie die Korrelation von (Endo)Phäno- und Genotypen (Mormede et al., 2002). Das Studium einer aus HAB/LAB-Inzuchtratten erzeugten F2-Generation zeigte, dass Angst- und Depressionsparameter sowie die HPA-Achsen-Aktivität kausal voneinander unabhängig sind. Dies bestätigte die Ergebnisse der Studien von Solberg et al. (2003), die ebenso in einer frei segregierenden Population von Wistar Kyoto- und Fisher 344-Ratten diese Abhängigkeiten nicht mehr zeigen konnten. Ebenso wurden in dieser Studie starke Effekte der Parentalgeneration gefunden. Großelterlich abhängige Parameter zeigten sich auch in der HAB/LAB-F2-Generation. Diese waren unter Betrachtung der berichteten Charakteristika von HAB- und LAB-Ratten (Projekt A 4) der Linie der männlichen Ausgangstiere zuzuordnen. Dass insbesondere auch paternale Effekte eine wichtige Rolle durch epigenetisches *Imprinting* spielen, wird erst seit kurzem vermehrt untersucht (Davies et al., 2005). Bestätigt hat sich durch die Richtung der veränderten Parameter, dass die Ausprägung der HAB/LAB-Charakteristika nicht durch das maternale Verhalten geprägt wird, trotz erhöhter basaler HPA-Achsen-Aktivität trächtiger HABs und deren ausgeprägterem mütterlichen Verhalten verglichen mit LABs (Neumann et al., 1998; Wigger et al., 2001).

Mehrere Studien erbrachten den Nachweis, dass AVP bzw. Polymorphismen im AVP-Gen und seiner Promotorregion zum angst- und komorbid depressionsbezogenen Verhalten sowie zur HPA-Achsen-Aktivität in HAB-Tieren beitragen (Keck et al., 2002; Murgatroyd et al., 2004; Wigger

et al., 2004, Projekt B 2.1). Die Genotyp-Phänotyp-Korrelation in der F2-Studie an HAB/LAB-Ratten erwies, dass die AVP-Allele und die untersuchten Parameter frei segregierten und damit nicht in direkter Abhängigkeit voneinander standen. Dies bestätigte die Daten der Untersuchung transgener HAB/LAB-Ratten bezüglich des AVP-Gens (Projekt C 1). Es zeigte aber auch, dass die Selektion auf einen einzigen Verhaltensparameter zu einer Anhäufung von Vulnerabilitätsfaktoren führte, die an HAB- und LAB-Ratten die Untersuchung der Grundlagen der Pathogenese von Angst, Depression, HPA-Achsen-Aktivität und weiteren damit einhergehenden Faktoren *en bloc* erlaubt.

Jedes Genprodukt ist Teil von komplexen und interaktiven Prozessen, die nicht nur auf der genetischen Prädisposition der konstitutiven Proteine beruhen, sondern durch sowohl weitere genetische als auch umweltbedingte Einflüsse modifiziert werden (Mormede et al., 2002). So ist das erfasste Verhalten das Abbild des momentanen Zustands der genetischen Prädisposition, der erworbenen Verhaltensadaptation, der akuten psychobiologischen Situation (Tageszeit, Ernährungslage, sozialer Status usw.) sowie den Testbedingungen selbst. Auch bei HAB/LAB-Ratten konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Ausprägung des Angstverhaltens sowie der HPA-Achsen-Aktivität von Stressoreinwirkung in der prä- und postnatalen Phase abhängig ist (Neumann et al., 2005b; Bosch et al., 2006). Die Art der Veränderung wiederum stand jedoch in Bezug zur genetischen Prädisposition. Dies unterstreicht die Notwendigkeit von optimal standardisierten Testumgebungen und offenbart die Problematik der Käfigeffekte in vorliegender Studie. Dass in diesem Zusammenhang soziale Interaktionen innerhalb der Gruppe eines Käfigs einen großen Effekt haben könnten, wurde u.a. von Steimer und Driscoll (2005) in der Untersuchung von Roman High- und Roman Low-Avoidance-Ratten postuliert. In der wiederholten Testung des „*biobehavioural profile*“ – der Ausprägung des für eine Linie typischen Charakters – und des „*personality profile*“ – des momentanen Phänotyps eines Individuums – zeigte sich keine Korrelation über die Zeit innerhalb der Individuen, aber eine klare Linienzuordnung in der Gesamtbetrachtung aller Tiere. Während diese Plastizität einen unbedingten Überlebensvorteil durch die mögliche Adaptation an veränderte Umweltbedingungen selbst innerhalb einer stark selektierten Subpopulation darstellt (Neumann et al., 2005b; Bosch et al., 2006), erhöht dies jedoch auch die Komplexität der Zusammenhänge von genetischer Grundlage und Verhalten und deren Erforschung um ein Vielfaches (Steimer und Driscoll, 2005).

Nicht wenige F2- und QTL-Studien der letzten Jahre an wohletablierten, den HAB/LAB-Ratten ähnlichen Tiermodellen unterstreichen die Ernüchterung und die Einsicht in die Komplexität der Verhaltensgenetik einerseits und andererseits die hohen technischen Hürden dieser Projekte. Die Untersuchung von über 1600 F2-Mäusen aus den DeFries-Linien in 4 Verhaltenstests ergab in der QTL-Analyse drei Chromosomen mit Kandidatenregionen, die jedoch alle verschiedenen Facetten von Angstverhalten, nicht aber eindeutig einem klar definierten Charakterzug „Angst“ zugeordnet werden konnten (Turri et al., 2001). Auch die Untersuchung einer F2-Generation aus 518 gekreuzten A7J- und C57BL/6J-Mäusen ergab Zusammenhänge zwischen Furchtverhalten und QTLs, diese waren jedoch weder innerhalb der verwandten Tests noch bei wiederholter Testung übereinstimmend mit dem beobachteten Verhalten korreliert (Gershenfeld und Paul, 1997).

Insgesamt ist die Schlussfolgerung von Aguilar et al. (2002) nach deren Untersuchung von 800 F2-Tieren, gezüchtet aus Roman High- und Roman Low-Avoidance-Ratten, nur zu unterstreichen: „(1) *Some relationships among variables taken from the same test can be considered trivial rather than relevant; (2) low correlations among variables apparently measuring the same phenomena are common among different tests; (3) (...) anxiety has a multifacetic nature that is differentially expressed, depending upon the specific conditions (i.e., type of test) under which it is evaluated.*“ Auch in der Untersuchung von HAB/LAB-F2-Ratten zeigten sich hohe Korrelationen (%Zeit in den OA mit %Eintritte in die OA sowie volle Eintritte in die OA der EPM; Daten nicht gezeigt), die auf Grund dieser Redundanz nicht in die Gesamtanalyse miteinbezogen wurden. Entsprechend Punkt 2 des obigen Zitats findet sich eine geringe Korrelation zwischen Angstverhalten auf der EPM und EPF. Dies zeigte, auch in Zusammenhang mit den Daten des Projekt C 1, dass die Mehrfacherhebung von Messgrößen einer bestimmten Kategorie vorteilhaft ist, um einerseits versuchstechnische Effekte von verhaltensbiologischen und physiologischen Prädispositionen zu unterscheiden. Noch elementarer kann durch die Erfassung der verschiedenen Facetten eines Verhaltens dessen Ausprägung als determinierter Charakterzug gegenüber einer momentanen Disposition verifiziert werden (Steimer und Driscoll, 2005).

Trotz aller ausgeführten Probleme und Untersuchungen zeigen aktuelle Studien aber auch, dass man sich unter Anwendung neuer Techniken (*ultra-fine mapping* und *haplotype reconstruction*-Algorithmus) bei genügend großer Stichprobenzahl einer Differenzierung aller Parameter und den zugrunde liegenden Genen annähern kann (Darvasi, 2005). So konnte – im Gegensatz zu vorliegender Studie des AVP-Gens – in der Untersuchung von SNP-basierten Haplotypen zweier Patientengruppen ein Polymorphismus im V1b-Rezeptor als überrepräsentiert in den Kontrollgruppen und damit protektiv gegen Depression identifiziert werden (van West et al., 2004). Insbesondere diese Methode erlaubte die Identifizierung der multiallelischen Ausprägung eines Gens in nicht-selektierten humanen Gruppen. Mit der Identifizierung von fast 4 Millionen SNPs innerhalb des humanen Genoms und der Verfügbarkeit von Gen-Chips, die die Erfassung von bis zu 500000 SNPs in einer einzigen Probe zulassen, wird somit selbst die Entschlüsselung der komplexen psychiatrischen Erkrankungen nur noch eine Frage der Zeit sein (Gunderson et al., 2006). Ob für die komplexgenetischen psychiatrischen Erkrankungen jedoch SNPs oder auch Haplotypen existieren, die, wie postuliert, mehr als 10 % zur Ausprägung der jeweiligen klinischen Erscheinungsbilder beitragen oder nicht vielmehr, wie ebenfalls berichtet, weniger als 1 %, ist nicht vorauszusagen (Botstein und Risch, 2003; Levinson, 2005b).

So war es in vorliegender Studie auf Grund der immer noch limitierten molekular-genetischen Methoden notwendig, sich einzelnen, auf Hypothesen basiert selektierten Kandidatengenen zu widmen (Levinson, 2005a). Diese ersten Korrelationsanalysen erwiesen, dass die Wirkgröße des AVP-Gens *per se* auf die Ausprägung der untersuchten Parameter gering ist und unterstreichen die komplexen Zusammenhänge von Genetik und diskreten phänotypischen Erscheinungsbildern. Sobald molekular-genetische sowie statistische Methoden eine standardisierte Genexpressionsstudie für das gesamte Genom zulassen, wird der nächste Schritt anhand der

vorliegenden Ergebnisse sein, Kandidatensystem bzw. Kandidatennetzwerke eingehender zu studieren. So werden die Daten vorliegender Studie in diesem Zusammenhang durch die Differenzierung der HAB/LAB-Charakteristika in der F2-Generation die Bildung von Subpopulationen erlauben, die nach wie vor bestimmte Komorbiditäten aufweisen. Diesbezügliche Untersuchungen werden – auch im Vergleich zu HAB- und LAB-Ratten – das Auffinden von Haplotypen bzw. SNP-Kombinationen ermöglichen, die für die genetische Prädisposition der Emotionalität und neuroendokrinen Charakteristika von HAB/LAB-Ratten grundlegend sind und damit für Angst, Depression, Stressvulnerabilität und deren Pathogenese.

IV. Zusammenfassung

Die Aufgabe der psychiatrischen Grundlagenforschung ist die Dissektion von verhaltensbiologischen, neuroendokrinen, neuronalen, molekularen und genetischen Phänomenen, die zur Vulnerabilität für und Genese von Psychopathologien beitragen. Darauf basierend sollen innovative Therapieansätze und auch Heilungsmöglichkeiten geschaffen werden. Das zentrale Element der präklinischen Forschung sind verlässliche Modelle sowohl für die Abbildung klinischer Erscheinungsbilder in nicht-humanen Spezies als auch für die die Psychopathologien auslösenden Faktoren und deren Untersuchung mit stetig besseren Techniken.

Die vorliegende Arbeit veranschaulicht, dass die kombinierte Anwendung eines breiten Spektrums von verhaltensbiologischen und molekular-genetischen Methoden zur Untersuchung eines Kandidatenproteins bzw. -gens in einem etablierten Tiermodell die umfassende Analyse seines Einflusses auf die Ausprägung von psychopathologischen (Endo-)Phänotypen erlaubt.

AVP nimmt in der Regulation von Emotionalität, HPA-Achsen-Aktivität und Kognition eine zentrale und facettenreiche Rolle ein (Engelmann et al., 1996; Aguilera und Rabadan-Diehl, 2000; Landgraf und Holsboer, 2005; Landgraf, 2006). Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Neuropeptids sowie des AVP-Gens auf die Ausprägung von Psychopathologien am HAB/LAB-Rattenmodell zu charakterisieren.

