



Die Auswirkungen von Tph2-Defizienz und negativen frühen Umwelterfahrungen auf Angstverhalten in weiblichen Mäusen

**Differential anxiety-related behaviour and brain activation in Tph2-
deficient female mice exposed to adverse early environment**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Sektion Neurowissenschaften

Vorgelegt von

Charlotte Sophie Auth

aus

Würzburg

Würzburg, **2020**



Eingereicht am:
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Philip Tovote

1. Betreuer: Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch

2. Betreuer: PD Dr. Angelika Schmitt-Böhrer

3. Betreuer: Prof. Dr. Esther Asan

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Meinen liebevollen Eltern

&

Maxi,

meinem wundervollen *partner in crime and science*

“Always remember that this whole thing was started with a dream and a mouse.”

Walt Disney

Inhaltsverzeichnis

Summary (English).....	13
Zusammenfassung (Deutsch).....	14
1. Einleitung.....	17
1.1 Neurobiologie von Furcht, Angst und Panik.....	17
1.1.1 Konzepte und Definitionen von Furcht, Angst und Panik.....	17
1.1.2 Tiermodelle zur Untersuchung von Angstverhalten.....	18
1.1.3 Neurobiologische Korrelate von Furcht, Angst und Panik.....	21
1.1.3.1 Modell des neuronalen Angst-Netzwerks.....	21
1.1.3.2 Modell des neuronalen Panik-Netzwerks.....	22
1.1.3.3 Amygdala.....	24
1.1.3.4 Periventriculärer Kern des Hypothalamus (PVN).....	28
1.1.3.5 Periaquäduktales Höhlengrau (PAG).....	29
1.2 „Early Life“-Stress.....	30
1.2.1 Die Rolle von „Early Life“-Stress in der Entwicklung psychischer Erkrankungen	30
1.2.2 Tiermodelle zur Untersuchung von „Early Life“-Stress	33
1.2.3 Auswirkungen von „Early Life“-Stress auf die Prägung und Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse	36
1.2.4 Auswirkungen von „Early Life“-Stress auf Neurobiologie und Verhalten von Modellorganismen und Menschen	45
1.3 Das serotonerge System	52
1.3.1 Serotonin – ein wichtiger Neurotransmitter mit zahlreichen Funktionen	52
1.3.2 Das serotonerge System und psychische Erkrankungen	53
1.3.3 Die Beeinflussung von Angstverhalten durch Serotonin.....	54
1.3.4 Tiermodelle zur Untersuchung des Effekts von Serotonin auf Verhalten	59
1.3.5 Die Rolle des serotonergen Systems in der Vermittlung der Effekte von „Early Life“-Stress	63

1.4 Der Einfluss geschlechtsspezifischer Faktoren.....	65
1.4.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei psychischen Erkrankungen.....	65
1.4.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Wirkung von „Early Life“-Stress.....	66
1.4.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Ausbildung und Wirkweise des serotonergen Systems.....	69
1.4.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede im Angstverhalten.....	71
2. Studiendesign und Fragestellung der Studie.....	75
3. Materialien.....	76
4. Methoden.....	79
4.1 Verhalten.....	79
4.1.1 Tiere und Tierhaltung.....	79
4.1.2 Verpaarung.....	79
4.1.3 Maternale Separation.....	80
4.1.4 Bestimmung der Östrusphasen.....	80
4.1.5 Verhaltenstestung.....	82
4.2 Auswertung der durch die Verhaltensexperimente bedingten neuronalen Aktivierungsmuster.....	85
4.2.1 Gewebeverarbeitung.....	85
4.2.2 c-Fos-Immunhistochemie.....	85
4.2.3 Stereologische Auswertung.....	86
4.3 Statistik.....	87
5. Ergebnisse.....	88
5.1 Einfluss von Tph2-Genotyp und MS auf Körpergewicht, Größe der Zielregionen im Gehirn und Überleben der Versuchstiere.....	88
5.2 Maternale Separation reduziert Angstverhalten in Tryptophanhydroxylase 2-defizienten Mäusen im „Dark-light box“-Test.....	88
5.3 Maternale Separation verstärkt Fluchtverhalten in Tryptophanhydroxylase 2-defizienten Mäusen im „Open field“-Test.....	97

6. Diskussion	109
6.1 Interpretation der Ergebnisse.....	109
6.2 Limitationen der Studie.....	122
6.3 Perspektiven	123
7. Literaturverzeichnis.....	126
8. Abkürzungsverzeichnis.....	162
9. Danksagung.....	165
10. Lebenslauf.....	168
11. Eidesstattliche Erklärung/ Affidavit.....	169
12. Anhang	170
12.1 Physiologische Parameter von Muttertieren und Nachkommen.....	170
12.2 Überblick über alle ausgewerteten Parameter für „Open field“- und „Dark-light box“-Test	172
12.3 Darstellung aller in Hinblick auf Sprungverhalten erhobenen Parameter in „Open field“- und „Dark-light box“-Test.....	174
12.4 Maße der Gehirnareale.....	177

Summary (English)

Anxiety disorders are a group of highly prevalent mental diseases and represent a major social and economic burden in present-day's society. Adverse early-life experience is known to be a risk factor for the development of various psychiatric diseases, including anxiety disorders. During early life, the programming of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis, the hormone system responsible for stress responses that regulates the release of the stress hormone cortisol corticosterone (in humans/mice) takes place. Exposure to stress during this critically sensitive period disturbs HPA axis reconciliation and leads to dysregulated responses to stress in later life. The serotonin (5-HT) system as one of the most disseminated neurotransmitter systems is known to be involved in mediating the effects of early-life adversity on anxiety-related behaviour. The aim of this study is to further elucidate the interaction of genetic vulnerability and adversity in early stages of development on anxiety-related behaviour in adulthood.

In this study, tryptophan hydroxylase-2 (Tph2)-deficient females were used as a model for lifelong constitutive brain 5-HT synthesis deficiency. The progeny of this line were subjected to maternal separation (MS) in early life and tested in the open-field (OF) or the dark-light box (DLB) in adult life. After behavioural testing, neuronal activation was evaluated using immunohistochemistry against the immediate early gene product c-Fos.

In the DLB, homozygous Tph2-deficient mice showed a decrease in activity in the light compartment and this effect was rescued by MS. In addition, MS increased the occurrence of escape-related jumping behaviour in animals of this genotype. In the OF, MS promoted escape-like behaviour in homo- and heterozygous Tph2-deficient mice.

Both behavioural tests resulted in a distinct neural activation pattern, displayed by c-Fos immunohistochemistry. Exposure to the DLB led to Tph2-dependent activation of paraventricular nucleus (PVN) and basolateral amygdala (BL), whereas exposure to OF resulted in activation in the lateral amygdala (La) of animals subjected to MS as well as a Tph2 and MS-dependent activation of the ventrolateral (VLPAG) and dorsolateral (DLPAG) periaqueductal grey.

Considering all in all, our results imply that MS promotes active responses to aversive stimuli dependent on the presence of 5-HT in the brain. These effects might be mediated by a distinct activation of brain regions involved in anxiety circuits during behavioural testing.

Zusammenfassung (Deutsch)

Angsterkrankungen gehören zu den am weitesten verbreiteten psychischen Erkrankungen und stellen eine beträchtliche soziale und wirtschaftliche Herausforderung für unsere Gesellschaft dar. Aversive frühe Erfahrungen sind ein bekannter Risikofaktor für die Entwicklung verschiedener psychischer Erkrankungen, insbesondere Angststörungen. Während der frühen Entwicklung findet die Programmierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden- (HHN)-Achse, die die Ausschüttung des Stresshormons Cortisol in Menschen bzw. Corticosteron in Mäusen steuert, statt. Wenn Individuen in dieser kritischen Phase Stress ausgesetzt sind, wird die regelrechte Ausbildung der HHN-Achse gestört, was zu dysregulierten Verhaltensantworten auf Stressreize im späteren Leben führen kann. Das Serotonin (5-HT)-System als eines der ausgedehntesten Neurotransmittersysteme ist an der Vermittlung der Effekte von früher Stressexposition auf angstähnliche Verhaltensweisen beteiligt.

Das Ziel dieser Studie ist es, die Interaktion zwischen genetischer Prädisposition und negativen Einflüssen in frühen Entwicklungsstadien auf die Ausbildung von Angstverhalten im Erwachsenenalter näher zu beleuchten.

In dieser Studie wurden Tryptophanhydroxylase 2 (Tph2)-defiziente weibliche Mäuse als Modell für ein lebenslanges konstitutives 5-HT Synthesedefizit im zentralen Nervensystem verwendet. Nachkommen dieser Mauslinie wurden im frühen Lebensalter Maternaler Separation (MS), d.h. einem mütterlichen Trennungsparadigma, unterzogen und im Erwachsenenalter im „Open field“ (OF) oder in der „Dark-light box“ (DLB) getestet. Im Anschluss an die Verhaltensexperimente wurde die neuronale Aktivierung immunhistochemisch durch Darstellung des frühzeitig auftretenden Genprodukts c-Fos bestimmt.

In der DLB zeigten homozygot Tph2-defiziente Mäuse eine verringerte motorische Aktivität im hellen Kompartiment, und dieser Effekt konnte durch MS normalisiert werden. Zusätzlich verstärkte MS bei diesem Genotyp das Auftreten von fluchtartigen Sprüngen. Im OF hat MS fluchtartige Verhaltensweisen in homo- und heterozygoten Tph2-defizienten Mäusen befördert.

Beide Verhaltenstests führten zu spezifischen neuronalen Aktivierungsmustern, die mithilfe von c-Fos-Immunhistochemie ausgewertet wurden. Die Durchführung des DLB-Tests führte in Abhängigkeit vom Vorhandensein von Tph2 zur Aktivierung des paraventriculären Kerns des Hypothalamus (PVN) und der basolateralen Amygdala (BL), wohingegen die Exposition gegenüber dem OF-Test zu einer Aktivierung der lateralen Amygdala (La) in Tieren, die einem mütterlichen Trennungsparadigma

unterzogen wurden, sowie einer Aktivierung des ventrolateralen (VLPAG) und dorsolateralen (DLPAG) periaquäduktalen Höhlengraus in Abhängigkeit von Tph2 und MS führte.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass MS aktive Verhaltensantworten auf aversive Reize in Abhängigkeit vom Vorhandensein von 5-HT im Gehirn fördert. Diese Effekte könnten durch die spezifische Aktivierung von mit Angstverhalten in Zusammenhang stehenden Gehirnregionen während der Verhaltensexperimente vermittelt werden.

1 Einleitung

1.1 Neurobiologie von Furcht, Angst und Panik

1.1.1 Konzepte und Definitionen von Furcht, Angst und Panik

Angsterkrankungen weisen in der heutigen Gesellschaft eine hohe Prävalenz auf und verdienen Beachtung, insofern sie sowohl einen erheblichen Leidensdruck auf die betroffenen Patienten ausüben, als auch eine beträchtliche sozioökonomische Belastung für die Gesellschaft darstellen (Kessler & Greenberg, 2002). Dieser Erkrankungskomplex ist u.a. durch eine übermäßige autonome und neuroendokrine Aktivierung charakterisiert, was in einem übersteigerten physiologischen Erregungsniveau resultiert (American Psychiatric Association, 2013).

Angst bezeichnet eine emotionale und physische Reaktion auf potentielle Bedrohungen, wobei diese sich oft auf wechselnde, unscharf definierte und unvorhersehbare potentielle Gefahren bezieht und durch ein Gefühl gesteigerter Besorgnis sowie ängstlicher Anspannung gekennzeichnet ist. Furcht bezieht sich hingegen auf konkrete, klar definierbare bedrohliche Reize und resultiert in physiologischer Erregung sowie aktiven Verhaltensweisen, wie beispielsweise der „Fight-or-flight“-Reaktion, mit dem Ziel, das Überleben des Individuums zu sichern (Davis et al., 2010). Aus evolutionärer Sicht kommen Angst und Furcht eine wichtige Funktion für die Anpassung des Organismus an wechselnde Umweltbedingungen zu, indem sie spezifische Verhaltensänderungen, auch als „coping“ bezeichnet, befördern. Im Gegensatz hierzu ist bei maladaptiven Formen von Angst die direkte Verbindung zwischen emotionalen und körperlichen Reaktionen auf potentiell bedrohliche Reize gelockert, was dazu führt, dass Individuen ängstlich auf nicht-bedrohliche Reize reagieren, Reize falsch interpretieren oder antizipierte potentielle negative Konsequenzen überbewerten. Diese unphysiologischen Formen von Angst können zu einer emotionalen Belastung der betroffenen Individuen sowie zu einer Einschränkung ihrer alltäglichen Lebensgestaltung führen (Steimer, 2011).

Unter einer Panikstörung versteht man eine Erkrankung, die durch das wiederholte und unerwartete Auftreten von Panikattacken charakterisiert ist, mindestens einen Monat andauert und zu maladaptiven Verhaltensänderungen, wie Vermeidungsverhalten, sowie dysfunktionalen Kognitionen führt. Eine Panikattacke beschreibt eine plötzlich auftretende Episode, die von Gefühlen starker Angst und psychischem sowie physischen Unwohlsein geprägt ist und mit körperlichen Symptomen wie Herzrasen, Schwitzen, Zittern, Erstickungsgefühlen, Druck auf der Brust, Übelkeit, Schwindel, Kälteschauern oder Hitzewallungen, Parästhesien (z.B. Kribbeln oder Taubheitsgefühl) und/oder

psychischen Symptomen im Sinne von Derealisation oder Depersonalisation, Angst, die Kontrolle zu verlieren oder verrückt zu werden, oder Angst zu sterben, einhergeht, unvermittelt entsteht und innerhalb von 10 Minuten ein Maximum erreicht (American Psychiatric Association, 2013). Oftmals, jedoch nicht zwingend, sind Panikstörungen mit Agoraphobie verbunden, was eine Angst vor - und infolgedessen eine Meidung von - Situationen oder Orten bezeichnet, in denen im Falle einer Panikattacke Entkommen oder Hilfe erhalten erschwert oder unangenehm sein könnten. Typische agoraphobische Ängste beschreiben z.B. die Angst, sich alleine in einer Menschenmenge aufzuhalten oder mit einem Bus zu fahren.

Angsterkrankungen weisen Komorbiditäten mit zahlreichen anderen psychischen Erkrankungen auf, wobei v.a. die Komorbidität mit Depressionen häufig ist. Studien zeigten, dass 50% der Patienten, die an Depression leiden, auch die diagnostischen Kriterien einer Angsterkrankung erfüllten, wobei die hohe Komorbidität zwischen diesen Krankheitsentitäten auf ähnliche Pathomechanismen in der Genese dieser Störungen hinweisen könnte (Kessler et al., 2003a).

Interessanterweise treten Störungen aus dem Komplex der Angsterkrankungen deutlich häufiger bei Frauen als bei Männern auf (Bekker & van Mens-Verhulst, 2007); mögliche Mechanismen hierfür werden unter 1.4 näher beleuchtet.

1.1.2 Tiermodelle zur Untersuchung von Angstverhalten

Angstverhalten wird in Tiermodellen mithilfe spezifischer Verhaltensparadigmen untersucht. Im Rahmen dieser Verhaltenstests werden Tiere einer spezifischen Umgebung mit definierten Reizen ausgesetzt und das Copingverhalten der Tiere evaluiert. Coping bezeichnet die Verhaltensstrategien und physiologischen Reaktionen, die Tiere angesichts einer herausfordernden Situation zeigen und stellt einen Versuch, diese zu bewältigen, dar (Koolhaas et al., 1999). Hierbei wird zwischen aktiven und passiven Formen des Copings unterschieden. Mögliche Formen des aktiven Copings sind beispielsweise Exploration, Annäherung oder Aggression, passive Formen stellen u.a. Vermeidung und Verhaltensinhibition dar.

Angst spiegelt sich in Tierversuchen typischerweise in Verhaltensinhibition, wie beispielsweise *freezing*, wider, einer Form von passivem Coping, bei der die Tiere wie erstarrt sind (Steimer, 2011). Panik wird meist anhand physiologischer Parameter wie Pulsanstieg sowie fluchtbezogenen Verhaltensweisen beurteilt (Paul et al., 2014). Das Auftreten dieser Verhaltensweisen kann in verschiedenen aversiven Testparadigmen beobachtet werden. In dieser Studie wurden der „Open

field“ (OF)- sowie der „Dark-light box“ (DLB)-Test angewandt, die nachweislich Fluchtreaktionen (Waider et al., 2017) sowie Verhaltensinhibition (Holmes et al., 2003) hervorrufen können.

Bei der Untersuchung von Angstverhalten am Tiermodell kann man im Allgemeinen zwei Arten von Angsttests unterscheiden: unkonditionierte/ethologische und konditionierte Testparadigmen. Konditionierte Verhaltenstests, wie das vielfach verwendete „Fear conditioning“, basieren auf der Fähigkeit des Erlernens von Furchtverhalten durch operante Verfahren der Verstärkung. Ethologische Angsttests basieren hingegen auf angeborenen, biologischen Ängsten, die unter Laborbedingungen durch bestimmte, für die untersuchte Spezies natürlich anxiogene Reize hervorgerufen werden können. Verhaltensdaten aus diesen Tests zeigen eine hohe ethologische Relevanz insofern sie eine biologisch bedeutsame Grundlage haben. Ethologische Verhaltenstests gründen in der Regel auf konfliktbasierten Ängsten, wobei die Versuchstiere einer unbekanntem Umgebung ausgesetzt werden, die widerstrebende Bedürfnisse und Emotionen hervorruft. So konkurrieren Neugier und Explorationsbedürfnis auf der einen Seite mit Angst, Verunsicherung und Sicherheitsbedürfnissen auf der anderen Seite (Campos et al., 2013).

Ein sehr häufig eingesetzter ethologischer Verhaltenstest ist beispielsweise das „Elevated-plus maze“ (EPM), das aus einer erhöhten, kreuzförmigen Plattform mit vier Armen besteht, wobei zwei Arme durch Wände geschlossen sind und senkrecht auf zwei offenen Armen ohne schützende Wände stehen. Dieser Test gründet auf den gegensätzlichen Bedürfnissen des Versuchstieres, einerseits die offenen Arme zu erkunden und gleichzeitig ungeschützte, helle und hohe Umgebungen, die durch die offenen Arme repräsentiert werden, zu meiden (Handley & Mithani, 1984). Die Exposition gegenüber den offenen Armen führt zu physiologischen Anzeichen von Stress im Sinne einer verstärkten Defäkation und gesteigerter Plasmacorticosteronspiegel, wohingegen die Verabreichung anxiolytischer Substanzen die Zeit, die die Tiere mit der Erkundung der offenen Arme verbringen, verlängert (Pellow & File, 1986). Die Latenzzeit, bis ein Versuchstier erstmal einen offenen Arm betritt, sowie die Zeit, die in den geschlossenen im Vergleich zu in den offenen Armen verbracht wird, wird als Maß für das Angstniveau des Tieres gewertet.

Der OF-Test wurde erstmals 1934 entwickelt (Hall, 1934). Dieser Test nutzt den Konflikt zwischen dem Bedürfnis nach Exploration neuer Umgebungen und der biologisch verankerten Angst von Nagetieren vor großen, offenen, hellbeleuchteten und unbekanntem Flächen (Choleris et al., 2001). Das OF besteht aus einer viereckigen Arena, die durch vier Wände begrenzt ist, welche ausreichend hoch sein müssen, um Fluchtversuche der Tiere wirksam zu verhindern. Die Arena muss zudem ausreichend großflächig sein, um in den Tieren ein Gefühl von Weite und Unüberschaubarkeit hervorzurufen. In der Erstbeschreibung des OF 1934 wurden primär die lokomotorische Aktivität sowie die Anzahl abgesetzter Kotballen als Maß für die emotionale Anspannung erfasst (Hall, 1934). Typische

Verhaltensparameter, die heute im OF-Test erhoben werden, stellen die Latenz, bis die Tiere die offene, hell beleuchtete Zentrumzone betreten, die Zeit, die sie dort im Vergleich zu an den Rändern der Arena verbringen, ihre motorische Aktivität und ggf. das Aufstellen auf die Hinterbeine, auch als „Rearing“ bezeichnet, dar (Walsh & Cummins, 1976).

Die DLB basiert auf der angeborenen Abneigung von Nagetieren gegen hell ausgeleuchtete Flächen und dem spontanen Drang, eine unbekannte Umgebung zu explorieren, was einen natürlichen Konflikt für das Tier darstellt (Crawley, 1980). Der Testapparat besteht in der Regel aus einer rechteckigen Arena, bei der das dunkle Kompartiment etwa 1/3 und das helle Kompartiment etwa 2/3 der Fläche einnehmen. Somit gibt es eine kleine, dunkle, „sichere“ Zone und eine große, hell ausgeleuchtete, „unsichere“ Zone (Bourin & Hascoët, 2003). Die beiden Kompartimente sind durch eine Öffnung verbunden, welche der Maus die freie Bewegung zwischen den beiden Bereichen ermöglicht. Es wird bewertet, wie viel Zeit die Mäuse in welchem Kompartiment verbringen, wobei die Zeit, die im hellen Bereich verbracht wird, ein Maß für exploratives Verhalten darstellt und indirekt proportional zum Angstniveau des Tieres ist (Costall & Naylor, 1997). Die Verabreichung von Anxiolytika führt zu einer gesteigerten Lokomotion sowie einer Verlängerung der Aufenthaltsdauer im hellen Kompartiment (Imaizumi & Onodera, 1993). Es gibt zwei Varianten, den DLB-Test durchzuführen: bei der ersten Variante wird die Maus zu Beginn des Tests in das helle Kompartiment gesetzt und die Latenz, bis sich die Maus in das dunkle Kompartiment begibt, gemessen, wobei eine kurze Latenz für ein hohes und eine lange Latenz für ein niedriges Angstniveau sprechen (Shimada et al., 1995). Bei der zweiten Variante, die im Rahmen dieser Studie angewandt wurde, setzt der Untersucher die Maus in eine Ecke des dunklen Kompartiments und erhebt die Latenzzeit, bis die Maus das erste Mal mit allen vier Pfoten in das helle Kompartiment eingetreten ist, wobei kurze Latenzen auf ein niedriges und lange Latenzen auf ein hohes Angstniveau hinweisen.

Im Rahmen dieser Studie wurden zwei unterschiedliche ethologische Angsttests untersucht, wobei in einer Kohorte ein aversiver OF-Test mit einer hohen Beleuchtungsintensität und in der anderen Kohorte ein DLB-Test durchgeführt wurde. Das aversive OF wurde als Verhaltensparadigma für einen unentrinnbaren aversiven Zustand gewählt und sollte „state anxiety“ bzw. Zustandsangst-ähnliches Verhalten hervorrufen und untersuchen. Der DLB-Test stellt durch das Vorhandensein eines „sicheren“ dunklen Kompartiments einen Angsttest mit der Möglichkeit zu Vermeidungsverhalten dar und misst somit „trait anxiety“ bzw. Eigenschaftsangst-ähnliches Verhalten. Die DLB wurde dem EPM aufgrund des ähnlicheren Aufbaus im Vergleich zum OF vorgezogen, wodurch eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den beiden Tests erzielt werden und auf das Einführen zusätzlicher, eventuell konfundierend wirkender anxiogener Parameter (wie beispielsweise Höhe), verzichtet werden konnte.

1.1.3 Neurobiologische Korrelate von Furcht, Angst und Panik

1.1.3.1 Modell des neuronalen Angst-Netzwerks

Bevor auf die einzelnen Gehirnregionen, auf die sich in dieser Studie fokussiert wurde, separat eingegangen wird, soll das neuronale Angst-Netzwerk an einem vereinfachten Modell erläutert werden. Das Angst-Netzwerk ist weniger gut charakterisiert als das Furcht-Netzwerk, allerdings zeigt sich eine große Überlappung zwischen den Regionen, welche in die Regulation von Furcht und Angst involviert sind, und auch die Output-Strukturen, welche die Verhaltensantworten vermitteln, sind vermutlich in weiten Teilen identisch. Sensorische Informationen über potentiell bedrohliche Reize werden zunächst im Thalamus gefiltert, von wo aus die Information zur Prozessierung des emotionalen Gehalts und zur Bewertung der emotionalen Valenz an die Amygdala weitergeleitet wird. Der laterale Kern der Amygdala (La) stellt hierbei die Input-Struktur der Amygdala dar. Im basolateralen Kern (BL) werden neben dem thalamischen Input auch Informationen aus dem Hippocampus verarbeitet, wobei hierbei v.a. dem ventralen Hippocampus eine wichtige Rolle für Angst zukommt und die Information prozessiert. Im Anschluss an die Prozessierung des Stimulus innerhalb der Amygdala, v.a. im BL, aktiviert der zentrale Kern der Amygdala (Ce), der die Output-Struktur der Amygdala darstellt, den Locus coeruleus (LC) sowie den Hypothalamus, wodurch ein Zustand physiologischer Erregung hervorgerufen wird. Dem präfrontalen Cortex (PFC) kommt eine wichtige Rolle in der top-down Modulation und Kontrolle der physiologischen, neuroendokrinen und verhaltensbezogenen Reaktionen zu (Averill et al., 2018).

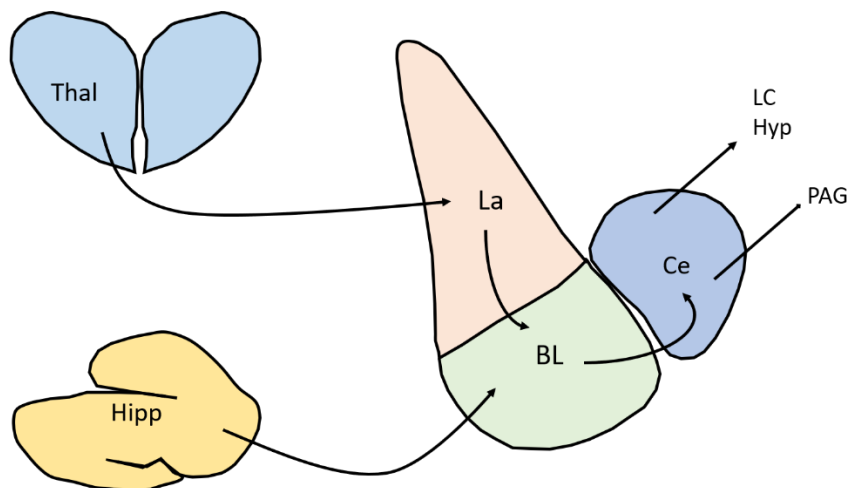


Abb. 1: Schematische Darstellung des Angst-Netzwerks

Thal = Thalamus, Hipp = Hippocampus, La= lateraler Kern der Amygdala, BL = basolateraler Kern der Amygdala, Ce= Zentraler Kern der Amygdala, LC = Locus coeruleus, Hyp = Hypothalamus, PAG = Periaquäduktales Höhlengrau

1.1.3.2 Modell des neuronalen Panik-Netzwerks

Panik wird über ein anderes neuronales Netzwerk vermittelt als Angst/Furcht, das darüber hinaus unterschiedlich moduliert wird. Einen zentralen Unterschied stellt die fehlende Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HHN)-Achse im Rahmen von Panikreaktionen dar (Kellner & Wiedemann, 1998; Levin et al., 1987). Darüber hinaus kommt der Amygdala im Panik-Netzwerk eine andere Funktion als im Angst-Netzwerk zu: während Patienten mit einem Erkrankungsbild, das mit fokalen bilateralen Amygdalaläsionen einhergeht, Schwierigkeiten haben, ängstliche Gesichter zu identifizieren (Adolphs & Tranel, 2000), keine Konditionierung auf furchtauslösende Reize (Bechara et al., 1995) und bei Exposition gegenüber typischerweise furchterregenden Stimuli keine Furchtreaktion zeigen (Feinstein et al., 2011), weisen sie interessanterweise eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber CO₂-induzierten Panikattacken auf (Feinstein et al., 2013). Dies weist darauf hin, dass die Amygdala zum einen für die Auslösung von Panikattacken nicht erforderlich ist, und einer funktionstüchtigen Amygdala zum anderen eine Rolle in der Verhinderung von Panikreaktionen zukommen könnte. Dies legen auch humane Studien, die eine Reduktion der grauen Masse in der Amygdala von Panikpatienten finden konnten, nahe (Asami et al., 2009). Darüber hinaus weist dieser Sachverhalt darauf hin, dass die Aktivierung des Angst-Netzwerks die Aktivierung des Panik-Netzwerks hemmen könnte und unterstreicht noch einmal, dass es sich bei Angst und Panik einerseits um unterschiedliche Entitäten handelt, bei denen unterschiedliche neuronale Strukturen von Relevanz sind und die sich in unterschiedlichen Verhaltensantworten äußern, und andererseits, dass angstbezogenes Verhalten hierarchisch organisiert ist, in dem Sinne, dass Furcht Panik hemmen kann. Die Aktivierung des Ce bei kontextbezogener Angst führt, vermutlich über Corticotropin Releasing Hormone (CRH)-Projektionen, zu einer Aktivierung der serotonergen Neurone in der ventrolateralen dorsalen Raphe/ventrolateralem Periaquäduktalen Höhlengrau (DRVL/VLPAG) (Peyron et al., 1998; Rizvi et al., 1991; Paul et al., 2014), was zu einer Unterdrückung physiologischer und verhaltensbezogener Panikreaktionen führt. Eine wichtige neuronale Struktur in der Vermittlung physiologischer und verhaltensbezogener Panikreaktionen stellt das dorsale periaquäduktale Höhlengrau (DPAG), und hierbei v.a. das dorsolaterale PAG (DLPAG) dar. Die Stimulation des DPAGs führt in Nagetieren zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems, was sich in Tachykardie und Hypertonie (Schenberg et al., 1993) sowie Fluchtverhalten (Beckett & Marsden, 1997; Jacob et al., 2002) niederschlägt. Menschen, die im Rahmen neurochirurgischer Eingriffe eine elektrische Stimulation des DPAGs erfuhren, berichteten über intensive Gefühle von Panik und Todesangst (Nashold et al., 1969). Während pharmakologisch induzierter Panikattacken konnte mithilfe der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ferner eine vermehrte Durchblutung des

insulären Cortex und des Tectums des Mittelhirns festgestellt werden (Reiman et al., 1989), was auf eine Beteiligung dieser Regionen bei der Panikreaktion hinweist.