Die Untersuchung der kognitiven Kapazität im sozialen Kontext offenbarte ein länger anhaltendes Erinnerungsvermögen von HAB-Tieren (Projekt A 1), was im Zusammenhang mit septo-hippocampalen Strukturen auch für Patienten berichtet wurde (McNaughton, 1997; Watson und Andrews, 2002). Dem entsprechend konnte die grundlegende Rolle des septalen AVP-Systems in der pathologisch überdurchschnittlichen Kognitionsleistung durch dessen selektive Manipulation nachgewiesen werden (Projekt B 1.1). Die Funktion und Interaktion von AVP und seines V1a-Rezeptors bei der Ausbildung des sozialen Gedächtnisses wurden außerdem in der physiologischen sowie pathophysiologischen Verfügbarkeit an Wistar-Ratten näher beleuchtet (Projekt B 1.2).

Die weitere Charakterisierung des HAB/LAB-Rattenmodells ermöglichte neue Einblicke in die neuroendokrine und neuronale Aktivität in sozialen Stresssituationen (Projekt A 2). Die mediale Amygdala und das mediale präoptische Areal wurden dabei als neue Kandidatenregionen für die Untersuchung der Stressvulnerabilität von psychopathologisch hyperängstlichen HAB-Ratten und ein neuartiges Phänomen der HPA-Achsen-Aktivität in Zusammenhang mit aktiver bzw. passiver Stressbewältigungsstrategie etabliert, wie es sich auch in jüngsten Humanstudien zeigte (Wirth et al., 2005). Ebenso wurde durch den Nachweis von Anhedonie in HAB-Ratten, dem zweiten Hauptsymptom bei depressiven Erkrankungen (Anisman und Matheson, 2005), eine Basis für weitere

Studien der Grundlagen von depressionsähnlichem Verhalten und Psychopathologien geschaffen (Projekt A 3).

Die zentralen Untersuchungen dieser Arbeit galten des Weiteren der Funktion von AVP im PVN in Zusammenhang mit Emotionalität und HPA-Achsen-(Dys-)Funktion (Landgraf, 2001; Keck et al., 2002). Durch selektive Suppression des AVP-Systems im PVN von HAB-Ratten wurde die Beteiligung dieses Neuropeptids an der Ausprägung des psychopathologisch übermäßigen Angstverhaltens wie auch der depressionsindizierenden Parameter nachgewiesen (Projekt B 2.1). Während die intracerebrale Gabe von AVP auch in LABs deutlich anxiogen wirkte, konnten in den hypoängstlichen Ratten weder das Angstverhalten noch die neuroendokrinen Parameter durch die selektive Überexpression von AVP im PVN beeinflusst werden (Projekte B 2.2 und 2.3). Als in diesem Zusammenhang mögliche modulierende Faktoren wurden intra- und extrazelluläre Einflüsse identifiziert: Die Rolle eines möglichen intrazellulären Repressors für die AVP-Expression, CBF-A, bleibt dabei fraglich, wohingegen in der Untersuchung von Neurotransmittern im PVN mittels Mikrodialyse GABA, Glutamat, Aspartat und Taurin als extrazelluläre Modifikatoren identifiziert wurden (Projekte A 5 und 6).

Das Studium des quantitativen Einflusses von Mutationen im AVP-Gen von HABs auf die Ausprägung von angst- und depressionsbezogenem Verhalten sowie auf neuroendokrine Parameter wurde durch die Kombination von klassischen Zuchtmethoden mit genetischen SNP-Analysen erreicht. Während sich sowohl das *backcrossing*-Protokoll als auch die Erzeugung einer frei segregierenden F2-Generation als funktionell wertvoll erwiesen haben (Projekte C 1 und 2), ließ sich kein direkter Zusammenhang der Mutationen im AVP-Gen von HABs *per se* mit den untersuchten verhaltensbiologischen und neuroendokrinen Parametern erfassen. Dennoch bilden die vorliegenden Daten – in Anbetracht der Entwicklung neuer genetischer Untersuchungsverfahren (Gunderson et al., 2006) – den Ausgangspunkt für das Studium neuer Kandidatensysteme bzw. Kandidatennetzwerke, die für Emotionalität und neuroendokrine Charakteristika von HAB/LAB-Ratten und damit für Stressvulnerabilität, Angst, Depression und deren Pathogenese grundlegend sind.

Neben dem validierten HAB/LAB-Rattenmodell wurde in den letzten Jahren ein HAB/LAB-Mausmodell erzeugt und eingehend charakterisiert (Kromer et al., 2005). Auch in dieser Spezies gibt es Hinweise auf die Rolle von AVP in der differentiellen Regulation von Kognition und Emotionalität (Bunck et al., unveröffentlicht). Ebenso wie in HAB/LAB-Ratten wird in HAB/LAB-Mäusen eine frei segregierende F2-Generation Korrelationsstudien zu Koselektion und Komorbidität sowie deren genetische Grundlagen erlauben (Keßler et al., unveröffentlicht). Erste umfassende genetische Analysen lassen jedoch bereits die hohe Komplexität der Genotyp-Phänotyp-Interaktionen erahnen (Czibere et al., unveröffentlicht).

So werden zukünftige Studien an HAB/LAB-Ratten wie auch HAB/LAB-Mäusen im Spannungsfeld Verhaltensbiologie/Genetik den Beitrag des zentralnervalen AVP-Systems sowie weiterer Kandidatengene und deren Produkte zur Regulation von Kognition, Emotionalität und HPA-Achsen-Aktivität im gesamten Spektrum von physiologischer Funktion bis hin zu pathophysiologischer Dysfunktion weiter entschlüsseln (Landgraf et al., 2006).

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes virales Vektor
ACTH	Adrenocorticotropin
AS	<i>antisense</i> Oligodeoxynucleotid-Sequenzen
AVP	Arginin-Vasopressin
BC	<i>Backcrossing</i>
CORT	Corticosteron
CRH	<i>Corticotropin releasing</i> -Hormon
DaLi	<i>Dark-light box</i>
DEX	Dexamethason
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPF	<i>Elevated platform</i>
EPM	<i>Elevated plusmaze</i>
FITC	Fluorescein-markierte
FS	<i>Forced swimming</i>
GABA	γ-Aminobuttersäure
HAB	<i>High anxiety-related behaviour</i>
HPA	<i>Hypothalamus-pituitary-adrenocortical</i>
icv	intracerebroventriculär
IEI	Interexpositionsintervall
ip	intraperitoneal
LAB	<i>Low anxiety-related behaviour</i>
MS	<i>missense</i> Oligodeoxynucleotid-Sequenzen
NAB	<i>Normal anxiety-related behaviour</i>
RNA	Ribonucleinsäure
OA	offene Arme
ODN	Oligodeoxynucleotid
PBS	Phosphatpufferlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PVN	paraventriculärer Nucleus des Hypothalamus
QTL	<i>Quantitative trait loci</i>
SD	<i>Social defeat</i>
SDis	<i>Social discrimination</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SNP	<i>Single nucleotide</i> -Polymorphismus
SON	Nucleus supraopticus
SSC	<i>Standard saline citrate</i>
USV	Ultraschallvokalisation
V1R	AVP V1-Rezeptor
V1aR	AVP V1a-Rezeptor
V1bR	AVP V1b-Rezeptor
V2R	AVP V2-Rezeptor

V. Literaturverzeichnis

- Aguilar, R., Gil, L., Flint, J., Gray, J. A., Dawson, G. R., Driscoll, P., Gimenez-Llort, L., Escorihuela, R. M., Fernandez-Teruel, A. and Tobena, A., 2002. Learned fear, emotional reactivity and fear of heights: a factor analytic map from a large F(2) intercross of Roman rat strains. *Brain Res Bull.* 57, 17-26.
- Aguilera, G. and Rabadan-Diehl, C., 2000. Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. *Regul Pept.* 96, 23-29.
- Albeck, D. S., McKittrick, C. R., Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., Nikulina, J., McEwen, B. S. and Sakai, R. R., 1997. Chronic social stress alters levels of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin mRNA in rat brain. *J Neurosci.* 17, 4895-4903.
- Albert, D. J., Jonik, R. H. and Walsh, M. L., 1992. Hormone-dependent aggression in male and female rats: experiential, hormonal, and neural foundations. *Neurosci Biobehav Rev.* 16, 177-192.
- Aldenhoff, J., 1997. [Reflections on the psychobiology of depression]. *Nervenarzt.* 68, 379-389.
- Allan, S. and Gilbert, P., 1997. Submissive behaviour and psychopathology. *Br J Clin Psychol.* 36 (Pt 4), 467-488.
- Anisman, H. and Matheson, K., 2005. Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. *Neurosci Biobehav Rev.* 29, 525-546.
- Appenrodt, E., Schnabel, R. and Schwarzberg, H., 1998. Vasopressin administration modulates anxiety-related behavior in rats. *Physiol Behav.* 64, 543-547.
- Balfour, D. J., Khullar, A. K. and Longden, A., 1975. Effects of nicotine on plasma corticosterone and brain amines in stressed and unstressed rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 3, 179-184.
- Bali, B. and Kovacs, K. J., 2003. GABAergic control of neuropeptide gene expression in parvocellular neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Eur J Neurosci.* 18, 1518-1526.
- Bandler, R., Price, J. L. and Keay, K. A., 2000. Brain mediation of active and passive emotional coping. In: Mayer, E. A. and Saper, C. B. (Eds.), *Progress in Brain Research*, vol.122. Elsevier Science, pp. 333-348.
- Bennett, B. and Johnson, T. E., 1998. Development of congenics for hypnotic sensitivity to ethanol by QTL-marker-assisted counter selection. *Mamm Genome.* 9, 969-974.
- Berridge, K. C. and Robinson, T. E., 1998. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev.* 28, 309-369.
- Bhattacharya, S. K., Bhattacharya, A. and Chakrabarti, A., 1998. Anxiogenic activity of intraventricularly administered arginine vasopressin in the rat. *Biogenic Amines.* 14, 367-385.
- Bielsky, I. F., Hu, S. B., Ren, X., Terwilliger, E. F. and Young, L. J., 2005. The V1a vasopressin receptor is necessary and sufficient for normal social recognition: a gene replacement study. *Neuron.* 47, 503-513.
- Bielsky, I. F., Hu, S. B., Szegda, K. L., Westphal, H. and Young, L. J., 2004. Profound impairment in social recognition and reduction in anxiety-like behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology.* 29, 483-493.
- Bielsky, I. F. and Young, L. J., 2004. Oxytocin, vasopressin, and social recognition in mammals. *Peptides.* 25, 1565-1574.
- Bitner, R. S., Nikkel, A. L., Otte, S., Martino, B., Barlow, E. H., Bhatia, P., Stewart, A. O., Brioni, J. D., Decker, M. W. and Moreland, R. B., 2006. Dopamine D4 receptor signaling in the rat paraventricular hypothalamic nucleus: Evidence of natural coupling involving immediate early gene induction and mitogen activated protein kinase phosphorylation. *Neuropharmacology.* 50, 521-531.
- Bjorkqvist, K., 2001. Social defeat as a stressor in humans. *Physiol Behav.* 73, 435-442.