Gemäß der Deakin-Graeff-Hypothese gibt es ein panikinhibierendes serotonerges System in der ventrolateralen DRVL/VLPAG, das in das DPAG projiziert und fluchtbezogenes Verhalten inhibieren kann (Deakin & Graeff, 1991). Die serotonergen Neurone in der DRVL/VLPAG sind Teil eines sympathomotorischen Kontrollzentrums (Kerman et al., 2006), reagieren auf Hyperkapnie (Johnson et al., 2005), werden durch panikogene Substanzen aktiviert (Johnson et al., 2008) und projizieren in Regionen, welche für die Panikantwort von Bedeutung sind, wie u.a. das DLPAG (Stezhka & Lovick, 1997). Die panikolytischen Effekte von 5-HT werden vermutlich über inhibitorische 5-HT_{1A}-Rezeptoren (5-HT_{1A}R) auf glutamatergen Neuronen und exzitatorische 5-HT_{2A}-Rezeptoren (5-HT_{2A}R) auf inhibitorischen GABAergen Neuronen im DPAG vermittelt (Pobbe & Zangrossi, 2005). Des Weiteren wird angenommen, dass in gesunden Individuen ein dämpfender Effekt des endogenen Opioidsystems im PAG zu einer Verhinderung von Panikattacken beiträgt, welches in Panikpatienten beeinträchtigt sein könnte (Graeff, 2017).

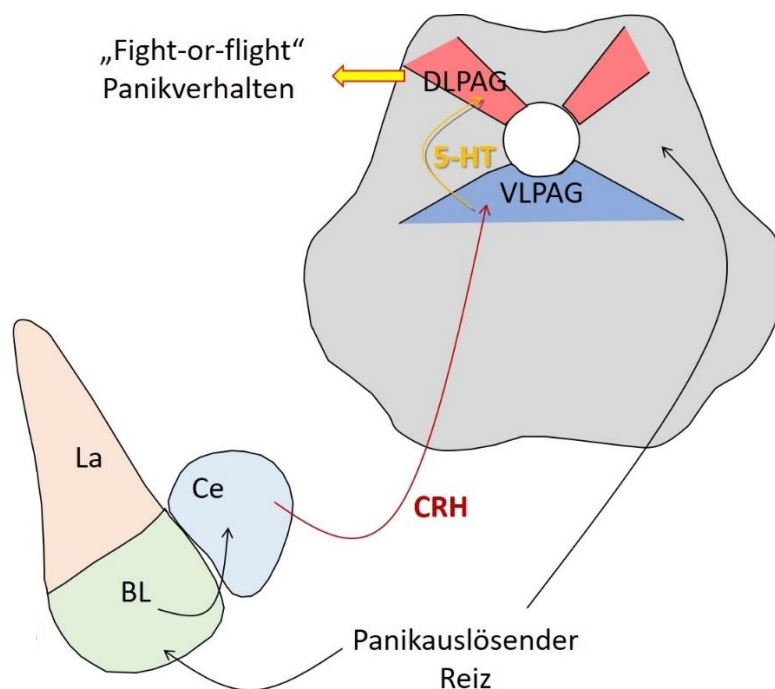


Abb. 2: **Schematische Darstellung des Panik-Netzwerks und des panikinhibierenden Systems**

La = Lateraler Kern der Amygdala, BL = basolateraler Kern der Amygdala, Ce = zentraler Kern der Amygdala, CRH = Corticotropin-releasing Hormone, VLPAG = ventrolaterales periaquäduktales Höhlengrau, DLPAG = dorsolaterales periaquäduktales Höhlengrau, 5-HT = Serotonin

1.1.3.3 Amygdala

Die Amygdala ist eine mandelförmige Struktur, die sich bilateral in den medialen Temporallappen befindet und der eine wichtige Rolle in der Prozessierung von Emotionen zukommt (LeDoux, 2000). Die Amygdala durchläuft wichtige Reifungsschritte während Kindheit und Jugend (Berdel et al., 1997), was sich in ihrer Vulnerabilität gegenüber den Effekten von frühem Stress widerspiegelt. Nachdem lange angenommen wurde, dass die Amygdala v.a. für die Encodierung aversiver Reize zuständig ist, gibt es immer mehr Hinweise, dass der Amygdala eine allgemeinere Rolle in der Belegung von Reizen mit affektiver Signifikanz, sowohl negativer als auch positiver, zukommt (Morrison & Salzman, 2010; Gore et al., 2015; Namburi et al., 2015).

Wie bereits in den Erläuterungen zum Angst-Netzwerk beschrieben, sind v.a. der laterale Kern (La), der vereinfacht zusammengefasst die Inputstruktur darstellt, der basolaterale Kern (BL), in dem vorwiegend die Prozessierung emotionaler Inhalte stattfindet und der zentrale Kern (Ce), der als Outputstruktur fungiert, für die Vermittlung von Angstverhalten wichtig. Die Amygdala erhält dichte serotonerge Innervation aus den Raphekernen (Parent et al., 1981), wobei in Nagetieren der BL stark, der La mäßig und der Ce nur spärlich von serotonergen Projektionen angesteuert wird (Steinbusch, 1981). Beim Primaten weist der Ce hingegen eine starke serotonerge Innervation auf (Bauman & Amaral, 2005). Man geht davon aus, dass der serotonergen Innervation der Amygdala eine wichtige modulatorische Funktion für die Emotionsprozessierung, und dabei v.a. für die Verarbeitung von angstbezogenen Reizen zukommt. Es konnte gezeigt werden, dass eine pharmakologische Steigerung der 5-HT-Spiegel, z.B. über die Applikation selektiver 5-HT-Wiederaufnahmehemmer (SSRIs), die Aktivierung der Amygdala durch emotionale Reize verändert (Preskorn et al., 2004). Des Weiteren ist bekannt, dass ein Polymorphismus im Gen für den 5-HT-Transporter (5-HTT, SLC6A4) die Amygdalaaktivierung angesichts aversiver Reize verändert, und dass die kurze Variante dieses Polymorphismus einen Risikofaktor für Erkrankungen aus dem affektiven Formenkreis darstellt (Lesch et al., 1996; Hariri et al., 2002).

Der BL, welcher die wichtigste Struktur für die Prozessierung emotionaler Reize darstellt, wird stark glutamaterg aus dem entorhinalen Cortex (McDonald & Mascagni, 1997), dem Hippocampus (Kishi et al., 2006) und dem medialen präfrontalen Cortex (mPFC) (McDonald et al., 1996) innerviert. Ferner erreicht den BL exzitatorischer Input von Projektionsneuronen aus dem La (Pitkänen et al., 1995). Der BL enthält zu 80% glutamaterge Prinzipalneurone (PNs) (McDonald, 1982), deren Aktivität durch GABAerge Interneurone (INs) reguliert wird (McDonald, 1982). Die GABAergen INs des BLs üben darüber hinaus eine „Feed-forward“-Inhibierung auf glutamaterge Projektionsneurone im La aus (Watanabe et al., 1995).

Sowohl die PNs als auch die INs des BL werden serotonerg aus den Raphekernen innerviert (Muller et al., 2007). 5-HT zeigt im BL eine überwiegend inhibitorische Wirkung, indem 5-HT v.a. GABAerge inhibitorische INs aktiviert, was zu einer verstärkten Inhibition der exzitatorischen PNs führt (Rainnie, 1999). Auf glutamatergen PNs im BL überwiegt zwar die Expression exzitatorischer 5-HT_{2A}R, jedoch scheint 5-HT insgesamt keine exzitatorische Wirkung in dieser Region auszuüben, wahrscheinlich, da der Effekt von 5-HT auf inhibitorische INs überwiegt (Yamamoto et al., 2014; Rainnie, 1999). Ein gewisser Anteil der PNs im BL kann 5-HT_{1A}R-vermittelt auch direkt durch 5-HT hyperpolarisiert werden (Rainnie, 1999; Saha et al. 2010). Im BL existieren viele verschiedene Arten von INs, die auf komplexe Weise mit anderen INs sowie PNs interagieren und zum Großteil serotonerg innerviert werden (Muller et al., 2007; Bonn et al., 2013). Parvalbumin exprimierende INs (PV+ INs) beispielsweise, die PNs und Somatostatin produzierende (SOM+) INs inhibieren und bei der Kontrolle von Furchtlernen eine Rolle spielen (Wolff et al., 2014), werden in der perisomatischen Region sowohl synaptisch, als auch nicht-synaptisch von 5-HT-Fasern innerviert (Muller et al., 2007), wobei der serotonerge Effekt wahrscheinlich v.a. über exzitatorische 5-HT_{2A}R vermittelt wird (McDonald & Mascagni, 2007). Basierend auf Studien an Mäusen, die eine Überexpression des 5-HTT aufweisen und einen wenig ängstlichen Phänotyp (Jennings et al., 2006) bei gleichzeitig reduzierter 5-HT_{2A}R-Aktivierung von PV+ INs zeigen (Bocchio et al., 2015), gibt es Hinweise, dass eine reduzierte Aktivierung des 5-HT_{2A}R auf PV+ INs mit verringertem Angstverhalten in Zusammenhang stehen könnte. Den SOM+ INs, welche ebenfalls von serotonergen Fasern innerviert werden (Muller et al., 2007), kommt vermutlich über die dendritische Inhibition von PNs ebenfalls eine Rolle in der Modulation von Angstlernen zu (Wolff et al., 2014). 30% dieser SOM INs koexprimieren Neuropeptid Y (NPY) (McDonald, 1989) und werden dicht von serotonergen Fasern innerviert (Bonn et al., 2013). Der Wirkung von 5-HT auf diese IN-Gruppe könnte eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Angst zukommen, da angenommen wird, dass die Aktivität von NPY+ Neuronen eine anxiolytische Wirkung vermittelt (Truitt et al., 2009).

Es konnte gezeigt werden, dass im BL 5-HT exprimierende Axonterminalen auch Appositionen mit 5-HT-negativen Terminalen bilden (Muller et al., 2007), was darauf hinweist, dass 5-HT die Erregbarkeit von Neuronen im BL nicht nur post-, sondern auch präsynaptisch modulieren kann. Zusammenfassend zeigen die erwähnten Studien, dass serotonerge Neurone der DR sowohl PNs als auch verschiedene GABAerge IN-Subpopulationen im BL sowohl synaptisch als auch extrasynaptisch innervieren, und dass 5-HT, je nach vorwiegender Rezeptorexpression der jeweiligen Neuronenpopulation, exzitatorisch oder inhibitorisch wirken kann.

Der La stellt die Inputstruktur der Amygdala dar, welche somatosensorische Informationen aus anderen Gehirnarealen empfängt. Es konnte eine 5-HT vermittelte Dämpfung der glutamatergen Neurotransmission von sensorischen Inputstrukturen auf Neurone des La gefunden werden (Stutzmann et al., 1998), darüber hinaus kann 5-HT 5-HT_{2C}R vermittelt glutamaterge Neurone im La

aktivieren (Yamamoto et al., 2014). Einerseits kann 5-HT im La PNs näher an die Schwelle für die Induktion von Aktionspotentialen bringen, gleichzeitig übt 5-HT über seine Wirkung auf INs eine Filterfunktion aus, um überflüssigen exzitatorischen sensorischen Input zu begrenzen und ein günstiges Verhältnis von Signal zu Rauschen zu gewährleisten (Stutzmann & LeDoux, 1999; Yamamoto et al., 2014; LeDoux et al., 1988). Interessanterweise scheint der modulatorische Effekt der serotonergen Neurotransmission auf glutamaterge Neurone im La von dem Stresshormon Corticosteron reguliert zu werden (Stutzmann et al., 1998).

Der zentrale Kern der Amygdala (Ce) stellt vereinfacht ausgedrückt die Outputstruktur der Amygdala dar und besteht aus einem lateralen und einem medialen Anteil. Besonders der mediale Anteil, der vermutlich unter tonischer inhibitorischer Kontrolle des lateralen Anteils steht (Ciocchi et al., 2010), projiziert in Effektorregionen für die Vermittlung von angstbezogenen Verhaltensweisen, wie den Hypothalamus und den Hirnstamm (Hopkins & Holstege, 1978; Veening et al., 1984; LeDoux et al., 1988). Im Ce gibt es relativ viele CRH-positive (CRH+) Neurone (Vázquez et al., 2006), welche durch angstauslösende Reize GR vermittelt aktiviert und vermehrt CRH mRNA produzieren können (Makino et al., 1994). Die CRH+ Neurone projizieren über den Bed Nucleus der Stria terminalis (BNST) in den PVN, was zu einer Aktivierung der Stressachse führt und angstähnliches Verhalten befördert (Feldman et al., 1994; Brunson et al., 2001). Gleichzeitig aktiviert Cortisol/Corticosteron wiederum CRH+ Neurone in der zentralen Amygdala (Schulkin, 2006; Thompson et al., 2004), wodurch ein wirksames „Feed-forward“-System für die Aufrechterhaltung der Stressantwort entsteht. Wie im vorherigen Abschnitt zum Panik-Netzwerk beschrieben, könnten CRH-Projektionen aus dem Ce außerdem anti-panische Wirkungen im PAG vermitteln und Fluchtreaktionen zugunsten einer Verhaltensinhibition unterdrücken (Paul et al., 2014). Eine andere Studie zeigte eine Rolle für CRH+ Neurone innerhalb des Ce in der Vermittlung konditionierter Fluchtreaktionen, wohingegen SOM+ Neurone in dieser Region Freezing bedingen (Fadok et al., 2017). Durch gegenseitige lokale Inhibition dieser neuronalen Subpopulationen innerhalb des Ce könnten ein schnelles und flexibles Switchen zwischen aktiven und passiven Verhaltensantworten auf bedrohliche Reize erreicht werden.