- Blanchard, D. C., Canteras, N. S., Markham, C. M., Pentkowski, N. S. and Blanchard, R. J., 2005. Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: Effects on responsivity to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat. *Neurosci Biobehav Rev.*
- Bohus, B., Benus, R. F., Fokkema, D. S., Koolhaas, J. M., Nyakas, C., van Oortmerssen, G. A., Prins, A. J., de Ruiter, A. J., Scheurink, A. J. and Steffens, A. B., 1987. Neuroendocrine states and behavioral and physiological stress responses. *Prog Brain Res.* 72, 57-70.
- Bosch, O. J., Kromer, S. A. and Neumann, I. D., 2006. Prenatal stress: opposite effects on anxiety and hypothalamic expression of vasopressin and corticotropin-releasing hormone in rats selectively bred for high and low anxiety. *Eur J Neurosci.* 23, 541-551.
- Botstein, D. and Risch, N., 2003. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet.* 33 Suppl, 228-237.
- Brenes Saenz, J. C., Villagra, O. R. and Fornaguera Trias, J., 2006. Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. *Behav Brain Res.*
- Brunelli, S. A., 2005. Selective Breeding for an Infant Phenotype: Rat Pup Ultrasonic Vocalization (USV). *Behav Genet.* 35, 53-65.
- Bubser, M. and Deutch, A. Y., 1998. Thalamic paraventricular nucleus neurons collateralize to innervate the prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Brain Res.* 787, 304-310.
- Burman, O. H. and Mendl, M., 2002. Recognition of conspecific odors by laboratory rats (*Rattus norvegicus*) does not show context specificity. *J Comp Psychol.* 116, 247-252.
- Buwalda, B., de Boer, S. F., Schmidt, E. D., Felszeghy, K., Nyakas, C., Sgoifo, A., Van der Vegt, B. J., Tilders, F. J., Bohus, B. and Koolhaas, J. M., 1999. Long-lasting deficient dexamethasone suppression of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activation following peripheral CRF challenge in socially defeated rats. *J Neuroendocrinol.* 11, 513-520.
- Cabrera, S. M., Chavez, C. M., Corley, S. R., Kitto, M. R. and Butt, A. E., 2006. Selective lesions of the nucleus basalis magnocellularis impair cognitive flexibility. *Behav Neurosci.* 120, 298-306.
- Caffe, A. R., van Leeuwen, F. W. and Luiten, P. G., 1987. Vasopressin cells in the medial amygdala of the rat project to the lateral septum and ventral hippocampus. *J Comp Neurol.* 261, 237-252.
- Campbell, B. M., Morrison, J. L., Walker, E. L. and Merchant, K. M., 2004. Differential regulation of behavioral, genomic, and neuroendocrine responses by CRF infusions in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 77, 447-455.
- Campbell, T., Lin, S., DeVries, C. and Lambert, K., 2003. Coping strategies in male and female rats exposed to multiple stressors. *Physiol Behav.* 78, 495-504.
- Carobrez, A. P. and Bertoglio, L. J., 2005. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.*
- Carr, L. G., Habegger, K., Spence, J. P., Liu, L., Lumeng, L. and Foroud, T., 2006. Development of Congenic Rat Strains for Alcohol Consumption Derived from the Alcohol-Preferring and Nonpreferring Rats. *Behav Genet.* 1-6.
- Castanon, N., Perez-Diaz, F. and Mormede, P., 1995. Genetic analysis of the relationships between behavioral and neuroendocrine traits in Roman High and Low Avoidance rat lines. *Behav Genet.* 25, 371-384.
- Charmandari, E., Tsigos, C. and Chrousos, G., 2005. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol.* 67, 259-284.
- Chen, S. W., Kong, W. X., Zhang, Y. J., Li, Y. L., Mi, X. J. and Mu, X. S., 2004. Possible anxiolytic effects of taurine in the mouse elevated plus-maze. *Life Sci.* 75, 1503-1511.
- Chen, X. and Herbert, J., 1995. Alterations in sensitivity to intracerebral vasopressin and the effects of a V1a receptor antagonist on cellular, autonomic and endocrine responses to repeated stress. *Neuroscience.* 64, 687-697.
- Chrousos, G. P., 1998. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann N Y Acad Sci.* 851, 311-335.
- Cole, B. J., Hillmann, M., Seidelmann, D., Klewer, M. and Jones, G. H., 1995. Effects of benzodiazepine receptor partial inverse agonists in the elevated plus maze test of anxiety in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 121, 118-126.
- Conover, D. O. and Munch, S. B., 2002. Sustaining fisheries yields over evolutionary time scales. *Science.* 297, 94-96.
- Coolen, L. M. and Wood, R. I., 1998. Bidirectional connections of the medial amygdaloid nucleus in the syrian hamster brain: simultaneous anterograde and retrograde tract tracing. *The journal of comparative neurology.* 399, 189-209.

- Courvoisier, H., Moisan, M. P., Sarrieau, A., Hendley, E. D. and Mormede, P., 1996. Behavioral and neuroendocrine reactivity to stress in the WKHA/WKY inbred rat strains: a multifactorial and genetic analysis. *Brain Res.* 743, 77-85.
- Crawley, J. and Goodwin, F. K., 1980. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav.* 13, 167-170.
- Crooke, S. T., 2004. Progress in antisense technology. *Annu Rev Med.* 55, 61-95.
- Cryan, J. F. and Kaupmann, K., 2005. Don't worry 'B' happy!: a role for GABA(B) receptors in anxiety and depression. *Trends Pharmacol Sci.* 26, 36-43.
- Cryan, J. F. and Mombereau, C., 2004. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psychiatry.* 9, 326-357.
- Csaki, A., Kocsis, K., Halasz, B. and Kiss, J., 2000. Localization of glutamatergic/aspartatergic neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus studied by retrograde transport of [3H]D-aspartate autoradiography. *Neuroscience.* 101, 637-655.
- Daly, T. M., 2004. Overview of adeno-associated viral vectors. *Methods Mol Biol.* 246, 157-165.
- Darvasi, A., 2005. Dissecting complex traits: the geneticists' "Around the world in 80 days". *Trends Genet.* 21, 373-376.
- Davies, W., Isles, A. R. and Wilkinson, L. S., 2005. Imprinted gene expression in the brain. *Neurosci Biobehav Rev.* 29, 421-430.
- Davis, M. and Whalen, P. J., 2001. The amygdala: vigilance and emotion. *Mol Psychiatry.* 6, 13-34.
- De Goeij, D. C., Dijkstra, H. and Tilders, F. J., 1992. Chronic psychosocial stress enhances vasopressin, but not corticotropin-releasing factor, in the external zone of the median eminence of male rats: relationship to subordinate status. *Endocrinology.* 131, 847-853.
- de Haan, M., Gunnar, M. R., Tout, K., Hart, J. and Stansbury, K., 1998. Familiar and novel contexts yield different associations between cortisol and behavior among 2-year-old children. *Dev Psychobiol.* 33, 93-101.
- de Kloet, E. R., Joels, M. and Holsboer, F., 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci.* 6, 463-475.
- De Vries, G. J. and Buijs, R. M., 1983. The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic innervation of the rat brain with special reference to the lateral septum. *Brain Res.* 273, 307-317.
- de Wied, D., Diamant, M. and Fodor, M., 1993. Central nervous system effects of the neurohypophyseal hormones and related peptides. *Front Neuroendocrinol.* 14, 251-302.
- Degroot, A., Wade, M., Salhoff, C., Davis, R. J., Tzavara, E. T. and Nomikos, G. G., 2004. Exposure to an elevated platform increases plasma corticosterone and hippocampal acetylcholine in the rat: reversal by chlordiazepoxide. *Eur J Pharmacol.* 493, 103-109.
- Diamant, M., Baars, A. M., Kovacs, G. L. and De Wied, D., 1994. Barrel rotation induced by central arginine⁸-vasopressin treatment: involvement of neurohypophyseal peptide receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* 47, 27-32.
- Diamant, M. and De Wied, D., 1993. Differential effects of centrally injected AVP on heart rate, core temperature, and behavior in rats. *Am J Physiol.* 264, R51-61.
- Dirks, A., Fish, E. W., Kikusui, T., van der Gugten, J., Groenink, L., Olivier, B. and Miczek, K. A., 2002. Effects of corticotropin-releasing hormone on distress vocalizations and locomotion in maternally separated mouse pups. *Pharmacol Biochem Behav.* 72, 993-999.
- Doris, A., Ebmeier, K. and Shajahan, P., 1999. Depressive illness. *Lancet.* 354, 1369-1375.
- Dorow, R., 1987. FG 7142 and its anxiety-inducing effects in humans. *Br J Clin Pharmacol.* 23, 781-782.
- Dorow, R., Horowski, R., Paschelke, G. and Amin, M., 1983. Severe anxiety induced by FG 7142, a beta-carboline ligand for benzodiazepine receptors. *Lancet.* 2, 98-99.
- Ebner, K., Rupniak, N. M., Saria, A. and Singewald, N., 2004. Substance P in the medial amygdala: emotional stress-sensitive release and modulation of anxiety-related behavior in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 4280-4285.
- Engelmann, M. and Landgraf, R., 1994. Microdialysis administration of vasopressin into the septum improves social recognition in Brattleboro rats. *Physiol Behav.* 55, 145-149.
- Engelmann, M., Landgraf, R. and Wotjak, C. T., 2004. The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol.* 25, 132-149.
- Engelmann, M. and Ludwig, M., 2004. The activity of the hypothalamo -neurohypophysial system in response to acute stressor exposure: neuroendocrine and electrophysiological observations. *Stress.* 7, 91-96.

- Engelmann, M., Ludwig, M. and Landgraf, R., 1992. Microdialysis administration of vasopressin and vasopressin antagonists into the septum during pole-jumping behavior in rats. *Behav Neural Biol.* 58, 51-57.
- Engelmann, M., Wotjak, C. T. and Landgraf, R., 1995. Social discrimination procedure: an alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rats. *Physiol Behav.* 58, 315-321.
- Engelmann, M., Wotjak, C. T., Neumann, I., Ludwig, M. and Landgraf, R., 1996. Behavioral consequences of intracerebral vasopressin and oxytocin: focus on learning and memory. *Neurosci Biobehav Rev.* 20, 341-358.
- Everts, H. G. and Koolhaas, J. M., 1999. Differential modulation of lateral septal vasopressin receptor blockade in spatial learning, social recognition, and anxiety-related behaviors in rats. *Behav Brain Res.* 99, 7-16.
- Ferguson, J. N., Aldag, J. M., Insel, T. R. and Young, L. J., 2001. Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *J Neurosci.* 21, 8278-8285.
- Ferguson, J. N., Young, L. J. and Insel, T. R., 2002. The neuroendocrine basis of social recognition. *Front Neuroendocrinol.* 23, 200-224.
- Ferris, C. F., Lu, S. F., Messenger, T., Guillon, C. D., Heindel, N., Miller, M., Koppel, G., Robert Bruns, F. and Simon, N. G., 2006. Orally active vasopressin V1a receptor antagonist, SRX251, selectively blocks aggressive behavior. *Pharmacol Biochem Behav.*
- Fish, E. W., Faccidomo, S., Gupta, S. and Miczek, K. A., 2004. Anxiolytic-like effects of escitalopram, citalopram, and R-citalopram in maternally separated mouse pups. *J Pharmacol Exp Ther.* 308, 474-480.
- Flaherty, L., 1981. Congenic strains. *The mouse in biomedical research*, vol.1. Academic Press, pp. 223-239.
- Flannelly, K. and Lore, R., 1977. The influence of females upon aggression in domesticated male rats (*Rattus norvegicus*). *Anim Behav.* 25, 654-659.
- Förstl, H., Hautzinger, M. and Roth, G., 2006. *Neurobiologie psychischer Störungen*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Francis, D. D., Szegda, K., Campbell, G., Martin, W. D. and Insel, T. R., 2003. Epigenetic sources of behavioral differences in mice. *Nat Neurosci.* 6, 445-446.
- Frank, E., Salchner, P., Aldag, J. M., Salome, N., Singewald, N., Landgraf, R. and Wigger, A., 2006. Genetic predisposition to anxiety-related behavior determines coping style, neuroendocrine responses, and neuronal activation during social defeat. *Behav Neurosci.* 120, 60-71.
- Fuchs, E. and Gould, E., 2000. Mini-review: in vivo neurogenesis in the adult brain: regulation and functional implications. *Eur J Neurosci.* 12, 2211-2214.
- Gerlai, R., 1996. Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *Trends Neurosci.* 19, 177-181.
- Gershenfeld, H. K. and Paul, S. M., 1997. Mapping quantitative trait loci for fear-like behaviors in mice. *Genomics.* 46, 1-8.
- Ghirardello, S., Malattia, C., Scagnelli, P. and Maghnie, M., 2005. Current perspective on the pathogenesis of central diabetes insipidus. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 18, 631-645.
- Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Metzker, M. L., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., Scherer, S., Scott, G., Steffen, D., Worley, K. C., Burch, P. E., Okwuonu, G., Hines, S., Lewis, L., DeRamo, C., Delgado, O., Dugan-Rocha, S., Miner, G., Morgan, M., Hawes, A., Gill, R., Celera, Holt, R. A., Adams, M. D., Amanatides, P. G., Baden-Tillson, H., Barnstead, M., Chin, S., Evans, C. A., Ferriera, S., Fosler, C., Glodek, A., Gu, Z., Jennings, D., Kraft, C. L., Nguyen, T., Pfannkoch, C. M., Sitter, C., Sutton, G. G., Venter, J. C., Woodage, T., Smith, D., Lee, H. M., Gustafson, E., Cahill, P., Kana, A., Doucette-Stamm, L., Weinstock, K., Fectel, K., Weiss, R. B., Dunn, D. M., Green, E. D., Blakesley, R. W., Bouffard, G. G., De Jong, P. J., Osoegawa, K., Zhu, B., Marra, M., Schein, J., Bosdet, I., Fjell, C., Jones, S., Krzywinski, M., Mathewson, C., Siddiqui, A., Wye, N., McPherson, J., Zhao, S., Fraser, C. M., Shetty, J., Shatsman, S., Geer, K., Chen, Y., Abramzon, S., Nierman, W. C., Havlak, P. H., Chen, R., Durbin, K. J., Egan, A., Ren, Y., Song, X. Z., Li, B., Liu, Y., Qin, X., Cawley, S., Cooney, A. J., D'Souza, L. M., Martin, K., Wu, J. Q., Gonzalez-Garay, M. L., Jackson, A. R., Kalafus, K. J., McLeod, M. P., Milosavljevic, A., Virk, D., Volkov, A., Wheeler, D. A., Zhang, Z., Bailey, J. A., Eichler, E. E., Tuzun, E., Birney, E., Mongin, E., Ureta-Vidal, A., Woodwark, C., Zdobnov, E., Bork, P., Suyama, M., Torrents, D., Alexandersson, M., Trask, B. J., Young, J. M., Huang, H., Wang, H., Xing, H., Daniels, S., Gietzen, D., Schmidt, J., Stevens, K., Vitt, U., Wingrove, J., Camara, F., Mar Alba, M., Abril, J. F., Guigo, R., Smit, A., Dubchak, I., Rubin, E. M., Couronne, O., Poliakov, A., Hubner, N., Ganten, D., Goesele, C., Hummel, O., Kreitler, T., Lee, Y. A., Monti, J., Schulz, H., Zimdahl, H., Himmelbauer, H., Lehrach, H., Jacob, H. J., Bromberg, S., Gullings-Handley, J., Jensen-Seaman, M. I., Kwitek, A. E., Lazar, J., Pasko, D., Tonellato, P. J., Twigger, S., Ponting, C. P., Duarte, J. M., Rice, S., Goodstadt, L.,

- Beatson, S. A., Emes, R. D., Winter, E. E., Webber, C., Brandt, P., Nyakatura, G., Adetobi, M., Chiaromonte, F., Elnitski, L., Eswara, P., Hardison, R. C., Hou, M., Kolbe, D., Makova, K., Miller, W., Nekrutenko, A., Riemer, C., Schwartz, S., Taylor, J., Yang, S., Zhang, Y., Lindpaintner, K., Andrews, T. D., Caccamo, M., Clamp, M., Clarke, L., Curwen, V., Durbin, R., Eyra, E., Searle, S. M., Cooper, G. M., Batzoglou, S., Brudno, M., Sidow, A., Stone, E. A., Payseur, B. A., Bourque, G., Lopez-Otin, C., Puente, X. S., Chakrabarti, K., Chatterji, S., Dewey, C., Pachter, L., Bray, N., Yap, V. B., Caspi, A., Tesler, G., Pevzner, P. A., Haussler, D., Roskin, K. M., Baertsch, R., Clawson, H., Furey, T. S., Hinrichs, A. S., Karolchik, D., Kent, W. J., Rosenbloom, K. R., Trumbower, H., Weirauch, M., Cooper, D. N., Stenson, P. D., Ma, B., Brent, M., Arumugam, M., Shteynberg, D., Copley, R. R., Taylor, M. S., Riethman, H., Mudunuri, U., Peterson, J., Guyer, M., Felsenfeld, A., Old, S., Mockrin, S. and Collins, F., 2004. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*. 428, 493-521.
- Gilbert, P. and Allan, S., 1998. The role of defeat and entrapment (arrested flight) in depression: an exploration of an evolutionary view. *Psychol Med*. 28, 585-598.
- Gold, P. W., Goodwin, F. K. and Reus, V. I., 1978. Vasopressin in affective illness. *Lancet*. 1, 1233-1236.
- Grady, C. L. and Keightley, M. L., 2002. Studies of altered social cognition in neuropsychiatric disorders using functional neuroimaging. *Can J Psychiatry*. 47, 327-336.
- Grant, E. C. and Mackintosh, J. H., 1963. A comparison of the social postures of some common laboratory rodents. *Behaviour*, 246-259.
- Greenberg, D. A., Abreu, P. and Hodge, S. E., 1998. The power to detect linkage in complex disease by means of simple LOD-score analyses. *Am J Hum Genet*. 63, 870-879.
- Griebel, G. and Gal, C. S., 2005. Non-peptide vasopressin V1b receptor antagonists. In: Steckler, T. et al. (Eds.), *Handbook of Stress and the Brain*, vol.15. Elsevier, pp. 409-421.
- Griebel, G., Simiand, J., Serradeil-Le Gal, C., Wagnon, J., Pascal, M., Scatton, B., Maffrand, J. P. and Soubrie, P., 2002. Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 6370-6375.
- Griffiths, J., Shanks, N. and Anisman, H., 1992. Strain-specific alterations in consumption of a palatable diet following repeated stressor exposure. *Pharmacol Biochem Behav*. 42, 219-227.
- Guillon, G., Derick, S., Pena, A., Cheng, L. L., Stoev, S., Seyer, R., Morgat, J. L., Barberis, C., Gal, C. S., Wagnon, J. and Manning, M., 2004. The discovery of novel vasopressin V1b receptor ligands for pharmacological, functional and structural investigations. *J Neuroendocrinol*. 16, 356-361.
- Gunderson, K. L., Kuhn, K. M., Steemers, F. J., Ng, P., Murray, S. S. and Shen, R., 2006. Whole-genome genotyping of haplotype tag single nucleotide polymorphisms. *Pharmacogenomics*. 7, 641-648.
- Halasz, J., Liposits, Z., Kruk, M. R. and Haller, J., 2002. Neural background of glucocorticoid dysfunction-induced abnormal aggression in rats: involvement of fear- and stress-related structures. *Eur J Neurosci*. 15, 561-569.
- Hascoet, M., Bourin, M. and Dhonnchadha, B. A., 2001. The mouse light-dark paradigm: a review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 25, 141-166.
- Hawker, D. S. and Boulton, M. J., 2000. Twenty years' research on peer victimization and psychosocial maladjustment: a meta-analytic review of cross-sectional studies. *J Child Psychol Psychiatry*. 41, 441-455.
- Heinrichs, S. C., Pich, E. M., Miczek, K. A., Britton, K. T. and Koob, G. F., 1992. Corticotropin-releasing factor antagonist reduces emotionality in socially defeated rats via direct neurotropic action. *Brain Res*. 581, 190-197.
- Heinz, A., 1999. [Anhedonia--a general nosology surmounting correlate of a dysfunctional dopaminergic reward system?]. *Nervenarzt*. 70, 391-398.
- Helmreich, D. L., Itoi, K., Lopez-Figueroa, M. O., Akil, H. and Watson, S. J., 2001. Norepinephrine-induced CRH and AVP gene transcription within the hypothalamus: differential regulation by corticosterone. *Brain Res Mol Brain Res*. 88, 62-73.
- Henniger, M. S., Ohl, F., Holter, S. M., Weissenbacher, P., Toschi, N., Lorsch, P., Wigger, A., Spanagel, R. and Landgraf, R., 2000. Unconditioned anxiety and social behaviour in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res*. 111, 153-163.
- Herman, J. P. and Cullinan, W. E., 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci*. 20, 78-84.
- Herman, J. P., Cullinan, W. E., Ziegler, D. R. and Tasker, J. G., 2002. Role of the paraventricular nucleus microenvironment in stress integration. *Eur J Neurosci*. 16, 381-385.

- Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N. K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D. C. and Cullinan, W. E., 2003. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol.* 24, 151-180.
- Herman, J. P., Ostrander, M. M., Mueller, N. K. and Figueiredo, H., 2005. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 29, 1201-1213.
- Herman, J. P., Prewitt, C. M. and Cullinan, W. E., 1996. Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. *Crit Rev Neurobiol.* 10, 371-394.
- Herman, J. P., Thomas, G. J. and Gash, D. M., 1986. Behavioral characteristics of Roman high avoidance rats homozygous for diabetes insipidus (RHA: di/di). *Behav Brain Res.* 20, 27-38.
- Heuser, I., Yassouridis, A. and Holsboer, F., 1994. The combined dexamethasone/CRH test: a refined laboratory test for psychiatric disorders. *J Psychiatr Res.* 28, 341-356.
- Hitzemann, R., 2000. Animal models of psychiatric disorders and their relevance to alcoholism. *Alcohol Res Health.* 24, 149-158.
- 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.
- Hokfelt, T., Broberger, C., Xu, Z. Q., Sergeev, V., Ubink, R. and Diez, M., 2000. Neuropeptides--an overview. *Neuropharmacology.* 39, 1337-1356.
- Holsboer, F., 2000. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology.* 23, 477-501.
- Horn, T., Bauce, L., Landgraf, R. and Pittman, Q. J., 1995. Microdialysis with high NaCl causes central release of amino acids and dopamine. *J Neurochem.* 64, 1632-1644.
- Ideno, J., Mizukami, H., Honda, K., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Saito, T., Ishibashi, S. and Ozawa, K., 2003. Persistent phenotypic correction of central diabetes insipidus using adeno-associated virus vector expressing arginine-vasopressin in Brattleboro rats. *Mol Ther.* 8, 895-902.
- Insel, T. R. and Fernald, R. D., 2004. How the brain processes social information: searching for the social brain. *Annu Rev Neurosci.* 27, 697-722.
- Ising, M., Kunzel, H. E., Binder, E. B., Nickel, T., Modell, S. and Holsboer, F., 2005. The combined dexamethasone/CRH test as a potential surrogate marker in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 29, 1085-1093.
- Itoi, K., Helmreich, D. L., Lopez-Figueroa, M. O. and Watson, S. J., 1999. Differential regulation of corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene transcription in the hypothalamus by norepinephrine. *J Neurosci.* 19, 5464-5472.
- Ivell, R. and Richter, D., 1984. Structure and comparison of the oxytocin and vasopressin genes from rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81, 2006-2010.
- Jezova, D., Makatsori, A., Duncko, R., Moncek, F. and Jakubek, M., 2004. High trait anxiety in healthy subjects is associated with low neuroendocrine activity during psychosocial stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 28, 1331-1336.
- Jirikowski, G. F., Sanna, P. P., Maciejewski-Lenoir, D. and Bloom, F. E., 1992. Reversal of diabetes insipidus in Brattleboro rats: intrahypothalamic injection of vasopressin mRNA. *Science.* 255, 996-998.
- Kalin, N. H., Shelton, S. E. and Davidson, R. J., 2004. The role of the central nucleus of the amygdala in mediating fear and anxiety in the primate. *J Neurosci.* 24, 5506-5515.
- Kalisch, R., Salome, N., Platzer, S., Wigger, A., Czisch, M., Sommer, W., Singewald, N., Heilig, M., Berthele, A., Holsboer, F., Landgraf, R. and Auer, D. P., 2004. High trait anxiety and hyporeactivity to stress of the dorsomedial prefrontal cortex: a combined pHMRI and Fos study in rats. *Neuroimage.* 23, 382-391.
- Keck, M. E., Ohl, F., Holsboer, F. and Muller, M. B., 2005a. Listening to mutant mice: a spotlight on the role of CRF/CRF receptor systems in affective disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 29, 867-889.
- Keck, M. E., Sartori, S. B., Welt, T., Muller, M. B., Ohl, F., Holsboer, F., Landgraf, R. and Singewald, N., 2005b. Differences in serotonergic neurotransmission between rats displaying high or low anxiety/depression-like behaviour: effects of chronic paroxetine treatment. *J Neurochem.* 92, 1170-1179.
- Keck, M. E., Welt, T., Muller, M. B., Uhr, M., Ohl, F., Wigger, A., Toschi, N., Holsboer, F. and Landgraf, R., 2003. Reduction of hypothalamic vasopressinergic hyperdrive contributes to clinically relevant behavioral and neuroendocrine effects of chronic paroxetine treatment in a psychopathological rat model. *Neuropsychopharmacology.* 28, 235-243.
- Keck, M. E., Welt, T., Wigger, A., Renner, U., Engelmann, M., Holsboer, F. and Landgraf, R., 2001. The anxiolytic effect of the CRH(1) receptor antagonist R121919 depends on innate emotionality in rats. *Eur J Neurosci.* 13, 373-380.