Im Rahmen von in vivo Mikrodialysestudien in Nagetieren konnte während und nach Stressreaktionen ein Anstieg der 5-HT-Spiegel innerhalb der Amygdala festgestellt werden (Kawahara et al., 1993; Mo et al., 2008). Wie oben ausgeführt, kann in Anbetracht der Komplexität der serotonergen Wirkmechanismen auf die Amygdala in Abhängigkeit von Unterkern, Rezeptorexpressionsprofil und neuronaler Zellpopulation jedoch kein pauschaler anxiogener oder anxiolytischer Effekt dieses stressinduzierten 5-HT-Anstiegs auf die Amygdala postuliert werden.

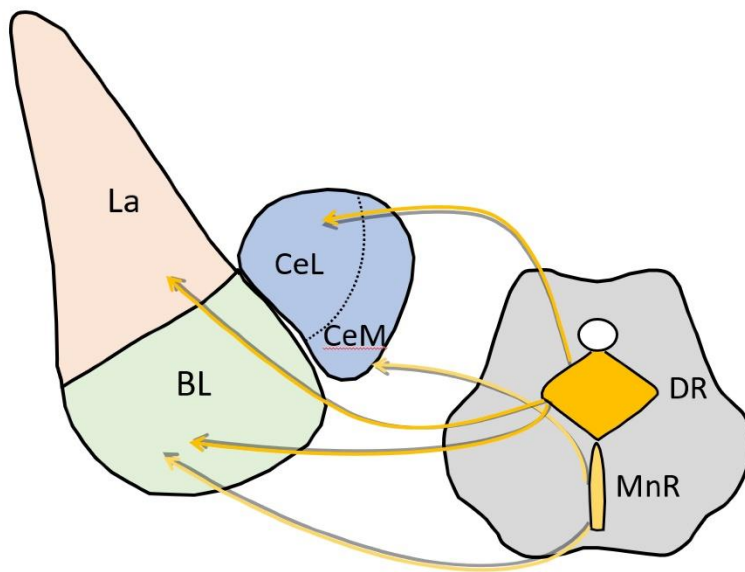


Abb. 3: **Schematische Darstellung der serotonergen Innervation der Amygdala**

La = lateraler Kern der Amygdala, BL = basolateraler Kern der Amygdala, CeL = lateraler Teil des zentralen Kerns der Amygdala, CeM = medialer Teil der zentralen Kerns der Amygdala, MnR = Mediane Raphekerne, DR = Dorsale Raphekerne. Orange/gelbe Pfeile = Serotonerge Projektionen aus DR/MnR

1.1.3.4 Paraventriculärer Kern des Hypothalamus (PVN)

Der PVN befindet sich im ventralen Diencephalon nahe dem dritten Ventrikel und stellt eine über unterschiedliche Spezies hinweg stark konservierte Gehirnregion dar (Machluf et al., 2011). Innerhalb des PVN gibt es drei verschiedene Zelltypen: parvozelluläre Neurone, magnozellanuläre Neurone und lange Projektionsneurone. Die parvozellulären Neurone stellen die erste Station der HHN-Achse dar und sezernieren CRH in die Eminentia mediana, welches zu einer Ausschüttung von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) aus Neuronen der Adenohypophyse führt, was wiederum in der Sekretion von Glucocorticoiden in der Nebennierenrinde resultiert (Swanson, 1983). Die magnozellanulären Neurone projizieren in den Hypophysenhinterlappen und sezernieren dort Oxytocin und Arginin-Vasopressin (AVP) (Swanson, 1983). Die langen Projektionsneurone projizieren v.a. in das Rhombencephalon und sind u.a. an der Regulation der Nahrungsaufnahme und des Energiehaushaltes beteiligt (Shah et al., 2014).

Die parvozellulären CRH+ Neurone werden bei Stressexposition durch Afferenzen aus dem noradrenergen LC, dem Nucleus tracti solitarii und der ventrolateralen Medulla, sowie limbischen Regionen wie dem BNST aktiviert (Qin et al., 2018). Darüber hinaus werden die CRH+ Neurone des PVN serotonerg aus den Raphekernen innerviert, wobei 5-HT eine exzitatorische Wirkung auf diese Neurone vermittelt (Rossi et al., 2010; Sawchenko et al., 1983).

Oxytocin, das aus den magnozellanulären Neuronen des PVN sezerniert wird, wird eine Rolle in der Prozessierung positiver emotionaler Inhalte sowie eine prosoziale Wirkung auf Verhalten zugeschrieben (di Simplicio et al., 2009; Bartz et al., 2011). Im PVN wirken Oxytocin und AVP inhibierend auf die Aktivität der HHN-Achse (Landgraf & Neumann, 2004), womit das oxytocinerge System ein die Stressachse dämpfendes System darstellt. Interessanterweise scheinen die parvozellulären CRH+ Neurone aber auch teilweise AVP und Oxytocin ausschütten zu können (Bondy et al., 1989). Auf Interaktionen zwischen dem oxytocinergen System und der HHN-Achse und ihre potentiellen Implikationen für die Stressantwort und Angstverhalten wird in der Diskussion näher eingegangen werden.

1.1.3.5 Periaquäduktales Höhlengrau (PAG)

Das PAG stellt eine anatomische wie funktionelle Schnittstelle zwischen dem Vorderhirn und dem Hirnstamm dar, welchem eine wichtige Rolle in der Modulation von Verhaltensantworten auf externe Stressoren, wie Bedrohungen aus der Umwelt, und interne Stressoren, wie z.B. Schmerzzustände, zukommt. Funktionell und cytoarchitektonisch kann das PAG in eine dorsomediale, eine dorsolaterale, eine laterale und eine ventrolaterale Säule unterteilt werden (Carrive, 1993; Bandler & Shipley, 1994). Das PAG erhält u.a. Afferenzen aus dem PFC, der Amygdala, dem Hirnstamm, dem Hypothalamus und sensorischen Neuronen des Hinterhorns des Rückenmarks sowie des Trigemini, wobei die Afferenzen säulenspezifisch organisiert sind (An et al., 1998). Das PAG projiziert, wiederum säulenspezifisch organisiert, in den Thalamus, den Hypothalamus, den somatosensorischen Cortex, den Hirnstamm, das Rückenmark und limbische Regionen wie die Amygdala und den anterioren cingulären Cortex (ACC) (Mantyh, 1983a; Mantyh, 1983b).

Das Vorhandensein eines imminently bedrohlichen Reizes führt zu einer Aktivierung des PAGs (Mobbs et al., 2007). Das laterale (LPAG) und dorsolaterale (DLPAG) PAG initiieren daraufhin eine „Fight-or-flight“-Antwort, die mit physiologischen Reaktionen wie Tachykardie und Blutdruckanstieg einhergeht (Keay & Bandler, 2001; Bandler et al., 2000; de Menezes et al., 2009). Im Gegensatz dazu fördern Neurone des ventrolateralen PAGs (VLPAG) Immobilität und verhindern panikartiges Verhalten durch ein serotonerges panikinhibierendes System, das vom DRVL/VLPAG ausgehend in das DPAG projiziert (Paul et al., 2014). Darüber hinaus kommt dem PAG eine Rolle in der Modulation von Schmerz zu, wobei eine Stimulation des PAGs schmerzlindernde Effekte vermittelt (Reynolds, 1969; Hosobuchi et al., 1977). Dieser antinozizeptive Effekt wird unter anderem über endogene Opioid- und Endocannabinoidrezeptoren vermittelt (Bernal et al., 2007; Finn et al., 2003). Endogenen Opioiden kommt darüber hinaus auch eine Rolle in der Regulation und Begrenzung von Panikreaktionen zu. So wird angenommen, dass in gesunden Individuen die Aktivität eines im PAG lokalisierten Erstickungsalarmsystems, welches bei Panikattacken aktiv ist, über endogene Opiode gedämpft wird. In Panikpatienten ist dieser Mechanismus womöglich gestört, was zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber CO₂ und Lactat mit einem erhöhten Auftreten von Panikattacken nach Exposition gegenüber diesen Substanzen führt (Preter & Klein, 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das serotonerge und opioiderge System im PAG bei der Regulation von Panikverhalten synergistisch agieren. Der panikolytische Effekt von SSRIs kann durch die Verabreichung des Opioidantagonisten Naloxon unwirksam gemacht werden (Roncon et al., 2012), was darauf hinweist, dass der antipanische Effekt von serotonergen Antidepressiva abhängig von der Verfügbarkeit und Wirksamkeit endogener Opiode ist.

1.2 „Early Life“-Stress

1.2.1 Die Rolle von „Early Life“-Stress in der Entwicklung psychischer Erkrankungen

Die Ausreifung des Gehirns stellt einen dynamischen Prozess dar, der sowohl von genetischen als auch von Umweltfaktoren beeinflusst wird. Zum Zeitpunkt der Geburt ist die Reifung des Gehirns noch nicht abgeschlossen; wichtige Prozesse, wie dendritisches und axonales Wachstum, sowie die Stabilisierung und Elimination von Synapsen erstrecken sich weit in die postnatale Zeit hinein (Bale et al., 2010). Dieser Umstand macht die perinatale Zeit zu einer besonders empfindlichen Phase gegenüber Einflüssen aus der Umwelt. Stress, dem der Organismus in diesem Lebensabschnitt ausgesetzt ist, hat langandauerndere und tiefgreifendere Auswirkungen auf die Gehirnfunktion und das neuroendokrine System als Stress, der im Erwachsenenalter erfahren wird (Everson-Rose et al., 2003; Provençal & Binder, 2015a). Es wird angenommen, dass Stress während früher Entwicklungsphasen das homöostatische Gleichgewicht der Stressantwort grundlegend und nachhaltig verändert und die frühe Stressexposition somit einen gemeinsamen Risikofaktor für viele Erkrankungen darstellt (Agorastos et al., 2018).

Stress bezeichnet ein Signal, das eine potentielle Gefahr und somit einen Zustand bedrohter Homöostase anzeigt, und hohe biologische Signifikanz besitzt, insofern es im Idealfall eine schnelle und nachhaltige Anpassung des Verhaltens an sich verändernde Umweltbedingungen ermöglicht und befördert (Calabrese et al., 2007; McEwen & Gianaros, 2011). Coping bezeichnet die Verhaltensantworten sowie physiologischen Reaktionen, die durch die Exposition gegenüber einem Stressor hervorgerufen werden und mithilfe derer dem Organismus die Bewältigung der herausfordernden Situation ermöglicht werden soll (Koolhaas et al., 1999). Die langfristigen Effekte von Stress hängen stark von dem Zeitpunkt, zu dem der Stress erfahren wird, der Intensität des Stressors, sowie der Dauer der Stresseinwirkung ab. Milder oder kurzandauernder Stress kann positive Effekte haben, indem z.B. Mechanismen der Gedächtnisbildung und Entscheidungsfindung gefördert werden, was die Ausbildung adaptiver Verhaltensweisen unterstützt. Wenn Stress hingegen in stärkerer Intensität und/oder über längere Zeiträume hinweg erfahren wird, überwiegen die schädigenden Einflüsse (McEwen & Gianaros, 2011; Schwabe et al., 2011). Besonders vulnerabel für die Effekte von Stress sind zum einen Strukturen, die zentrale Bestandteile kognitiver Netzwerke sind, wie der Hippocampus und der Präfrontale Cortex (PFC) und zum anderen Regionen, die für die Prozessierung von Emotionen essentiell sind, wie beispielsweise die Amygdala (Kim & Diamond, 2002; Lupien et al., 2009; Malter Cohen et al., 2013). Eine wichtige Bedeutung für die Auswirkungen eines Stressors auf den Organismus besitzt neben der objektiv bewertbaren Intensität auch die subjektive

Valenz des Stressors. Wiederholt auftretender Stress, der als überwältigend, unkontrollierbar und die Anpassungsfähigkeiten und Bewältigungsstrategien des Individuums überfordernd erlebt wird, kann langfristig zu einer gestörten Regulation der Stressantwort mit übersteigerten verhaltensbezogenen, emotionalen, sowie physiologischen und neuroendokrinen Reaktionen führen (Frodl & O'Keane, 2013). Stress, der vom Individuum als bewältigbar und kontrollierbar empfunden wird, kann den Organismus hingegen widerstandsfähiger und resilienter machen, und besser angepasste Reaktionen auf zukünftige Stressoren fördern (Lyons et al., 2009).

Dem derzeitigen Modell der Ätiologie von affektiven Erkrankungen liegt die Annahme zugrunde, dass eine Gen-Umwelt-Interaktion zwischen genetischer Prädisposition und Umwelteinflüssen, sowie deren epigenetische Regulation, eine zentrale Bedeutung für die Pathogenese dieser Störungen zukommt (Uher, 2014). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion zwischen Varianten des Monoaminoxidase A (MAOA)-Gens und Misshandlung in der Kindheit an der Entstehung von antisozialem Verhalten beteiligt ist (Caspi et al., 2002; Fergusson et al., 2012). Ein weiteres Beispiel für diesen Mechanismus stellt die Interaktion zwischen dem kurzen Allel des 5-HTT Längenpolymorphismus (5-HTTLPR) und Stressexposition dar, welche das Auftreten von Depression im Erwachsenenalter verstärkt (Caspi et al., 2003).