- Keck, M. E., Wigger, A., Welt, T., Muller, M. B., Gesing, A., Reul, J. M., Holsboer, F., Landgraf, R. and Neumann, I. D., 2002. Vasopressin mediates the response of the combined dexamethasone/CRH test in hyper-anxious rats: implications for pathogenesis of affective disorders. *Neuropsychopharmacology*. 26, 94-105.
- Keedwell, P. A., Andrew, C., Williams, S. C., Brammer, M. J. and Phillips, M. L., 2005. The neural correlates of anhedonia in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*. 58, 843-853.
- Kessler, R. C., Keller, M. B. and Wittchen, H. U., 2001. The epidemiology of generalized anxiety disorder. *Psychiatr Clin North Am*. 24, 19-39.
- Kiss, J. Z., Martos, J. and Palkovits, M., 1991. Hypothalamic paraventricular nucleus: a quantitative analysis of cytoarchitectonic subdivisions in the rat. *J Comp Neurol*. 313, 563-573.
- Klein, R. L., Meyer, E. M., Peel, A. L., Zolotukhin, S., Meyers, C., Muzyczka, N. and King, M. A., 1998. Neuron-specific transduction in the rat septohippocampal or nigrostriatal pathway by recombinant adeno-associated virus vectors. *Exp Neurol*. 150, 183-194.
- Klinke, R. and Silbernagel, S., 2000. *Lehrbuch der Physiologie*. Thieme, Stuttgart.
- Kogan, J. H., Frankland, P. W. and Silva, A. J., 2000. Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus*. 10, 47-56.
- Kollack-Walker, S., Watson, S. J. and Akil, H., 1997. Social stress in hamsters: defeat activates specific neurocircuits within the brain. *J Neurosci*. 17, 8842-8855.
- Kong, W. X., Chen, S. W., Li, Y. L., Zhang, Y. J., Wang, R., Min, L. and Mi, X., 2006. Effects of taurine on rat behaviors in three anxiety models. *Pharmacol Biochem Behav*.
- Koo, J. W., Han, J. S. and Kim, J. J., 2004. Selective neurotoxic lesions of basolateral and central nuclei of the amygdala produce differential effects on fear conditioning. *J Neurosci*. 24, 7654-7662.
- Koolhaas, J. M. and Bohus, B., 1989. Social control in relation to neuroendocrine and immunological responses. In: Steptoe, A. and Appels, A. (Eds.), *Stress, Personal Control and Health*. Wiley, J. & Sons Ltd., Brussels, pp. 295-304.
- Koolhaas, J. M., De Boer, S. F., De Rutter, A. J., Meerlo, P. and Sgoifo, A., 1997a. Social stress in rats and mice. *Acta Physiol Scand Suppl*. 640, 69-72.
- Koolhaas, J. M., Korte, S. M., De Boer, S. F., Van Der Vegt, B. J., Van Reenen, C. G., Hopster, H., De Jong, I. C., Ruis, M. A. and Blokhuis, H. J., 1999. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci Biobehav Rev*. 23, 925-935.
- Koolhaas, J. M., Meerlo, P., De Boer, S. F., Strubbe, J. H. and Bohus, B., 1997b. The temporal dynamics of the stress response. *Neurosci Biobehav Rev*. 21, 775-782.
- Koolhaas, J. M., Meerlo, P., DeBoer, S. F., Strubbe, J. H. and Bohus, B., 1995. Social stress in rats: An animal model of depression. *Acta Neuropsychiatrica*. 7, 27-29.
- Korte, S. M., 2001. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev*. 25, 117-142.
- Kovacs, K. J., Foldes, A. and Sawchenko, P. E., 2000. Glucocorticoid negative feedback selectively targets vasopressin transcription in parvocellular neurosecretory neurons. *J Neurosci*. 20, 3843-3852.
- Kromer, S. A., Kessler, M. S., Milfay, D., Birg, I. N., Bunck, M., Czibere, L., Panhuysen, M., Putz, B., Deussing, J. M., Holsboer, F., Landgraf, R. and Turck, C. W., 2005. Identification of glyoxalase-I as a protein marker in a mouse model of extremes in trait anxiety. *J Neurosci*. 25, 4375-4384.
- Landgraf, R., 1996. Antisense targeting in behavioural neuroendocrinology. *J Endocrinol*. 151, 333-340.
- Landgraf, R., 2001. Neuropeptides and anxiety-related behavior. *Endocr J*. 48, 517-533.
- Landgraf, R., 2006. The involvement of the vasopressin system in stress-related disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 5, 167-179.
- Landgraf, R., Frank, E., Aldag, J. M., Neumann, I. D., Sharer, C. A., Ren, X., Terwilliger, E. F., Niwa, M., Wigger, A. and Young, L. J., 2003. Viral vector-mediated gene transfer of the vole V1a vasopressin receptor in the rat septum: improved social discrimination and active social behaviour. *Eur J Neurosci*. 18, 403-411.
- Landgraf, R., Gerstberger, R., Montkowski, A., Probst, J. C., Wotjak, C. T., Holsboer, F. and Engelmann, M., 1995. V1 vasopressin receptor antisense oligodeoxynucleotide into septum reduces vasopressin binding, social discrimination abilities, and anxiety-related behavior in rats. *J Neurosci*. 15, 4250-4258.
- Landgraf, R. and Holsboer, F., 2005. The involvement of neuropeptides in evolution, signaling, behavioral regulation and psychopathology: Focus on vasopressin. *Drug Dev Res*. 65, 185-190.
- Landgraf, R., Keßler, M., Bunck, M., Murgatroyd, C., Spengler, D., Zimbelmann, M., Nußbaumer, M., Czibere, L., Singewald, N., Rujescu, D. and Frank, E., 2006. Candidate genes of anxiety-related behavior in HAB/LAB rats and mice: focus on vasopressin and glyoxalase-I. *Neurosci Biobehav Rev*. in press.

- Landgraf, R., Naruo, T., Vecsernyes, M. and Neumann, I., 1997. Neuroendocrine and behavioral effects of antisense oligonucleotides. *Eur J Endocrinol.* 137, 326-335.
- Landgraf, R. and Neumann, I. D., 2004. Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. *Front Neuroendocrinol.* 25, 150-176.
- Landgraf, R. and Wigger, A., 2002. High vs low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. *Behav Genet.* 32, 301-314.
- Landgraf, R. and Wigger, A., 2003. Born to be anxious: neuroendocrine and genetic correlates of trait anxiety in HAB rats. *Stress.* 6, 111-119.
- Landgraf, R., Wigger, A., Holsboer, F. and Neumann, I. D., 1999. Hyper-reactive hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in rats bred for high anxiety-related behaviour. *J Neuroendocrinol.* 11, 405-407.
- Landgraf, R., Wotjak, C. T., Neumann, I. D. and Engelmann, M., 1998. Release of vasopressin within the brain contributes to neuroendocrine and behavioral regulation. *Prog Brain Res.* 119, 201-220.
- Laux, G., O., D. and König, W., 2000. *Pharmakopsychiatrie.* Urban & Fischer, München.
- Lee, P. D., Ge, B., Greenwood, C. M., Sinnett, D., Fortin, Y., Brunet, S., Fortin, A., Takane, M., Skamene, E., Pastinen, T., Hallett, M., Hudson, T. J. and Sladek, R., 2006. Mapping cis-acting regulatory variation in recombinant congenic strains. *Physiol Genomics.* 25, 294-302.
- Levinson, D. F., 2005a. The Genetics of Depression: A Review. *Biol Psychiatry.*
- Levinson, D. F., 2005b. Meta-analysis in Psychiatric Genetics. *Curr Psychiatry Rep.* 7, 143-151.
- Li, C. I., Maglinao, T. L. and Takahashi, L. K., 2004. Medial amygdala modulation of predator odor-induced unconditioned fear in the rat. *Behav Neurosci.* 118, 324-332.
- Lieb, R., 2005. Anxiety disorders: clinical presentation and epidemiology. *Handb Exp Pharmacol.* 405-432.
- Lieb, R., Isensee, B., Hofler, M., Pfister, H. and Wittchen, H. U., 2002. Parental major depression and the risk of depression and other mental disorders in offspring: a prospective-longitudinal community study. *Arch Gen Psychiatry.* 59, 365-374.
- Liebsch, G., Linthorst, A. C., Neumann, I. D., Reul, J. M., Holsboer, F. and Landgraf, R., 1998a. Behavioral, physiological, and neuroendocrine stress responses and differential sensitivity to diazepam in two Wistar rat lines selectively bred for high- and low-anxiety-related behavior. *Neuropsychopharmacology.* 19, 381-396.
- Liebsch, G., Montkowski, A., Holsboer, F. and Landgraf, R., 1998b. Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res.* 94, 301-310.
- Liebsch, G., Wotjak, C. T., Landgraf, R. and Engelmann, M., 1996. Septal vasopressin modulates anxiety-related behaviour in rats. *Neurosci Lett.* 217, 101-104.
- Lightman, S. L., Insel, T. R. and Ingram, C. D., 2002. New genomic avenues in behavioural neuroendocrinology. *Eur J Neurosci.* 16, 369-372.
- Lim, M. M. and Young, L. J., 2004. Vasopressin-dependent neural circuits underlying pair bond formation in the monogamous prairie vole. *Neuroscience.* 125, 35-45.
- Lopez-Figueroa, A. L., Norton, C. S., Lopez-Figueroa, M. O., Armellini-Dodel, D., Burke, S., Akil, H., Lopez, J. F. and Watson, S. J., 2004. Serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, and 5-HT_{2A} receptor mRNA expression in subjects with major depression, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 55, 225-233.
- Ludwig, M. and Landgraf, R., 1992. Does the release of vasopressin within the supraoptic nucleus of the rat brain depend upon changes in osmolality and Ca²⁺/K⁺? *Brain Res.* 576, 231-234.
- Ludwig, M. and Pittman, Q. J., 2003. Talking back: dendritic neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* 26, 255-261.
- Ludwig, M., Sabatier, N., Bull, P. M., Landgraf, R., Dayanithi, G. and Leng, G., 2002. Intracellular calcium stores regulate activity-dependent neuropeptide release from dendrites. *Nature.* 418, 85-89.
- Luiten, P. G., Koolhaas, J. M., de Boer, S. and Koopmans, S. J., 1985. The cortico-medial amygdala in the central nervous system organization of agonistic behavior. *Brain Res.* 332, 283-297.
- Maaswinkel, H., Gispen, W. H. and Spruijt, B. M., 1997. Executive function of the hippocampus in social behavior in the rat. *Behav Neurosci.* 111, 777-784.
- Markel, P., Shu, P., Ebeling, C., Carlson, G. A., Nagle, D. L., Smutko, J. S. and Moore, K. J., 1997. Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nat Genet.* 17, 280-284.
- Martinez, M., Calvo-Torrent, A. and Herbert, J., 2002. Mapping brain response to social stress in rodents with c-fos expression: a review. *Stress.* 5, 3-13.
- Martinez, M., Calvo-Torrent, A. and Pico-Alfonso, M. A., 1998a. Social defeat and subordination as models of social stress in laboratory rodents: a review. *Aggressive behavior.* 24, 241-256.
- Martinez, M., Phillips, P. J. and Herbert, J., 1998b. Adaptation in patterns of c-fos expression in the brain associated with exposure to either single or repeated social stress in male rats. *Eur J Neurosci.* 10, 20-33.

- McKinley, M. J., Cairns, M. J., Denton, D. A., Egan, G., Mathai, M. L., Uschakov, A., Wade, J. D., Weisinger, R. S. and Oldfield, B. J., 2004. Physiological and pathophysiological influences on thirst. *Physiol Behav.* 81, 795-803.
- McKinney, W. T., 2001. Overview of the past contributions of animal models and their changing place in psychiatry. *Semin Clin Neuropsychiatry.* 6, 68-78.
- McNaughton, N., 1997. Cognitive dysfunction resulting from hippocampal hyperactivity--a possible cause of anxiety disorder? *Pharmacol Biochem Behav.* 56, 603-611.
- Meerlo, P., Sgoifo, A., De Boer, S. F. and Koolhaas, J. M., 1999. Long-lasting consequences of a social conflict in rats: behavior during the interaction predicts subsequent changes in daily rhythms of heart rate, temperature, and activity. *Behav Neurosci.* 113, 1283-1290.
- Menard, J. and Treit, D., 1996. Lateral and medial septal lesions reduce anxiety in the plus-maze and probe-burying tests. *Physiol Behav.* 60, 845-853.
- Merikangas, K. R., Chakravarti, A., Moldin, S. O., Araj, H., Blangero, J. C., Burmeister, M., Crabbe, J., Jr., Depaulo, J. R., Jr., Foulks, E., Freimer, N. B., Koretz, D. S., Lichtenstein, W., Mignot, E., Reiss, A. L., Risch, N. J. and Takahashi, J. S., 2002. Future of genetics of mood disorders research. *Biol Psychiatry.* 52, 457-477.
- Merikangas, K. R. and Low, N. C., 2005. Genetic epidemiology of anxiety disorders. *Handb Exp Pharmacol.* 163-179.
- Miczek, K. A., 1979. A new test for aggression in rats without aversive stimulation: differential effects of d-amphetamine and cocaine. *Psychopharmacology (Berl).* 60, 253-259.
- Miczek, K. A., Thompson, M. L. and Tornatzky, W., 1990. Short and long term physiological and neurochemical adaptations to social conflict. In: Puglisi-Allegra, S. and Oliverio, A. (Eds.), *Psychobiology of stress.* Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 15-30.
- Moller, H. J., 2004. [Therapy resistance to antidepressants. Definition, prevalence, predictors, and interventional possibilities]. *Nervenarzt.* 75, 499-515; quiz 516-497.
- Mongeau, R., Miller, G. A., Chiang, E. and Anderson, D. J., 2003. Neural correlates of competing fear behaviors evoked by an innately aversive stimulus. *J Neurosci.* 23, 3855-3868.
- Mormede, P., Courvoisier, H., Ramos, A., Marissal-Arvy, N., Ousova, O., Desautels, C., Duclos, M., Chaouloff, F. and Moisan, M. P., 2002. Molecular genetic approaches to investigate individual variations in behavioral and neuroendocrine stress responses. *Psychoneuroendocrinology.* 27, 563-583.
- Murgatroyd, C., Wigger, A., Frank, E., Singewald, N., Bunck, M., Holsboer, F., Landgraf, R. and Spengler, D., 2004. Impaired repression at a vasopressin promoter polymorphism underlies overexpression of vasopressin in a rat model of trait anxiety. *J Neurosci.* 24, 7762-7770.
- Nakase, S., Kitayama, I., Soya, H., Hamanaka, K. and Nomura, J., 1998. Increased expression of magnocellular arginine vasopressin mRNA in paraventricular nucleus of stress-induced depression-model rats. *Life Sci.* 63, 23-31.
- Nash, J. R. and Nutt, D. J., 2005. Pharmacotherapy of anxiety. *Handb Exp Pharmacol.* 469-501.
- Neumann, I., 1997. Antisense oligonucleotides in neuroendocrinology: enthusiasm and frustration. *Neurochem Int.* 31, 363-378.
- Neumann, I., Kremarik, P. and Pittman, Q. J., 1995. Acute, sequence-specific effects of oxytocin and vasopressin antisense oligonucleotides on neuronal responses. *Neuroscience.* 69, 997-1003.
- Neumann, I. D., 2000. Antisense oligodeoxynucleotide effects on the hypothalamic-neurohypophysial system and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Methods.* 22, 227-237.
- Neumann, I. D., Kromer, S. A. and Bosch, O. J., 2005a. Effects of psycho-social stress during pregnancy on neuroendocrine and behavioural parameters in lactation depend on the genetically determined stress vulnerability. *Psychoneuroendocrinology.* 30, 791-806.
- Neumann, I. D., Kromer, S. A., Toschi, N. and Ebner, K., 2000. Brain oxytocin inhibits the (re)activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in male rats: involvement of hypothalamic and limbic brain regions. *Regul Pept.* 96, 31-38.
- Neumann, I. D., Wigger, A., Kromer, S., Frank, E., Landgraf, R. and Bosch, O. J., 2005b. Differential effects of periodic maternal separation on adult stress coping in a rat model of extremes in trait anxiety. *Neuroscience.* 132, 867-877.
- Neumann, I. D., Wigger, A., Liebsch, G., Holsboer, F. and Landgraf, R., 1998. Increased basal activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during pregnancy in rats bred for high anxiety-related behaviour. *Psychoneuroendocrinology.* 23, 449-463.
- Neylan, T. C., 1998. Hans Selye and the field of stress research. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 10, 230-230.
- Ogawa, S. and Pfaff, D. W., 1996. Application of antisense DNA method for the study of molecular bases of brain function and behavior. *Behav Genet.* 26, 279-292.

- Ohl, F., 2005. Animal models of anxiety. *Handb Exp Pharmacol*, 35-69.
- Ohl, F., Toschi, N., Wigger, A., Henniger, M. S. and Landgraf, R., 2001. Dimensions of emotionality in a rat model of innate anxiety. *Behav Neurosci*. 115, 429-436.
- Ostrowski, N. L., Lolait, S. J., Bradley, D. J., O'Carroll, A. M., Brownstein, M. J. and Young, W. S., 3rd, 1992. Distribution of V1a and V2 vasopressin receptor messenger ribonucleic acids in rat liver, kidney, pituitary and brain. *Endocrinology*. 131, 533-535.
- Pacak, K., 2000. Stressor-specific activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Physiol Res*. 49 Suppl 1, S11-17.
- Page, M. E., Detke, M. J., Dalvi, A., Kirby, L. G. and Lucki, I., 1999. Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)*. 147, 162-167.
- Parsons, L. H. and Justice, J. B., Jr., 1994. Quantitative approaches to in vivo brain microdialysis. *Crit Rev Neurobiol*. 8, 189-220.
- Paxinos, G. and Watson, C., 1986. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press Inc., England.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. and Briley, M., 1985. Validation of open/closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 14, 149-167.
- Pereira, L. O., da Cunha, I. C., Neto, J. M., Paschoalini, M. A. and Faria, M. S., 2005. The gradient of luminosity between open/enclosed arms, and not the absolute level of Lux, predicts the behaviour of rats in the plus maze. *Behav Brain Res*. 159, 55-61.
- Pich, E. M., Heinrichs, S. C., Rivier, C., Miczek, K. A., Fisher, D. A. and Koob, G. F., 1993. Blockade of pituitary-adrenal axis activation induced by peripheral immunoneutralization of corticotropin-releasing factor does not affect the behavioral response to social defeat stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 18, 495-507.
- Pickar, D. and Rubinow, K., 2001. Pharmacogenomics of psychiatric disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 22, 75-83.
- Pitkow, L. J., Sharer, C. A., Ren, X., Insel, T. R., Terwilliger, E. F. and Young, L. J., 2001. Facilitation of affiliation and pair-bond formation by vasopressin receptor gene transfer into the ventral forebrain of a monogamous vole. *J Neurosci*. 21, 7392-7396.
- Plomin, R. and Crabbe, J., 2000. DNA. *Psychol Bull*. 126, 806-828.
- Pollack, M. H., 2005. Comorbid anxiety and depression. *J Clin Psychiatry*. 66, 22-29.
- Porsolt, R. D., Bertin, A., Blavet, N., Deniel, M. and Jalfre, M., 1979. Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. *Eur J Pharmacol*. 57, 201-210.
- Potenza, M. N., Brodtkin, E. S., Joe, B., Luo, X., Remmers, E. F., Wilder, R. L., Nestler, E. J. and Gelernter, J., 2004. Genomic regions controlling corticosterone levels in rats. *Biol Psychiatry*. 55, 634-641.
- Pothion, S., Bizot, J. C., Trovero, F. and Belzung, C., 2004. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behav Brain Res*. 155, 135-146.
- Price, J., Sloman, L., Gardner, R., Jr., Gilbert, P. and Rohde, P., 1994. The social competition hypothesis of depression. *Br J Psychiatry*. 164, 309-315.
- Purba, J. S., Hoogendijk, W. J., Hofman, M. A. and Swaab, D. F., 1996. Increased number of vasopressin- and oxytocin-expressing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in depression. *Arch Gen Psychiatry*. 53, 137-143.
- Raadsheer, F. C., Hoogendijk, W. J., Stam, F. C., Tilders, F. J. and Swaab, D. F., 1994. Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology*. 60, 436-444.
- Ramos, A. and Mormede, P., 1998. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci Biobehav Rev*. 22, 33-57.
- Raskind, M. A., Weitzman, R. E., Orenstein, H., Fisher, D. A. and Courtney, N., 1978. Is antidiuretic hormone elevated in psychosis? A pilot study. *Biol Psychiatry*. 13, 385-390.
- Rassoulzadegan, M., Grandjean, V., Gounon, P., Vincent, S., Gillot, I. and Cuzin, F., 2006. RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature*. 441, 469-474.
- Reghunandanan, V. and Reghunandanan, R., 2006. Neurotransmitters of the suprachiasmatic nuclei. *J Circadian Rhythms*. 4, 2.
- Regier, D. A., Rae, D. S., Narrow, W. E., Kaelber, C. T. and Schatzberg, A. F., 1998. Prevalence of anxiety disorders and their comorbidity with mood and addictive disorders. *Br J Psychiatry Suppl*, 24-28.
- Remie, R., Coppes, R. P., Meurs, H., Roffel, A. F. and Zaagsma, J., 1990. Characterization of presynaptic vascular muscarinic receptors inhibiting endogenous noradrenaline overflow in the portal vein of the freely moving rat. *Br J Pharmacol*. 99, 223-226.