Einen zentralen Risikofaktor für die Entwicklung von Angsterkrankungen stellen ungünstige Lebensbedingungen während früher Entwicklungsphasen dar (Heim & Nemeroff, 2001). Die wohl bedeutsamste Form von frühem Stress ist durch Störungen der Mutter-Kind-Interaktion und -Bindung bedingt, beispielsweise durch emotionale oder körperliche Vernachlässigung, inkonsistente Zuwendung oder mangelnde Einfühlsamkeit (Sheridan & McLaughlin, 2014). Studien aus den USA konnten zeigen, dass in fast der Hälfte von in der Kindheit beginnenden psychischen Erkrankungen frühe negative Erlebnisse wie Vernachlässigung, inkonsistente Zuwendung und Missbrauch ursächlich beteiligt sind (Nemeroff, 2016). Darüber hinaus konnte eine robuste dosisabhängige Beziehung zwischen der Anzahl ungünstiger früher Lebensereignisse und dem Risiko für zahlreiche psychische Erkrankungen wie Angsterkrankungen, Depressionen, Psychosen, Somatisierungsstörungen und Suchterkrankungen im Erwachsenenalter identifiziert werden. Dieses Phänomen wird als kumulative Stresshypothese bezeichnet (McEwen, 2003; Anda et al., 2006). Erwachsene, die mindestens 4 Episoden früher negativer Erfahrungen in der Kindheit durchlebt haben, zeigen ein 4 bis 12-fach erhöhtes Risiko an Alkoholismus, Drogensucht oder Depression zu erkranken, und tragen ferner ein erhöhtes Risiko für Suizidversuche (Felitti et al., 1998). Auch für einige komorbide somatische und psychosomatische Erkrankungen wie Allergien, Bluthochdruck, Migräne und Reizdarmsyndrom konnten traumatische Erfahrungen in der Kindheit als Risikofaktoren ausgemacht werden (Post et al., 2013).

Die „Match/Mismatch“-Hypothese stellt ein weiteres Modell dar, das die potentiellen Auswirkungen von „Early Life“-Stress (ELS) auf Verhalten beschreibt, und trägt der Tatsache, dass ELS nicht immer a priori schädigend wirkt, Rechnung. Dieses Modell postuliert, dass ELS adaptiv wirken kann, indem der Organismus durch die Exposition gegenüber ELS auf ähnliche („matching“) aversive Bedingungen, wie die, die während der Entwicklung erfahren wurden, vorbereitet wird (Gluckman et al., 2007). Falls hingegen eine Inkongruenz („mismatch“) zwischen den ELS-Erfahrungen und späteren Stressoren vorliegt, sind die durch ELS beförderten Anpassungsmechanismen maladaptiv und können die Entwicklung von psychischen Störungen begünstigen (Nederhof & Schmidt, 2012; Daskalakis et al., 2013).

Im Folgenden soll kurz darauf eingegangen werden, wie früher Stress seine langanhaltenden schädlichen Konsequenzen vermittelt, stressbezogene Verhaltensantworten bis ins Erwachsenenalter hinein modifiziert und die Vulnerabilität des Organismus für psychische Erkrankungen erhöht. Traumatische Kindheitserlebnisse wie körperlicher, emotionaler oder sexueller Missbrauch sowie Vernachlässigung können eine gesteigerte physiologische Erregbarkeit (Jovanovic et al., 2009), eine intensivere Prozessierung von negativen Informationen (Pollak & Sinha, 2002; Pollak & Tolley-Schell, 2003) sowie eine Einschränkung der kognitiven Leistungsfähigkeit im Sinne einer verminderten Arbeitsgedächtnisleistung und einer verringerten Aufmerksamkeitsspanne zur Folge haben (Geoffroy et al., 2016; Masson et al., 2015). Diese Veränderungen können den Organismus empfindlicher gegenüber zukünftigen Stressoren machen und das Individuum für die Entwicklung psychischer Erkrankungen wie Depression, Suchterkrankungen oder Posttraumatische Belastungsstörung (PTBS) prädisponieren (Fergusson et al., 1996; Chapman et al., 2004; Faravelli et al., 2012). In diesem Zusammenhang hat das Konzept des „Biological embeddings“ an Bedeutung gewonnen, welches Mechanismen beschreibt, über die das Erleben von ELS während kritischer Phasen der Entwicklung durch daraus resultierende dauerhafte Veränderungen biologischer Prozesse Aspekte von Gesundheit und Krankheit bis ins Erwachsenenalter, und gegebenenfalls lebenslang, beeinflussen kann (Nist, 2017).

Ein wichtiger Pathomechanismus, über den die Stressexposition in frühen Entwicklungsphasen langanhaltende Veränderungen vermittelt, ist die Störung der Programmierung der HHN-Achse, welche während dieser kritischen Phase stattfindet und in einer pathologischen Reaktivität der Stressachse über das weitere Leben hinweg resultieren kann (Levine, 1967; Thompson, 1957). Die enge Verknüpfung zwischen der Dysregulation der Stressachse und psychischen Erkrankungen wird unter anderem dadurch unterstrichen, dass gesteigerte basale Cortisolspiegel einen prädiktiven Wert für das Risiko der Entwicklung von depressiven Episoden haben (Goodyer et al., 2001), und eine erfolgreiche antidepressive Therapie über eine Wiederherstellung normaler GR-Expressionsmuster (Pariante & Lightman, 2008) zur Normalisierung der gestörten HHN-Achsen-Funktion führt (Pariante,

2006), was wiederum prädiktiv für den langfristigen therapeutischen Erfolg des Patienten ist (Pariante, 2006). Von Bedeutsamkeit ist hierbei auch, dass ELS nicht nur zu einer höheren Inzidenz psychischer, v.a. affektiver Erkrankungen führen kann, sondern dass sich das Vorhandensein von ELS-Perioden in der Entwicklung darüber hinaus negativ auf die Therapieerfolge in der Behandlung der entsprechenden Erkrankungen auswirken kann. So konnte gezeigt werden, dass eine Vorgeschichte von körperlichem, emotionalem oder sexuellem Missbrauch vor dem Alter von 7 Jahren einen prädiktiven Faktor für ein verringertes therapeutisches Ansprechen auf eine SSRI-Therapie darstellt (Williams et al., 2016).

1.2.2 Tiermodelle zur Untersuchung von „Early Life“-Stress

Bei Säugetieren stellt die Anwesenheit der Mutter sowie die Qualität ihrer Fürsorge den bedeutsamsten und prägendsten Einflussfaktor während der frühen Entwicklung dar (Baram et al., 2012; Rincón-Cortés & Sullivan, 2014; Kundakovic & Champagne, 2015). Die Mutter ist nicht nur für die Ernährung des Nachwuchses unabdingbar, sondern sie vermittelt den Jungtieren auch die für die Entwicklung wichtige kontinuierliche sensorische Stimulation. Aus diesem Grund zielen die meisten Tiermodelle zur Untersuchung der Effekte von ELS auf eine Beeinträchtigung der Mutter-Kind-Interaktion ab, indem die Qualität oder die Quantität der mütterlichen Zuwendung eingeschränkt werden (Molet et al., 2014; Nishi, 2014). Mütterliches Brutpflegeverhalten ist in Nagetieren gut charakterisiert und beinhaltet verschiedene Verhaltensweisen, wie z.B. Stillen in gebeugter oder gesenkter Körperhaltung und Lecken sowie Putzen des Nachwuchses (Champagne et al., 2003). Die Auswirkungen auf das Verhalten der Jungtiere in späteren Lebensphasen sind abhängig von dem Zeitpunkt, zu dem das Jungtier gegenüber dem Stressor exponiert wurde, dem Charakter und der Intensität des jeweiligen Stressstimulus, sowie der Dauer der Stressexposition. Da eine langfristige Trennung von der Mutter zum Verhungern sowie zur Unterkühlung der Jungtiere führen würde, kommen meist intermittierende Stressparadigmen zur Anwendung (Millstein & Holmes, 2007). Eine andere Möglichkeit, mütterliches Pflegeverhalten zu verändern ohne die Jungtiere physisch von der Mutter zu trennen, ist die Exposition gegenüber einer durch Verknappung des Nistmaterials simulierten „Armut“ im Rahmen des „Limited nesting“ (LN)-Paradigmas (Rice et al., 2008), was zu gesteigertem Stress in den Muttertieren (Ivy et al., 2008) sowie infolge der unvorhersehbaren und fragmentierten Zuwendung durch die Mutter zu chronischem und anhaltenden Stress in den Jungtieren führt (Moriceau et al., 2009).

Unter ELS werden neben frühen postnatalen Stressparadigmen, die auf eine Beeinflussung der Mutter-Kind-Interaktion abzielen, auch pränatale Stress (PS)-Paradigmen subsummiert, bei denen die Jungtiere in utero Stress ausgesetzt sind. PS führt zu einer intrauterinen Exposition gegenüber erhöhten Glucocorticoidspiegeln (Reynolds et al., 2013), da maternale Glucocorticoide die Plazentaschranke in gewissem Ausmaß überwinden können. Bereits unter physiologischen Bedingungen sind in der Schwangerschaft die Gesamtcortisolspiegel im mütterlichen Blut 3 bis 8-fach (Rainey et al., 2004) und die Spiegel an freiem Cortisol 2 bis 4-fach erhöht (Nolten & Rueckert, 1981; Burke & Roulet, 1970). Eine Besonderheit während der Schwangerschaft ist zudem das Vorliegen einer positiven Feedbackschleife in der Steuerung der Glucocorticoidsekretion, im Gegensatz zu der postnatal vorliegenden negativen Feedbackregulation, welche die Glucocorticoidsekretion limitiert. In der Schwangerschaft führen erhöhte Cortisolspiegel daher zu einer Stimulation der Synthese von CRH in der Plazenta, was nachfolgend zu einer weiteren Erhöhung von CRH, ACTH und Cortisol führt (King et al., 2001; Wadhwa, 2005). Unter physiologischen Bedingungen können nur etwa 15% des mütterlichen Cortisols unmetabolisiert die Plazentaschranke überwinden (Murphy et al., 1974), was in etwa 10-fach niedrigeren Glucocorticoidspiegeln im fetalen im Vergleich zum mütterlichen Blut resultiert (Rainey et al., 2004). Die übermäßige und schädigende Exposition des Fetus gegenüber Glucocorticoiden wird durch das Enzym 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase 2 (11 β -HSD2) begrenzt, welches an der Synzytialschicht der Plazentazotten exprimiert wird und biologisch aktives Cortisol in inaktives Cortison umwandelt (Zhu et al., 2019). Es konnte gezeigt werden, dass akuter Stress die Expression von 11 β -HSD2 stimuliert und somit den Übertritt von Glucocorticoiden ins fetale Blut limitiert, während chronischer Stress die Expression von 11 β -HSD2 reduziert, wodurch der Fetus erhöhten Glucocorticoidspiegeln ausgesetzt ist (Mairesse et al., 2007; Ghaemmaghami et al., 2014; O'Donnell et al., 2012; Welberg et al., 2005; Jensen et al., 2012). In Übereinstimmung hiermit konnte eine erhöhte fetale Exposition gegenüber Glucocorticoiden in Phasen von chronischem oder besonders schwerwiegendem mütterlichen Stress beobachtet werden (O'Donnell et al., 2012). Ab dem 3. Trimester ist der Fetus in der Lage in Antwort auf mütterlichen Stress CRH und ACTH zu sezernieren, was zur Produktion von fetalen Glucocorticoiden führt (Fujioka et al., 1999; Gunn et al., 2013).

Ein vielfach verwendetes Paradigma, um schwangere Muttertiere zu stressen, ist die räumliche Beengung der schwangeren Mütter über mehrere Stunden und zu unvorhersehbaren Zeitpunkten in einem transparenten Plastikzylinder (Mandyam et al., 2008; van den Hove et al., 2011), wobei beispielsweise durch Anfeuchten des Bodens des Zylinders die Stressintensität weiter erhöht werden kann. Je früher in der intrauterinen Entwicklung ein Organismus Stress ausgesetzt ist, desto tiefgreifender und schwerwiegender scheinen die Auswirkungen auf das spätere Verhalten im adulten Tier zu sein (Mueller & Bale, 2008). Meist werden PS-Paradigmen in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft durchgeführt, da während dieser Zeitspanne die Differenzierung von für die

Stressantwort und emotionale Verhaltensweisen wichtigen Regionen wie Hypothalamus, Amygdala und Hippocampus, stattfindet (Bayer et al., 1993).

Maternale Separation (MS) ist eines der am häufigsten angewandten postnatalen ELS-Paradigmen und beinhaltet die intermittierende Trennung der Jungtiere von ihren Müttern, meist für einen Zeitraum von 2-3 Stunden täglich, und meist zwischen postnatalem Tag (P) 1 oder 2 und P 14. MS stellt eine Unterbrechung der mütterlichen Fürsorge und damit einen emotionalen und sozialen, sowie einen nutritionellen und thermischen Stressor für die Jungtiere dar. Auch für die Mütter stellen die Trennungsperioden eine Belastungssituation dar, was sich an durchgängig gesteigerten Corticosteronspiegeln 30 Minuten nach Trennung zeigt, wobei der Corticosteronanstieg im mütterlichen Blut weniger ausgeprägt als bei den Jungtieren ist (Levine et al., 1993).

Ein verwandtes postnatales ELS-Paradigma ist Maternale Deprivation (MD), in Rahmen dessen eine einzelne 24 stündige Trennung vom Muttertier, in den meisten Studien zum Zeitpunkt P9, vorgenommen wird (Marco et al., 2015).

Ein neueres ELS Paradigma und eine Variante des klassischen MS Paradigmas stellt „Early social deprivation“ (ESD) dar. Im Rahmen dieses Paradigmas werden die Jungtiere für eine gewisse Zeitdauer sowohl vom Muttertier als auch von ihren Wurfgeschwistern getrennt und isoliert einer neuen Umgebung ausgesetzt (Sandi & Haller, 2015).

MS hat in Studien unterschiedliche Auswirkungen auf das Verhalten der Jungtiere im Erwachsenenalter gezeigt, wobei der Genotyp und das Geschlecht der Tiere, speziesspezifische Unterschiede sowie die Dauer und Frequenz der Trennungsperioden wichtige Einflussfaktoren darstellen. Darüber hinaus spielt auch die Tatsache, ob die von der Mutter getrennten Jungtiere im Heimkäfig verbleiben (beispielsweise Sutanto et al., 1996) oder ob sie in einen neuen, sauberen Käfig transferiert werden (beispielsweise Aisa et al., 2008), eine Rolle. In Abhängigkeit von der angewandten Variante werden entweder die Jungtiere oder das Muttertier einer unbekanntem Umgebung ausgesetzt, was einen zusätzlichen Stressor neben dem trennungsbedingten Stress darstellen könnte.