- Rushlow, W. J., Rajakumar, N., Flumerfelt, B. A. and Naus, C. C., 1999. Characterization of CARG-binding protein A initially identified by differential display. *Neuroscience*. 94, 637-649.
- Sadock, B. J. and Sadock, V. A., 2005. Kaplan & Sadock's comprehensive textbook of psychiatry, 8th edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Salchner, P., Sartori, S. B., Sinner, C., Wigger, A., Frank, E., Landgraf, R. and Singewald, N., 2006. Airjet and FG-7142-induced Fos expression differs in rats selectively bred for high and low anxiety-related behavior. *Neuropharmacology*.
- Salome, N., Salchner, P., Viltart, O., Sequeira, H., Wigger, A., Landgraf, R. and Singewald, N., 2004. Neurobiological correlates of high (HAB) versus low anxiety-related behavior (LAB): differential Fos expression in HAB and LAB rats. *Biol Psychiatry*. 55, 715-723.
- Salome, N., Viltart, O., Darnaudery, M., Salchner, P., Singewald, N., Landgraf, R., Sequeira, H. and Wigger, A., 2002. Reliability of high and low anxiety-related behaviour: influence of laboratory environment and multifactorial analysis. *Behav Brain Res*. 136, 227-237.
- Salome, N., Viltart, O., Lesage, J., Landgraf, R., Vieau, D. and Laborie, C., 2006. Altered hypothalamo-pituitary-adrenal and sympatho-adrenomedullary activities in rats bred for high anxiety: central and peripheral correlates. *Psychoneuroendocrinology*.
- Schjolden, J., Backstrom, T., Pulman, K. G., Pottinger, T. G. and Winberg, S., 2005. Divergence in behavioural responses to stress in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with contrasting stress responsiveness. *Horm Behav*. 48, 537-544.
- Schuurman, T., 1980. Hormonal correlates of agonistic behavior in adult male rats. *Prog Brain Res*. 53, 415-420.
- Scott, L. V. and Dinan, T. G., 1998. Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression. *Life Sci*. 62, 1985-1998.
- Scott, L. V. and Dinan, T. G., 2002. Vasopressin as a target for antidepressant development: an assessment of the available evidence. *J Affect Disord*. 72, 113-124.
- Sergeyev, V., Fetissov, S., Mathe, A. A., Jimenez, P. A., Bartfai, T., Mortas, P., Gaudet, L., Moreau, J. L. and Hokfelt, T., 2005. Neuropeptide expression in rats exposed to chronic mild stresses. *Psychopharmacology (Berl)*. 178, 115-124.
- Servatius, R. J., Beck, K. D., Moldow, R. L., Salameh, G., Tumminello, T. P. and Short, K. R., 2005. A stress-induced anxious state in male rats: corticotropin-releasing hormone induces persistent changes in associative learning and startle reactivity. *Biol Psychiatry*. 57, 865-872.
- Shair, H. N., Brunelli, S. A., Masmela, J. R., Boone, E. and Hofer, M. A., 2003. Social, thermal, and temporal influences on isolation-induced and maternally potentiated ultrasonic vocalizations of rat pups. *Dev Psychobiol*. 42, 206-222.
- Silva, A. J., Giese, K. P., Fedorov, N. B., Frankland, P. W. and Kogan, J. H., 1998. Molecular, cellular, and neuroanatomical substrates of place learning. *Neurobiol Learn Mem*. 70, 44-61.
- Singewald, N., Ebner, K., Landgraf, R., Wotjak, C. T. and Engelmann, M., 1999. Vasopressin selectively modulates the release of taurine within the septum of the rat brain. *Neurosci Lett*. 277, 68-70.
- Singewald, N., Zhou, G. Y. and Schneider, C., 1995. Release of excitatory and inhibitory amino acids from the locus coeruleus of conscious rats by cardiovascular stimuli and various forms of acute stress. *Brain Res*. 704, 42-50.
- Skutella, T., Montkowski, A., Stohr, T., Probst, J. C., Landgraf, R., Holsboer, F. and Jirikowski, G. F., 1994. Corticotropin-releasing hormone (CRH) antisense oligodeoxynucleotide treatment attenuates social defeat-induced anxiety in rats. *Cell Mol Neurobiol*. 14, 579-588.
- Slusarz, M. J., Slusarz, R. and Ciarkowski, J., 2006. Investigation of mechanism of desmopressin binding in vasopressin V2 receptor versus vasopressin V1a and oxytocin receptors: molecular dynamics simulation of the agonist-bound state in the membrane-aqueous system. *Biopolymers*. 81, 321-338.
- Smoller, J. W. and Finn, C. T., 2003. Family, twin, and adoption studies of bipolar disorder. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 123, 48-58.
- Solberg, L. C., Ahmadiyeh, N., Baum, A. E., Vitaterna, M. H., Takahashi, J. S., Turek, F. W. and Redei, E. E., 2003. Depressive-like behavior and stress reactivity are independent traits in a Wistar Kyoto x Fisher 344 cross. *Mol Psychiatry*. 8, 423-433.
- Spencer, S. J., Fox, J. C. and Day, T. A., 2004. Thalamic paraventricular nucleus lesions facilitate central amygdala neuronal responses to acute psychological stress. *Brain Res*. 997, 234-237.
- Spina, M. G., Merlo-Pich, E., Akwa, Y., Balducci, C., Basso, A. M., Zorrilla, E. P., Britton, K. T., Rivier, J., Vale, W. W. and Koob, G. F., 2002. Time-dependent induction of anxiogenic-like effects after central infusion of urocortin or corticotropin-releasing factor in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 160, 113-121.

- Sprott, R. L. and Ramirez, I., 1997. Current Inbred and Hybrid Rat and Mouse Models for Gerontological Research. *Ilar J.* 38, 104-109.
- Steckler, T., Hoksboer, F. and Reul, J. M., 1999. Glucocorticoids and depression. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 13, 597-614.
- Steimer, T. and Driscoll, P., 2005. Inter-individual vs line/strain differences in psychogenetically selected Roman High-(RHA) and Low-(RLA) Avoidance rats: neuroendocrine and behavioural aspects. *Neurosci Biobehav Rev.* 29, 99-112.
- Stemmelin, J., Lukovic, L., Salome, N. and Griebel, G., 2005. Evidence that the lateral septum is involved in the antidepressant-like effects of the vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415. *Neuropsychopharmacology.* 30, 35-42.
- Strekalova, T., Spanagel, R., Bartsch, D., Henn, F. A. and Gass, P., 2004. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology.* 29, 2007-2017.
- Tanaka, K., Suzuki, M., Sumiyoshi, T., Murata, M., Tsunoda, M. and Kurachi, M., 2003. Subchronic phencyclidine administration alters central vasopressin receptor binding and social interaction in the rat. *Brain Res.* 992, 239-245.
- Tanoue, A., Ito, S., Honda, K., Oshikawa, S., Kitagawa, Y., Koshimizu, T. A., Mori, T. and Tsujimoto, G., 2004. The vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting conditions. *J Clin Invest.* 113, 302-309.
- Tenenbaum, L., Chtarto, A., Lehtonen, E., Velu, T., Brotchi, J. and Levivier, M., 2004. Recombinant AAV-mediated gene delivery to the central nervous system. *J Gene Med.* 6 Suppl 1, S212-222.
- Tesson, L., Cozzi, J., Menoret, S., Remy, S., Usal, C., Fraichard, A. and Anegon, I., 2005. Transgenic modifications of the rat genome. *Transgenic Res.* 14, 531-546.
- Thomas, D. A., Takahashi, L. K. and Barfield, R. J., 1983. Analysis of ultrasonic vocalizations emitted by intruders during aggressive encounters among rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol.* 97, 201-206.
- Thor, D. H. and Holloway, W. R., 1982. Social Memory of the Male Laboratory Rat. *J Comp Physiol Psychol.* 96, 1000-1006.
- Tone, A., 2005. Listening to the past: history, psychiatry, and anxiety. *Can J Psychiatry.* 50, 373-380.
- Tornatzky, W. and Miczek, K. A., 1994. Behavioral and autonomic responses to intermittent social stress: differential protection by clonidine and metoprolol. *Psychopharmacology (Berl).* 116, 346-356.
- Tribollet, E., Barberis, C., Jard, S., Dubois-Dauphin, M. and Dreifuss, J. J., 1988. Localization and pharmacological characterization of high affinity binding sites for vasopressin and oxytocin in the rat brain by light microscopic autoradiography. *Brain Res.* 442, 105-118.
- Tsigos, C. and Chrousos, G. P., 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res.* 53, 865-871.
- Turri, M. G., Datta, S. R., DeFries, J., Henderson, N. D. and Flint, J., 2001. QTL analysis identifies multiple behavioral dimensions in ethological tests of anxiety in laboratory mice. *Curr Biol.* 11, 725-734.
- Turri, M. G., Talbot, C. J., Radcliffe, R. A., Wehner, J. M. and Flint, J., 1999. High-resolution mapping of quantitative trait loci for emotionality in selected strains of mice. *Mamm Genome.* 10, 1098-1101.
- Umriukhin, A. E., Wigger, A., Singewald, N. and Landgraf, R., 2002. Hypothalamic and hippocampal release of serotonin in rats bred for hyper- or hypo-anxiety. *Stress.* 5, 299-305.
- Ursin, H. and Olf, M., 1993. Psychobiology of coping and defence strategies. *Neuropsychobiology.* 28, 66-71.
- Ustun, T. B., Ayuso-Mateos, J. L., Chatterji, S., Mathers, C. and Murray, C. J., 2004. Global burden of depressive disorders in the year 2000. *Br J Psychiatry.* 184, 386-392.
- van den Bos, R., van der Horst, K. J., Baars, A. M. and Spruijt, B. M., 2002. Is it possible to replace stimulus animals by scent-filled cups in the social discrimination test? *Altern Lab Anim.* 30, 299-304.
- van der Poel, A. M. and Miczek, K. A., 1991. Long ultrasonic calls in male rats following mating, defeat and aversive stimulation: frequency modulation and bout structure. *Behaviour.* 119, 127-142.
- van Kampen, M., Kramer, M., Hiemke, C., Flugge, G. and Fuchs, E., 2002. The chronic psychosocial stress paradigm in male tree shrews: evaluation of a novel animal model for depressive disorders. *Stress.* 5, 37-46.
- van West, D., DeFavero, J., Aulchenko, Y., Oswald, P., Souery, D., Forsgren, T., Sluijs, S., Beĳ-Kacem, S., Adolfsson, R., Mendlewicz, J., Van Duijn, C., Deboutte, D., Van Broeckhoven, C. and Claes, S., 2004. A major SNP haplotype of the arginine vasopressin 1B receptor protects against recurrent major depression. *Mol Psychiatry.* 9, 287-292.
- Vaswani, M., Linda, F. K. and Ramesh, S., 2003. Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 27, 85-102.