Neben den durch den Trennungsstress an sich verursachten Effekten spielen auch Unterschiede im mütterlichen Pflegeverhalten in den Zeiten zwischen den Trennungsepisoden eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der langfristigen Auswirkungen auf das Verhalten des Nachwuchses. Die Jungtiere von Müttern, die ihren Nachwuchs häufig und intensiv lecken und putzen, allesamt Parameter für fürsorgliches Brutpflegeverhalten, zeigen im Erwachsenenalter eine niedrigere Stressresponsivität sowie bessere kognitive Leistungen, gesteigertes Explorationsverhalten und reduzierte Ängstlichkeit im Vergleich zu Nachkommen von Müttern, die diese fürsorglichen Verhaltensweisen weniger ausgeprägt zeigten (Korosi & Baram, 2010; Francis et al., 1999). Diese Verhaltensunterschiede gingen in den Nachkommen, die gesteigerte mütterliche Zuwendung

erhielten, mit Veränderungen verschiedener Komponenten der HHN-Achse, welche zu einer niedrigeren Aktivierung und einer verbesserten Feedbackregulation des Stresssystems führen, einher (Plotsky & Meaney, 1993; Plotsky et al., 2005, Meaney et al. 1985).

1.2.3 Auswirkungen von „Early Life“-Stress auf die Prägung und Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

Die HHN-Achse ist die wichtige hormonale Stressachse, deren Aktivierung zur Ausschüttung der Stresshormone Cortisol (in Menschen) bzw. Corticosteron (in Nagetieren) führt. Organismen sind stetig wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt, die potentiell bedrohlich sein können und Stressreaktionen hervorrufen, welche nach gut konservierten Mustern ablaufen (McEwen et al., 2015). Die Exposition gegenüber einem Stressor führt zu einer Aktivierung des Hypothalamus und von dort aus zunächst zu einer schnellen Stimulation des sympathischen Nervensystems, die in einer Ausschüttung von Noradrenalin (NA) und Adrenalin aus dem Nebennierenmark resultiert, was eine „Fight-or-flight“ Antwort hervorruft und u.a. mit einem gesteigerten physiologischen Erregungsniveau einhergeht. Etwas später in der Stressreaktion wird die HHN-Achse aktiviert, was in der Ausschüttung von Glucocorticoiden aus der Nebennierenrinde (NNR) resultiert. Zunächst wird hierbei im PVN des Hypothalamus CRH ausgeschüttet, welches die Freisetzung von ACTH aus der Adenohypophyse stimuliert, das wiederum die NNR aktiviert und zu einer Ausschüttung von Cortisol/Corticosteron in die Blutbahn führt. Das Stresshormon Cortisol/Corticosteron fördert zum einen katabole Stoffwechselforgänge, um Energiequellen für die Stressantwort bereitzustellen, zum anderen bereiten Glucocorticoide den Organismus auf potentielle Gefahren vor, indem die Vigilanz gesteigert und eine Fokussierung der Aufmerksamkeit sowie die Gedächtnisbildung gefördert werden (Jones & Moller, 2011). Über einen zu langen Zeitraum dauerhaft erhöhte Glucocorticoidspiegel können hingegen neurotoxische Effekte auf den Hippocampus, dem eine zentrale Rolle für die Begrenzung von Stresseffekten zukommt, vermitteln (Conrad et al., 2007).

CRH wirkt vor allem über den CRH-Rezeptor 1 (CRHR1), der im Hypophysenvorderlappen, wo CRH die Ausschüttung von ACTH reguliert, aber auch im PFC, Hippocampus, PVN und BL, allesamt wichtigen Strukturen in der Regulation von neuroendokrinen und verhaltensbezogenen Stressantworten, exprimiert wird (Refojo & Holsboer, 2009). In geringerem Ausmaß bindet CRH auch an CRHR2, welcher v.a. im ventromedialen Hypothalamus und der DR verbreitet ist (Steckler & Holsboer, 1999). Nach einer vereinfachten Auffassung soll die Aktivierung des CRHR1 v.a. für die Initiierung der Stressantwort relevant sein und anxiogene Effekte vermitteln (Fan et al., 2013), während CRHR2 vorwiegend an der

Begrenzung und Beendigung der Stressreaktion beteiligt sein soll, wobei diese vereinfachte Annahme zunehmend infrage gestellt wird (Henckens et al., 2016). Cortisol/Corticosteron gelangt über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn und kann dort Verhalten modulieren. Die Wirkung von Cortisol/Corticosteron wird v.a. über zwei Rezeptortypen vermittelt: den Mineralocorticoidrezeptor (MR) und den Glucocorticoidrezeptor (GR) (de Kloet et al., 2005). Beide Rezeptoren stellen nukleäre Rezeptoren dar, die nach Bindung durch Glucocorticoide in den Zellkern wandern und dort ihren regulatorischen Einfluss auf die Transkription entfalten. Darüber hinaus gibt es auch membrangebundene Glucocorticoidrezeptoren (Joëls, 2008), deren Aktivierung zu schnellen, nicht-genomischen Veränderungen der neuronalen Erregbarkeit und Aktivität führen (Groeneweg et al., 2011). Der MR zeigt eine regional limitierte Expression und ist z.B. stark im Hippocampus, und schwächer in der Amygdala, verbreitet. Der GR zeigt hingegen eine breitere Verteilung mit besonders hohen Konzentrationen im PVN. In den serotonergen Neuronen der Raphekerne überwiegen ebenfalls GRs. MRs zeigen eine hohe Affinität gegenüber Glucocorticoiden, weshalb sie auch unter Ruhebedingungen immer in einem gewissen Ausmaß mit Glucocorticoiden gebunden sind. GRs besitzen hingegen eine 10-fach geringere Affinität für Glucocorticoide und sind daher nur unter Stressbedingungen vollständig durch Glucocorticoide gebunden und somit aktiv. Die lokale Glucocorticoidwirkung wird u.a. durch die regionalen Verteilungsprofile der MRs und GRs, die unterschiedliche Affinität der Rezeptoren sowie die Ausschüttungsmuster der Glucocorticoide bestimmt (Joëls et al., 2012).

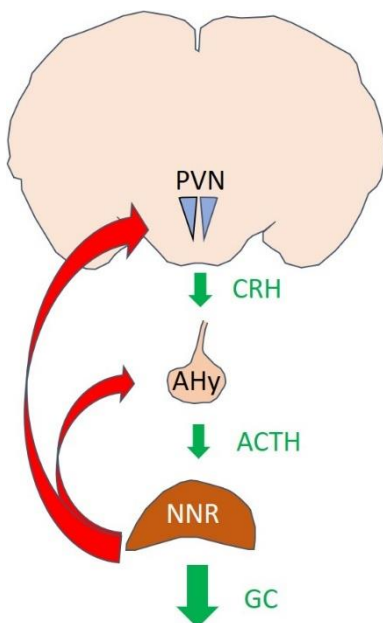


Abb. 4: **Schematische Darstellung der Wirkungsweise der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse (HHN-Achse).** PVN = Paraventriculärer Kern des Hypothalamus, CRH = Corticotropin Releasing Hormone, AHy = Adenohypophyse, ACTH = Adrenocorticotropes Hormon, NNR = Nebennierenrinde, GC = Glucocorticoide. Grüner Pfeil = aktivierender Effekt, Roter Pfeil = inhibierender Effekt.

Die ersten zwei postnatalen Wochen im Leben von Nagetieren (P4-14 bei Ratten, P1-12 bei Mäusen) werden als „stresshypo-responsive Phase“ (SHRP) bezeichnet. Während dieser Zeit ist die HHN-Achse relativ unbeeinflussbar gegenüber verschiedenen Stressoren, was sich in niedrigen basalen Corticosteronspiegeln, einer reduzierten Sensitivität gegenüber CRH sowie fehlenden Verhaltensantworten auf Stressreize widerspiegelt. In diesem Zeitraum findet vermutlich die bei Geburt noch nicht abgeschlossene Reifung der HHN-Achse statt. So konnte u.a. gezeigt werden, dass während dieses Zeitraums in Mäusen ein stetiger Anstieg der MR-Expression sowie eine Reduktion der Expression von GRs im Hippocampus stattfindet (Schmidt et al., 2003). Man vermutet, dass die während dieser frühen postnatalen Phase reduzierte Aktivität der HHN-Achse das sich entwickelnde, vulnerable Gehirn gegen die schädigende Wirkung von Glucocorticoiden schützen soll. Ferner ist bekannt, dass auch die Amygdala während des Zeitraums der SHRP ausreift und in dieser Phase hypo-responsive gegenüber stimulierenden Reizen ist. Durch ELS kann die Reifung der Amygdala beschleunigt werden, und dieser Effekt ist durch Glucocorticoide vermittelt (Moriceau et al., 2006; Moriceau et al., 2009), was darauf hinweisen könnte, dass das Verhindern von frühem Angstlernen ein weiterer Grund für die Existenz der SHRP sein könnte. Wie genau die SHRP eingeleitet und wie sie beendet wird, ist noch nicht abschließend geklärt. Man vermutet, dass der SHRP eine gesteigerte Effizienz des negativen Glucocorticoid-Feedbackloops zugrunde liegt, wofür auch spricht, dass die Applikation eines GR-Antagonisten bei jungen Mäusen, die sich in der SHRP befinden, zu einem Anstieg der hypothalamischen CRH mRNA, und im Folgenden zu erhöhten Plasma-ACTH- und Corticosteronspiegeln führt (Schmidt et al., 2005). Dies zeigt, dass die während der SHRP inhibierte HHN-Achse durch GR-Antagonisten disinhibiert werden kann. Auch Stressexposition im Sinne von längeren (mindestens 3 Stunden täglich dauernden) Trennungsepisoden von der Mutter während der SHRP kann dazu führen, dass die Jungtiere die SHRP verlassen, was zu einer verstärkten Aktivierung des PVN (Smith et al., 1997) und gesteigerten basalen sowie stressinduzierten Corticosteronspiegeln führt (Stanton et al., 1988). Dies bedeutet allerdings auch, dass die SHRP nicht durch eine uneingeschränkte Stresshypo-responsivität gekennzeichnet ist. Während typische Stressoren des Erwachsenenalters, wie beispielsweise Beengungsstress, in jungen Mäusen typischerweise zu keiner Stressantwort führen, weisen die Jungtiere durchaus eine gesteigerte HHN-Achsen-Aktivität nach MS oder Hypothermiestress auf (Pihoker et al., 1993; Plotsky & Meaney, 1993; Walker et al., 1991; Yi & Baram, 1994), welche mit einer gesteigerten CRH-Ausschüttung einhergeht (Plotsky & Meaney, 1993; Yi & Baram, 1994; Dent et al., 2000; Hatalski et al., 1998). Somit herrscht in der SHRP keine globale Stresshypo-responsivität vor, sondern die Aktivität des Stresssystems scheint so reguliert zu sein, dass nur auf für in dieser spezifischen Phase relevante bedrohliche Reize reagiert wird.

Beim Menschen existiert ebenfalls das Konzept einer SHRP, während welcher im Alter von etwa 4 bis 12 Monaten die Stressachsenaktivität gedämpft sein soll (Gunnar & Donazella, 2002; Gunnar &

Cheatham, 2003; Lewis & Ramsay, 1995). Interessanterweise zeigt sich ein supprimiertes Cortisolausschüttungsmuster während dieser Entwicklungsphase jedoch nur bei Kindern mit einem sicheren Bindungsstil, während Kinder mit einem unsicheren oder desorganisierten Bindungsstil hohe Cortisolantworten aufweisen (Gunnar & Cheatham, 2003), was nochmals die Bedeutung der Mutter-Kind-Interaktion für die regelrechte Ausprägung der HHN-Achse in dieser vulnerablen Phase unterstreicht.

Auf molekularer Ebene konnten infolge von ELS Veränderungen in der Regulation und Funktion verschiedener wichtiger Komponenten des Stresssystems identifiziert werden, welche u.a. von der Art des frühen Stressparadigmas abhängig sind.

Für klassische MS-Paradigmen, bei denen die Jungtiere 3 Stunden täglich von der Mutter getrennt wurden, zeigten sich in adulten Tieren gesteigerte Corticosteronspiegel nach Stressexposition (Plotsky & Meaney, 1993; Ladd et al., 2005; Plotsky et al., 2005; Lippmann et al., 2007; Wu et al., 2014; Lajud et al., 2012), wohingegen die basalen Corticosteronspiegel im Erwachsenenalter in den meisten Studien unbeeinflusst waren (Plotsky & Meaney, 1993; Ladd et al., 2005; Plotsky et al., 2005; Lippmann et al., 2007). Diese Effekte von mütterlichem Trennungstress auf die neuroendokrine Antwort werden vermutlich über Veränderungen in der Expression des hippocampalen GRs sowie von CRH im Hypothalamus vermittelt (Nishi, 2014).

Nach MD, also einer einmaligen 24stündigen Trennungsepisode von der Mutter während der SHRP, zeigten sich altersabhängige Unterschiede in der HHN-Achsen-Aktivität: In juvenilen Ratten, die während der SHRP einem MD-Paradigma unterzogen wurden, zeigten sich erhöhte basale sowie stressinduzierte Corticosteronspiegel (z.B. Avishai-Eliner et al., 1995; Smith et al., 1997; van Oers et al., 1998a, van Oers et al., 1998b, Dent et al., 2000). In 3 Monate alten Ratten zeigten sich hingegen gesteigerte basale Corticosteronspiegel bei gleichzeitig abgeschwächten Corticosteronstressantworten, wohingegen in 5-12 Monate alten Ratten wiederum die basalen Corticosteronspiegel normal, und die stressinduzierten Corticosteronspiegel erhöht waren (Workel et al., 2001; Lehmann et al., 2002). Eine Studie konnte außerdem zeigen, dass die negativen Effekte von MD auf kontextbezogenes und räumliches Denken durch eine 3-tägige Behandlung mit einem GR-Antagonisten zu einem späteren Zeitpunkt in der Entwicklung verhindert werden konnten (Loi et al., 2017a).

Eine Verknappung von Nistmaterial während der frühen postnatalen Periode im Rahmen des LN-Paradigmas führt in Mäusen zu einer veränderten HHN-Achsenreaktivität mit in den meisten Studien erhöhten basalen Corticosteronspiegeln, teilweise bis ins Erwachsenenalter hinein (Brunson et al., 2005; Rice et al., 2008; Liao et al., 2014; Naninck et al., 2015). Diese Effekte konnten durch CRHR1- oder GR-Blockade verhindert werden (Liao et al., 2014).

Stress im Rahmen des ESD-Paradigmas, bei der die Jungtiere für eine festgelegte Zeitspanne sowohl

von der Mutter, wie auch von den Wurfgeschwistern getrennt werden (Sandi & Haller, 2015), führte im juvenilen Alter zu gesteigerten basalen sowie stressinduzierten Corticosteronspiegeln (Avishai-Eliner et al., 1995), in adulten Tieren hingegen zu unveränderten basalen Corticosteronspiegeln und interessanterweise reduzierten Corticosteronantworten auf Stress (Rüedi-Bettschen et al., 2006; Zhang et al., 2014; Pryce et al., 2003), was auf eine Hyporeaktivität der HHN-Achse nach ESD hinweist.

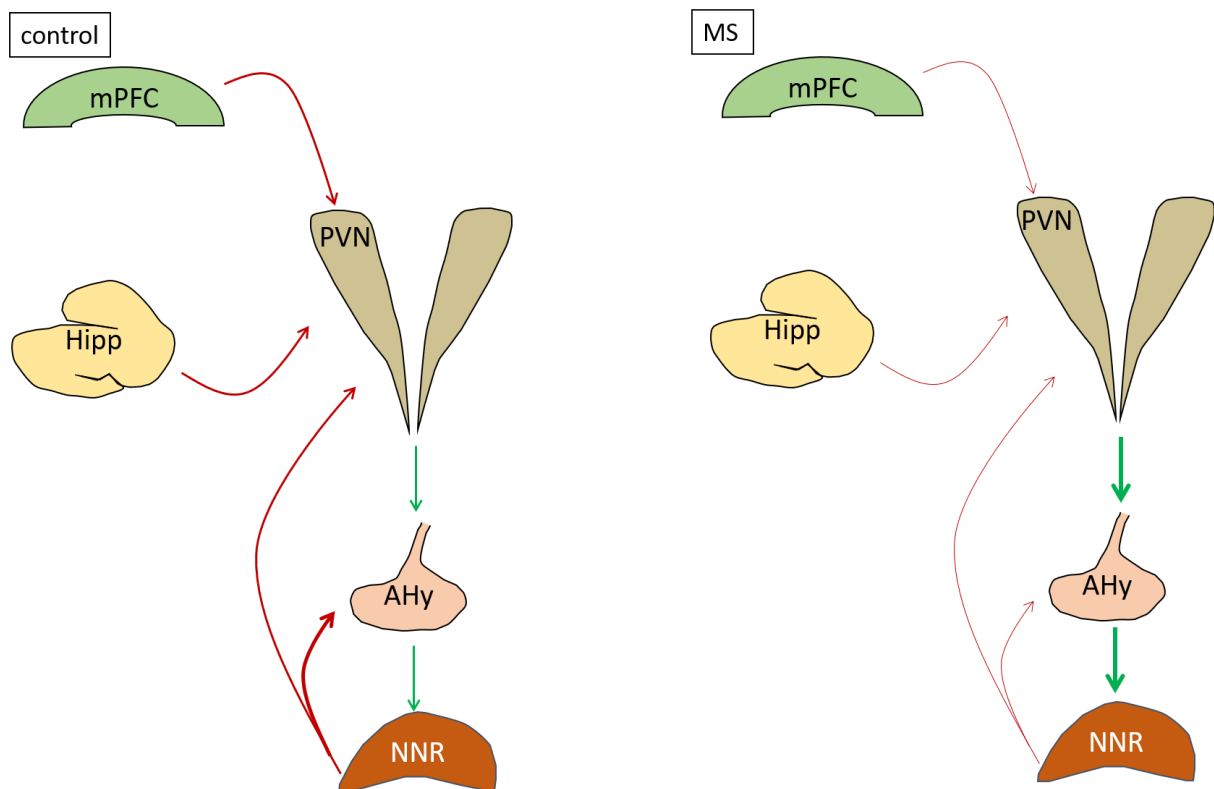


Abb. 5: Schematische Darstellung des Effektes von Maternaler Separation auf die Aktivität und Funktionsweise der HHN-Achse

mPFC = medialer präfrontaler Cortex, Hipp = Hippocampus, PVN = paraventriculärer Kern des Hypothalamus, AHy = Adenohypophyse, NNR = Nebennierenrinde, MS = Maternale Separation. Roter Pfeil = inhibierender Effekt, Grüner Pfeil = aktivierender Effekt. Pfeilstärke spiegelt Wirkstärke wider.

Auch die Exposition gegenüber PS führt in den Nachkommen zu einer Beeinträchtigung der HHN-Achsen-Funktion (Sosnowski et al., 2018). PS führte in zahlreichen Studien zu einer gesteigerten Corticosteronstressantwort mit sowohl gesteigerten Corticosteronspitzenpiegeln als auch einer verlängerten Corticosteronantwort, wohingegen die basalen Corticosteronspiegel unverändert blieben (z.B. Henry et al., 1994; Maccari et al., 1995; Chung et al., 2005). Infolge von Stressexposition in utero während der fetalen Periode konnten Veränderungen der GR- und CRH-Expression, die mit einer gesteigerten HHN-Achsen-Reaktivität im Erwachsenenalter einhergingen, gefunden werden

(Mueller & Bale, 2008). Sowohl die Exposition gegenüber PS als auch die pränatale Applikation exogener Corticosteroide führt im PVN zu einer Verminderung der lokalen GR-Expression (Bingham et al., 2013), was darauf hinweisen könnte, dass PS die Regulation der HHN-Achsen-Aktivität auf Ebene des PVN abschwächt, indem durch eine verringerte GR-Expression im PVN die Wirkung des GR-vermittelten negativen Feedbackloops vermindert wird. Eine Minderexpression von hippocampalen GRs wird ferner ebenfalls für eine unzureichende Begrenzung der HHN-Achsenaktivität und nachfolgend eine überschießende Stressantwort verantwortlich gemacht (Szyf et al., 2005).

Zusammenfassend üben die Exposition gegenüber pränatalem und postnatalem Stress weitgehend ähnliche Effekte auf die Funktion der HHN-Achse aus, indem beide Paradigmen beispielsweise zu einer Erhöhung der stressinduzierten Corticosteronantwort führen, einige Studien fanden aber auch Unterschiede zwischen den beiden ELS-Designs. Beispielsweise zeigte sich in weiblichen Ratten ein Anstieg der basalen Plasma-ACTH-Spiegel nach PS, hingegen nicht nach MS (McCormick et al., 1995; Brunton & Russell, 2010). Im Rahmen des ESD-Stressparadigmas mit Trennung der Jungtiere von Muttertier und Wurfgeschwistern (Sandi & Haller, 2015), zeigten sich im Gegensatz zu den anderen ELS-Paradigmen im Erwachsenenalter verminderte stressinduzierte Corticosteronantworten, was auf eine ELS-induzierte Hyporesponsivität der HHN-Achse hinweist (Rüedi-Bettschen et al., 2006).

Einen wichtigen Mechanismus in der Vermittlung der Effekte von ELS auf die Prägung der Stressachse sowie auf Verhaltensweisen im Erwachsenenalter stellen epigenetische Veränderungen dar (Cowan et al., 2016). Epigenetische Veränderungen sind auf die Folgegenerationen übertragbare Modifikationen der Genexpression, die nicht mit einer Änderung der DNA-Sequenz einhergehen. Während die DNA, abgesehen von zufällig auftretenden Mutationen, über die gesamte Lebensdauer hinweg eine hohe Stabilität aufweist, verändern sich epigenetische Signaturen vor allem während früher Entwicklungsphasen stark, z.B. durch Methylierung, posttranslationale Modifikation von Histonen oder die Wirkung nicht-codierender RNAs (Canovas & Ross, 2016). In Säugetieren besteht eine ausgeprägte epigenetische Plastizität in der Zeitspanne von der fetalen Entwicklung bis zur Entwöhnung der Jungtiere von der Muttermilch (Hochberg et al., 2011). Während dieser Zeit erfahrene negative Umwelteinflüsse, wie das Erleben psychosozialen Stresses, können zu epigenetischen Veränderungen mit weitreichenden Auswirkungen auf die Plastizität des Gehirns führen und in psychischen Auffälligkeiten im Erwachsenenalter resultieren können (McGowan & Roth, 2015; Provencal & Binder, 2015b; Halldorsdottir & Binder, 2017). In einer Vielzahl von ELS-Modellen an Nagetieren konnten beträchtliche Unterschiede in den DNA-Methylierungsmustern sowie Histonmodifikationsprofilen in gestressten im Vergleich zu ungestressten Tieren nachgewiesen werden (Champagne, 2012; Doherty & Roth, 2016). Beispielsweise zeigten sich nach fetaler Stressexposition Veränderungen im Methylierungsgrad und hieraus resultierend in der Expression, der

für die Stressantwort wichtigen Gene von GR und CRH, was mit einer erhöhten Stressresponsivität der HHN-Achse in adulten Tieren einhergeht (Mueller & Bale, 2008). Besonders wichtig ist hierbei der GR, da diesem eine essentielle Rolle in der Feedbackregulation und somit der Begrenzung der Stressantwort zukommt. Durch frühe Stressexposition zeigt sich die Methylierung des für den GR codierenden Gens v.a. in den für Stress relevanten Regionen Hippocampus und PVN verändert (McGowan et al., 2009; Bockmühl et al., 2015). So wiesen Nachkommen, deren Mütter ein wenig fürsorgliches Verhalten zeigten, in dem Sinne, dass sie wenig Zeit für die Pflege der Jungtiere aufwandten, ein verstärktes Methylierungsniveau des für den GR codierenden Gens NR3C1 auf. Wenn diese Jungtiere allerdings mit sehr fürsorglichen „Adoptivmüttern“ aufwuchsen, die viel Zeit mit dem Lecken und Putzen der Jungtiere verbrachten, unterschieden sich ihre Methylierungssignaturen nicht von Jungtieren, die von gut umsorgenden Müttern geboren und aufgezogen wurden (Weaver et al., 2004). Dies bedeutet, dass besonders fürsorgliches mütterliches Verhalten die verstärkte Methylierung des GR-Promotors reduzieren kann, was zu einer verstärkten Expression des GRs und somit einer verbesserten negativen Feedbackregulation der HHN-Achse führt, wodurch eine wirksamere Begrenzung der HHN-Achsen-Reaktivität nach Stressexposition erreicht werden kann (Szyf et al., 2005). Die potentielle Reversibilität von durch ELS bedingten epigenetischen Veränderungen durch eine positive Modifikation der Umweltbedingungen ist ein interessantes Phänomen mit hoher klinischer Relevanz und könnte einen Ansatzpunkt darstellen, über pharmakologische oder umweltbezogene Interventionen die schädigenden Wirkungen von ELS auf das Individuum abzuschwächen oder gar rückgängig zu machen.

Zusammenfassend geht die aktuelle Hypothese davon aus, dass sich die HHN-Achse während der SHRP in einer sensiblen Phase der Entwicklung befindet und noch nicht in der Lage ist, über kompensatorische Feedback-Mechanismen die durch ELS induzierten exzessiv erhöhten Glucocorticoidspiegel zu regulieren. Diese unphysiologisch erhöhten Glucocorticoidkonzentrationen setzen daraufhin eine epigenetische Programmierungskaskade in Gang, welche die Sensitivität und Reaktivität der HHN-Achse tiefgreifend und nachhaltig modifiziert (McIlwrick et al., 2016).

In humanen Studien bilden sich in weiten Teilen mit den im Tiermodell beobachteten Effekten vergleichbare Auswirkungen von ELS auf das Stresssystem ab. Humane Studien konnten zeigen, dass Frauen, die an Depression erkrankt waren und Misshandlungen in der Kindheit erfahren hatten, 6-fach erhöhte ACTH-Spiegel aufwiesen, was die Hypothese unterstützt, dass frühe negative Kindheitserlebnisse zu dauerhaften Veränderungen in der HHN-Achsen-Reaktivität führen (Heim et al., 2000). Ferner konnte in gesunden Individuen, die Kindheitstraumata erlebt hatten, eine verstärkte Methylierung des Promotors des NR3C1-Gens, was wie oben erörtert, mit einer verringerten Expression des GRs und somit einer weniger effektiven negativen Feedbackregulation einhergeht, gefunden werden (Tyrka et al., 2012). In psychisch erkrankten Erwachsenen war das gesteigerte

Methylierungsniveau des NR3C1-Promotors mit der Schwere der erlebten negativen Kindheitsereignisse assoziiert (Perroud et al., 2011). Diese durch frühe Stressereignisse bedingten nachhaltigen neuroendokrinen Veränderungen könnten Erwachsene mit ELS-Erlebnissen in der Vergangenheit anfälliger für psychische Erkrankungen wie Depression machen (Heim & Binder, 2012), wodurch die nachhaltige Dysregulation der HHN-Achse durch ELS das Bindeglied in der Vermittlung der Effekte von ELS auf psychische Erkrankungen im Erwachsenenalter darstellt.

Auch nach pränataler Stressexposition konnten in humanen Studien langanhaltende Veränderungen des Stresssystems gefunden werden. Das Vorhandensein von mütterlichen Angsterkrankungen oder Depressionen während des 3. Schwangerschaftstrimesters war bei ihren 3 Monate alten Kindern mit einer verstärkten Methylierung des für den GR codierenden Gens NR3C1 sowie einer gesteigerten Cortisolausschüttung auf Stressreize hin assoziiert (Oberlander et al., 2008). Auch die basalen Cortisolspiegel zeigten sich bei Kleinkindern, deren Mütter in der Schwangerschaft depressiv waren und wenig soziale Unterstützung erhielten, erhöht (Luecken et al., 2015). Bemerkenswerterweise führte das Vorliegen einer pränatalen mütterlichen Depression zu geschlechtsdichotomen Effekten in Schulkindern: es zeigten sich geschlechtsspezifisch unterschiedliche Methylierungsmuster des NR3C1-Gens sowie eine erniedrigte Cortisolausschüttung in Jungen, jedoch eine gesteigerte Cortisolausschüttung in Mädchen (Stonawski et al., 2018).