- Vigneaud, V. D., Lawler, H. C. and Popenoe, E. A., 1953. Enzymic cleavage of glycinamid from vasopressin and a proposed structure for this pressor-antidiuretic hormone of the posterior pituitary. *J Am Chem Soc.* 75, 4880–4881.
- Watson, P. J. and Andrews, P. W., 2002. Toward a revised evolutionary adaptationist analysis of depression: the social navigation hypothesis. *J Affect Disord.* 72, 1-14.
- Watts, A. G., 1996. The impact of physiological stimuli on the expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) and other neuropeptide genes. *Front Neuroendocrinol.* 17, 281-326.
- Welt, T., Engelmann, M., Renner, U., Erhardt, A., Müller, M. B., Landgraf, R., Holsboer, F. and Keck, M. E., 2006. Temazepam Triggers the Release of Vasopressin into the Rat Hypothalamic Paraventricular Nucleus: Novel Insight into Benzodiazepine Action on Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical System Activity During Stress. *Neuropsychopharmacology.*
- Wersinger, S. R., Ginns, E. I., O'Carroll, A. M., Lolait, S. J. and Young, W. S., 3rd, 2002. Vasopressin V1b receptor knockout reduces aggressive behavior in male mice. *Mol Psychiatry.* 7, 975-984.
- Wersinger, S. R., K, R. K., Zufall, F., Lolait, S. J., O'Carroll, A. M. and Young, W. S., 3rd, 2004. Social motivation is reduced in vasopressin 1b receptor null mice despite normal performance in an olfactory discrimination task. *Horm Behav.* 46, 638-645.
- Whitnall, M. H., 1993. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog Neurobiol.* 40, 573-629.
- Wiersma, A., Baauw, A. D., Bohus, B. and Koolhaas, J. M., 1995. Behavioural activation produced by CRH but not alpha-helical CRH (CRH-receptor antagonist) when microinfused into the central nucleus of the amygdala under stress-free conditions. *Psychoneuroendocrinology.* 20, 423-432.
- Wigger, A., Loerscher, P., Weissenbacher, P., Holsboer, F. and Landgraf, R., 2001. Cross-fostering and cross-breeding of HAB and LAB rats: a genetic rat model of anxiety. *Behav Genet.* 31, 371-382.
- Wigger, A., Sanchez, M. M., Mathys, K. C., Ebner, K., Frank, E., Liu, D., Kresse, A., Neumann, I. D., Holsboer, F., Plotsky, P. M. and Landgraf, R., 2004. Alterations in central neuropeptide expression, release, and receptor binding in rats bred for high anxiety: critical role of vasopressin. *Neuropsychopharmacology.* 29, 1-14.
- Willner, P., 1997. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl).* 134, 319-329.
- Willner, P., Muscat, R. and Papp, M., 1992. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 16, 525-534.
- Winslow, J. T. and Insel, T. R., 2004. Neuroendocrine basis of social recognition. *Curr Opin Neurobiol.* 14, 248-253.
- Wirth, M. M., Welsh, K. M. and Schultheiss, O. C., 2005. Salivary cortisol changes in humans after winning or losing a dominance contest depend on implicit power motivation. *Horm Behav.*
- Wotjak, C. T., Ganster, J., Kohl, G., Holsboer, F., Landgraf, R. and Engelmann, M., 1998. Dissociated central and peripheral release of vasopressin, but not oxytocin, in response to repeated swim stress: new insights into the secretory capacities of peptidergic neurons. *Neuroscience.* 85, 1209-1222.
- Wotjak, C. T., Kubota, M., Liebsch, G., Montkowski, A., Holsboer, F., Neumann, I. and Landgraf, R., 1996. Release of vasopressin within the rat paraventricular nucleus in response to emotional stress: a novel mechanism of regulating adrenocorticotrophic hormone secretion? *J Neurosci.* 16, 7725-7732.
- Young, L. J., 2002. The neurobiology of social recognition, approach, and avoidance. *Biol Psychiatry.* 51, 18-26.
- Zelena, D., Mergl, Z. and Makara, G. B., 2005. Glutamate agonists activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis through hypothalamic paraventricular nucleus but not through vasopressinergic neurons. *Brain Res.* 1031, 185-193.
- Ziegler, D. R., Cullinan, W. E. and Herman, J. P., 2005. Organization and regulation of paraventricular nucleus glutamate signaling systems: N-methyl-D-aspartate receptors. *J Comp Neurol.* 484, 43-56.
- Zimdahl, H., Nyakatura, G., Brandt, P., Schulz, H., Hummel, O., Fartmann, B., Brett, D., Droege, M., Monti, J., Lee, Y. A., Sun, Y., Zhao, S., Winter, E. E., Ponting, C. P., Chen, Y., Kasprzyk, A., Birney, E., Ganten, D. and Hubner, N., 2004. A SNP map of the rat genome generated from cDNA sequences. *Science.* 303, 807.

Danksagung

Mein Dank gilt allen voran meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Landgraf, unter dessen Fittichen ich so viele große und kleine Dinge auf dem Weg zu wissenschaftlichem Denken und Arbeiten gelernt habe. Ich danke ihm ganz besonders für seine immer offene Tür und für das langjährige Vertrauen, das er mir entgegengebracht hat.

Herrn Prof. Dr. Neuweiler gilt mein großer Dank dafür, dass er in mir die Begeisterung für das faszinierendste Rätsel der Welt - das Gehirn - geweckt hat. Ich danke für viele überaus interessante Gespräche und Anregungen und dafür, dass er mich bis heute als Mentor begleitet.

Bei Herrn Prof. Dr. Schuller bedanke ich mich herzlich für seine Bereitschaft, das Zweitgutachten zu dieser Arbeit zu erstellen.

Ganz herzlich danke ich Frau Dr. Sandra Wigger für die inspirierte und inspirierende Betreuung über viele Jahre, - von der ersten Hospitanz bis zur Dissertation -, für das breite Methodenspektrum, das sie mir vermittelt hat, für jede korrekturgelesene Zeile, für jeden wissenschaftlichen und freundschaftlichen Rat und vor allem für die tausend Antworten auf tausend Fragen.

Ich danke vielmals meinen Mitstreitern Melanie Keßler, Mirjam Bunck und Ludwig Czibere für die hervorragende Zusammenarbeit und den großen Teamgeist, für Beratung und Hilfe in allen Lebenslagen, für ihre Geduld und Toleranz, ihre ehrliche Kritik, - schlicht für ihre gute Freundschaft.

Auch danke ich allen Mitgliedern unserer Arbeitsgemeinschaft für die stets gute und konstruktive Zusammenarbeit, die große Hilfsbereitschaft und für viele Anregungen, aber auch für unstrittig amüsante Gespräche. Mein Dank gilt dabei insbesondere den guten Geistern unserer AG, Marina Zimbelmann und Markus Nußbaumer, deren Hilfe mir unentbehrlich war. Besonders danke ich auch Chris Murgatroyd für die praktische und theoretische Unterstützung bei der Durchführung aller Genotypisierungen wie auch Prof. Dr. Nicolas Singewald für seine Unterstützung und die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten. Ebenso gilt mein Dank den so kooperativen Kollegen am Institut, von denen viele zu guten Freunden geworden sind, und den vielen Mitarbeitern, die mich in der täglichen Arbeit unterstützten.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Prof. Dr. Holsboer für seine effektive Forschungspolitik, die das MPI für Psychiatrie zu einem außergewöhnlichen Ort der Forschung gemacht hat und auch für meine Untersuchungen stets die nötigen Mittel garantierte.

Dem Bayerischen Staat danke ich als Stipendiatin für die finanzielle Unterstützung während meines Studiums. Ebenso danke ich dem Cusanuswerk für die Förderung meines Studiums und meiner Promotion sowie für die Möglichkeit der Teilnahme an einer großen Zahl vielfältiger und hochinteressanter Veranstaltungen.

Ich danke meinen lieben Freunden, die mich schon seit so vielen Jahren begleiten und mir eine unerschöpfliche Quelle von Freude und Inspiration sind.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern für alles, was Sie für mich getan haben und tun, für ihre Aufgeschlossenheit und ihr Interesse und vor allem dafür, dass sie meinen Weg stets mit Verständnis begleitet und so sehr unterstützt haben. Ebenso danke ich ganz besonders meinen Geschwistern dafür, dass sie der Jüngsten jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Für die vorliegende Arbeit wurden und für viele andere Studien werden tagtäglich Ratten und Mäuse geopfert. Dies war mir bei meinen Versuchen stets bewusst und der verantwortungsvolle Umgang mit den Tieren war mir immer selbstverständlich. Bis heute gibt es in der präklinischen psychiatrischen Forschung keine auch nur annähernd ebenso effektive Methode als Alternative zu Tierversuchen. Ich hoffe jedoch, dass sich in nicht allzu ferner Zukunft manch neue Möglichkeit für unsere Untersuchungen finden wird.

Diese Arbeit ist den faszinierendsten Tieren der Welt gewidmet, den HAB/LAB-Ratten, und deren Beitrag zur Entschlüsselung von psychopathologischen Phänomenen.

Lebenslauf

Name: Elisabeth Frank
Geburtsdatum: 05.06.1978
in: Garmisch-Partenkirchen, Deutschland

Schulbildung

1984 – 1988 Grundschule, Garmisch-Partenkirchen
1988 – 1997 Werdenfels-Gymnasium, Garmisch-Partenkirchen

Stipendien

1997 – 2002 Stipendium der bayerischen Begabtenförderung
1999 – 2002 Stipendium der bischöflichen Studienförderung Cusanuswerk
2002 – 2006 Stipendium des Karrierenetzwerks e-fellows.net
2004 – 2006 Promotionsstipendium der bischöflichen Studienförderung
Cusanuswerk

Studium

1997 – 2002 Diplom-Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München
2000 – 2001 Diplomarbeit, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München
Verhaltensneuroendokrinologie, Prof. Dr. R. Landgraf
Thema: „Sozialer Stress und angeborene Angst:
Neuroendokrine und verhaltensbiologische Untersuchungen“

Promotion

2003 – 2006 Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München
Verhaltensneuroendokrinologie, Prof. Dr. R. Landgraf

Publikationsliste

- Landgraf, R., Keßler, M., Bunck, M., Murgatroyd, C., Spengler, D., Zimbelmann, M., Nußbaumer, M., Czibere, L., Singewald, N., Rujescu, D. and Frank, E., 2006. Candidate genes of anxiety-related behavior in HAB/LAB rats and mice: focus on vasopressin and glyoxalase-I. *Neurosci Biobehav Rev.* in press.
- Frank, E., Salchner, P., Aldag, J. M., Salome, N., Singewald, N., Landgraf, R. and Wigger, A., 2006. Genetic predisposition to anxiety-related behavior determines coping style, neuroendocrine responses, and neuronal activation during social defeat. *Behav Neurosci.* 120, 60-71. *
- Salchner, P., Sartori, S. B., Sinner, C., Wigger, A., Frank, E., Landgraf, R. and Singewald, N., 2006. Airjet and FG-7142-induced Fos expression differs in rats selectively bred for high and low anxiety-related behavior. *Neuropharmacology.* *
- Neumann, I. D., Wigger, A., Kromer, S., Frank, E., Landgraf, R. and Bosch, O. J., 2005. Differential effects of periodic maternal separation on adult stress coping in a rat model of extremes in trait anxiety. *Neuroscience.* 132, 867-877.
- Murgatroyd, C., Wigger, A., Frank, E., Singewald, N., Bunck, M., Holsboer, F., Landgraf, R. and Spengler, D., 2004. Impaired repression at a vasopressin promoter polymorphism underlies overexpression of vasopressin in a rat model of trait anxiety. *J Neurosci.* 24, 7762-7770. *
- Wigger, A., Sanchez, M. M., Mathys, K. C., Ebner, K., Frank, E., Liu, D., Kresse, A., Neumann, I. D., Holsboer, F., Plotsky, P. M. and Landgraf, R., 2004. Alterations in central neuropeptide expression, release, and receptor binding in rats bred for high anxiety: critical role of vasopressin. *Neuropsychopharmacology.* 29, 1-14.

Landgraf, R., Frank, E., Aldag, J. M., Neumann, I. D., Sharer, C. A., Ren, X., Terwilliger, E. F., Niwa, M., Wigger, A. and Young, L. J., 2003. Viral vector-mediated gene transfer of the vole V1a vasopressin receptor in the rat septum: improved social discrimination and active social behaviour. *Eur J Neurosci.* 18, 403-411. *

Leippert, D., Frank, E., Gabriel, P., Kutter, S., Scheidemann, K. D., von Stillfried, N. and Weller, F., 2002. Prey-Related Spectral Changes in Echolocation Sounds of the Indian False Vampire Megaderma. *Ethology.* 108, 139-156.

* Teile vorliegender Promotionsarbeit wurden in diesen Publikationen veröffentlicht.

Kongressbeiträge

Frank, E., Aldag, M., Landgraf, R. and Wigger, A., 2003. Effects of a single social defeat on behavioural and neuroendocrine parameters in rats bred for extremes in anxiety. Proceedings of the 5th Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, Germany.

Frank, E., Horn, T., Landgraf, R. and Wigger, A., 2004. Anxiety/depression-related behavior and social recognition: a key role of hypothalamic AVP. Proceedings of the 6th Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, Germany.

Frank, E., Horn, T., Landgraf, R. and Wigger, A., 2005. A key role for hypothalamic AVP in anxiety/depression-related behavior and social recognition: An antisense-study. Proceedings of the 11th Biennial European Behavioural Pharmacology Society Meeting, Barcelona, Spain.