Kinder, die besonders schwerem Stress ausgesetzt waren (beispielsweise im Rahmen gravierender Vernachlässigung oder schwerwiegenden Missbrauchs in Waisenhäusern oder anderen Institutionen), wiesen interessanterweise nicht erhöhte, sondern erniedrigte basale Cortisolspiegel auf (Carlson & Earls, 1997; Gunnar & Donzella, 2002; Bruce et al., 2009). Diese Ergebnisse ähneln jenen aus dem besonders stressvollen ESD-Paradigma in Nagetieren, wo ebenfalls erniedrigte Corticosteronspiegel gemessen werden konnten (Rüedi-Bettschen et al., 2006). Dieser Hypocortisolismus nach frühem Stress könnte entweder durch eine Hypersensitivität der Zielgewebe gegenüber Corticosteroiden (Yehuda et al., 2006) oder durch eine reduzierte Ausschüttung von ACTH aus der Adenohypophyse in Antwort auf die CRH-Ausschüttung aus dem Hypothalamus bedingt sein (Fries et al., 2005). Bemerkenswerterweise kann eine Kombination aus Hypocortisolismus bei gleichzeitig erhöhter Sensitivität gegenüber Glucocorticoiden auch in Patienten mit PTBS gefunden werden (Rohleder et al., 2004).

Für die Beurteilung der in Studien gefundenen Auswirkungen von ELS auf die Stressachse ist es wichtig, modulierende Faktoren, wie den Zeitpunkt, zu dem ein Stressor appliziert wird, die Intensität eines Stressors, sowie speziesspezifische und genetische Unterschiede, zu berücksichtigen, da diesen eine maßgebliche Rolle in der Vermittlung der Effekte von ELS zukommt. Auf diese Aspekte wird im Folgenden eingegangen.

Die Auswirkungen von ELS auf die HHN-Achse und spätere Verhaltensweisen sind unter der Annahme einer für die Pathogenese relevanten Gen x Umwelt-Interaktion immer unter Berücksichtigung des genetischen Hintergrunds zu betrachten. Ein in diesem Zusammenhang relevantes und für die Regulation der Effekte von ELS auf die HHN-Achse wichtiges Beispiel ist das FKBP5-Gen. FKBP5 kann als Co-Chaperon mit dem GR-Komplex interagieren und so die Affinität des GRs für Cortisol regulieren (Binder, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von ELS mit spezifischen SNPs des FKBP5-Gens die Schwere adulter PTBS Symptome vorhersagen kann (Binder et al., 2008). Dieser Effekt ist vermutlich durch eine allelspezifische Demethylierung des GC-response Elements von FKBP5 bedingt, was zu einer Resistenz des Gewebes gegenüber Glucocorticoiden führt (Klengel et al., 2013). Ferner konnte gezeigt werden, dass ein Interaktionseffekt zwischen den Minorallelen von FKBP5 und ELS das Auftreten von aggressivem Verhalten (Bevilacqua et al., 2012), Suizidversuchen (Roy et al., 2010) und Depression (Zimmermann et al., 2011) erhöht.

Der Zeitpunkt in der Entwicklung, zu dem aversive Lebensereignisse auftreten, bestimmt entscheidend die Auswirkungen auf die Ausbildung der HHN-Achse und deren Regulation im späteren Leben. Wenn ELS, wie oben aufgeführt, im Säuglings- oder Kleinkindesalter erlebt wird, also zu einem Zeitpunkt, wo die HHN-Achse normalerweise hyposensitiv und hyporeaktiv ist, resultiert dies in einer Hyperaktivität und Hyperresponsivität der HHN-Achse im Erwachsenenalter. Wenn hingegen belastende Lebensereignisse in der Adoleszenz, also in einer Phase, wo die HHN-Achse normalerweise hypersensitiv und hyperreaktiv ist, erlebt werden, zeigt sich eine hypoaktive und hyporesponsive HHN-Achsen-Aktivität im Erwachsenenalter (Kuhlman et al., 2017). Während beispielsweise im Tiermodelle eine 24stündige MD vor Beginn der SHRP oder zu einem frühen Zeitpunkt innerhalb der SHRP zu gesteigerten stressinduzierten Plasma-ACTH-Spiegeln in den erwachsenen Nachkommen führt, führt MD während der zweiten Hälfte der SHRP zu einer reduzierten stressinduzierten ACTH-Antwort in erwachsenen Tieren (Smith et al., 1997; van Oers et al., 1997; van Oers et al., 1998b). Ferner spielt in der Beurteilung der Effekte von ELS auf die Regulation der HHN-Achse die Intensität des erlebten Stressors eine wichtige Rolle: während beispielsweise in Ratten, die starkem PS ausgesetzt waren, eine globale DNA-Hypomethylierung in Hippocampus und Frontalem Cortex gefunden werden konnte, zeigte sich eine DNA-Hypermethylierung im Hippocampus von Ratten, die einem milden PS-Paradigma ausgesetzt waren (Mychasiuk et al., 2011). Nach ESD, bei dem die Jungtiere sowohl vom Muttertier, als auch von ihren Geschwistern getrennt werden, was einen stärkeren Stressor als das klassische MS-Paradigma darstellt, zeigten die Jungtiere reduzierte stressinduzierte Corticosteronspiegel, wohingegen PS- und MS-Paradigmen ansonsten zu einer gesteigerten Responsivität der HHN-Achse führen (van Bodegom et al., 2017).

Des Weiteren gilt es bei der Interpretation der ELS-Effekte auch zu beachten, dass speziesspezifische Unterschiede existieren und beispielsweise Mäuse resistenter gegenüber den Auswirkungen von MS

sind als Ratten (Savignac et al., 2011).

Einen weiteren wichtigen Einflussfaktor in der Vermittlung der Wirkung von ELS auf die HHN-Achsen-Reaktivität stellt das Geschlecht dar, worauf in Kapitel 1.4 näher eingegangen wird.

1.2.4 Auswirkungen von „Early Life“-Stress auf Neurobiologie und Verhalten von Modellorganismen und Menschen

In der Literatur können verschiedene und teilweise widersprüchliche Effekte von ELS auf Verhalten gefunden werden.

In Hinblick auf Angstverhalten weisen die meisten Studien auf einen angstfördernden Effekt von ELS hin. Nach Exposition gegenüber einem chronischen ELS-Paradigma, in welchem durch beschränktes Nistmaterial Stress erzeugt wird, konnten u.a. verstärktes ängstliches Verhalten in OF und DLB (Wang et al., 2012) in männlichen Mäusen, sowie verstärktes ängstliches Verhalten im EPM in männlichen Ratten (Dalle Molle et al., 2012) gefunden werden. Neben gesteigerter Ängstlichkeit in ethologischen Verhaltenstests konnte in Ratten, die einem MS-Paradigma unterzogen wurden, ferner eine schnellere Generalisierung von furchtbezogenen Verhaltensantworten sowie eine größere Resistenz gegenüber deren Extinktion gezeigt werden (Elliott & Richardson, 2019). Interessanterweise zeigten sich für MD-Paradigmen, bei welchen eine einmalige 24-stündige Trennung von der Mutter durchgeführt wird, unterschiedliche Effekte auf Angstverhalten sowie andere emotionsbezogene Verhaltensweisen in Abhängigkeit von dem Zeitpunkt innerhalb der SHRP, zu dem die Trennung durchgeführt wurde (Girardi et al., 2014; Suchecki et al., 2000): MD zu frühen Zeitpunkten innerhalb der SHRP in Ratten scheint zu gesteigertem emotionalen Verhalten zu führen, während MD zu späteren Zeitpunkten innerhalb der SHRP Resilienz zu fördern scheint. Dies kann u.a. dadurch bedingt sein, dass sich für die Modulation von Angstverhalten wichtige Regionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung in unterschiedlichen Ausreifungsstadien befinden, und hierdurch unterschiedlich vulnerabel gegenüber frühem Stress sind, worauf an anderer Stelle noch näher eingegangen werden wird.

Die überwiegend angstfördernden Auswirkungen von ELS im Nagetiermodell spiegeln sich auch in Studien an Primaten wider, in denen infolge von ELS ebenfalls gesteigertes Angstverhalten, gestörte Verhaltensantworten auf bedrohliche Reize, sowie eine gesteigerte HHN-Achsen-Reaktivität (Kaffman & Meaney, 2007; Opendak et al., 2017) festgestellt werden konnten. Vereinzelt konnten, v.a. nach kurzen, intermittierenden Trennungsepisoden, auch positive Effekte von ELS auf Angstverhalten beobachtet werden. In Primaten beispielsweise zeigte sich die Regulation der physiologischen Erregbarkeit von Tieren, die kurzzeitig von der Mutter getrennt waren, verbessert, zudem zeigte sich

das Angstverhalten reduziert und Resilienz sowie Explorationsverhalten verstärkt (Lyons et al., 2010). Auch in Nagetieren konnten eigene Studien positive Effekte von ELS auf Angstverhalten, v.a. infolge kurzer Trennungsepisoden, zeigen (Levine, 1957).

Neben Angstverhalten beeinflusst ELS auch depressionsähnliches Verhalten. Nach ELS-Exposition konnten in Nagetieren anhedonisches Verhalten im Sucrosepräferenztest (Molet et al., 2016), gesteigerte Immobilität im „Forced swimming“-Test (Rots et al., 1996), sowie verringertes soziales Spiel mit Artgenossen (Molet et al., 2016) und gestörtes Sozialverhalten (Rainecki et al., 2010; Rainecki et al., 2012; Veenema et al., 2007; Lukas et al., 2011) beobachtet werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass ELS zu einer Veränderung der Prozessierung von belohnungsassoziierten Reizen führen kann. Die Exposition gegenüber ELS kann zu Defiziten in der Funktion des ventralen Striatums führen, was eine veränderte Responsivität gegenüber positiven Reizen, sowie eine Störung der Annäherungsmotivation bewirken kann (Novick et al., 2018).

Neben emotionalen Verhaltensweisen zeigten sich auch kognitive Leistungen durch ELS beeinflusst (Liu et al., 2000). Über verschiedene perinatale Stressparadigmen hinweg konnte ein gestörtes kontextbezogenes sowie räumliches Gedächtnis, bei gleichzeitig gesteigertem emotionalen Gedächtnis und erhöhtem Angstaussdruck, beobachtet werden (Tractenberg et al., 2016; Loi et al., 2017b), was von einer reduzierten hippocampalen Expression von GRs und MRs sowie erhöhten Corticosteronspiegeln begleitet war. Interessanterweise scheinen kurze Trennungen von der Mutter jedoch einen gegenteiligen Effekt zu haben: 10-minütige Trennungsperioden täglich zwischen PD 2-7 führten zu geringeren Corticosteronspiegeln in adulten Tieren im OF (Thoman & Levine, 1969) und positiven Effekten auf die kognitive Leistungsfähigkeit (Frankola et al., 2010; Plescia et al., 2014).

Darüber hinaus wird auch das mütterliche Verhalten der als Jungtiere von der Mutter getrennten weiblichen Nachkommen im Erwachsenenalter durch die Exposition gegenüber MS verändert: Tiere, die MS unterzogen wurden, lecken ihre eigenen Nachkommen weniger, was ein Kriterium für reduzierte mütterliche Zuwendung ist. Trennungen von wenigen Minuten im Rahmen des Handlings haben hingegen keine Auswirkungen auf das mütterliche Pflegeverhalten der Nachkommen im späteren Leben (Reshetnikov et al., 2018). Studien in Ratten zeigten, dass wenige Minuten dauernde Trennungen bei Nachkommen von wenig fürsorglichen Müttern sogar zu höherem Pflegeverhalten dieser Nachkommen gegenüber ihrem eigenen Nachwuchs führt, während sich kein Effekt auf Nachkommen von sehr umsorgenden Müttern zeigt (Francis et al., 1999). Hingegen zeigten sich für Ratten nach längeren Trennungsperioden insgesamt ebenfalls negative Auswirkungen auf das mütterliche Pflegeverhalten der Nachkommen gegenüber ihrem eigenen Nachwuchs (Lovic et al., 2001).

Mit den beschriebenen Auswirkungen von ELS auf das Verhalten einhergehend konnten Veränderungen in für die Emotionsregulation wichtigen Regionen, wie der Amygdala, dem Hippocampus oder dem PFC nachgewiesen werden.

Der Hippocampus ist eine wichtige Struktur für die Begrenzung der Stressantwort und aufgrund des lokal hohen Expressionsniveaus von GRs sehr empfindlich gegenüber den Effekten von Stress (de Kloet et al., 1990; Maras & Baram, 2012), v.a. während der ersten zwei postnatalen Wochen, in denen wichtige Reifungsschritte in dieser Struktur stattfinden. CRH, sowie die Aktivierung von CRHR1, spielen vermutlich eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Effekte von ELS auf den Hippocampus (Maras & Baram, 2012) und genetisch modifizierte Mäuse ohne CRHR1 zeigten sich resistent gegenüber den schädigenden Effekten von ELS (Wang et al., 2011). Darüber hinaus scheinen sich PS (Lemaire et al., 2000; Belnoue et al., 2013) und MS (Lajud et al., 2012) negativ auf die Neurogenese im Gyrus dentatus auszuwirken, wobei die Effekte von PS umso ausgeprägter waren, je später während der Schwangerschaft die Stressexposition erfolgte (Mandyam et al., 2008). Nagetiere wiesen nach chronischem ELS ein verringertes hippocampales Volumen sowie gelichtete dendritische Bäume in dieser Struktur auf (Brunson et al., 2005). Nach PS-Exposition konnten verringerte MR mRNA Level, sowie eine reduzierte Dichte und Bindung an MRs (Henry et al., 1994; Maccari et al., 1995; Koehl et al., 1999) sowie GRs (Henry et al., 1994; Koehl et al., 1999, Szuran et al., 2000; Mueller & Bale, 2008; Green et al., 2011) im Hippocampus festgestellt werden (Henry et al., 1994; Maccari et al., 1995; Koehl et al., 1999). Auch in Tieren, die frühen postnatalen Stressparadigmen unterzogen waren, zeigte sich in den meisten Studien eine Verringerung der hippocampalen GR-Expression (Aisa et al., 2007; Arnett et al., 2015). Die verringerte GR-Expression trägt zu einer weniger effektiven negativen Feedbackregulation der HNN-Achsen-Aktivität bei, wodurch die Stressantwort weniger wirksam begrenzt werden kann.

Der PFC ist eine wichtige Struktur für die Limitierung der Stressantwort sowie die Emotionsregulation (Arnsten, 2009) und sendet inhibitorische Projektionen in den Hypothalamus (Radley et al., 2006) sowie die Amygdala (Banks et al., 2007). Nach PS konnte eine Störung der präfrontalen LTP gefunden werden (Sowa et al., 2015), die vermutlich glucocorticoidvermittelt ist (Bartosz et al., 2011). Ähnlich wie im Hippocampus konnten auch im PFC gelichtete dendritische Bäume gefunden werden (Radley et al., 2008; Yang et al., 2015); diese Effekte sind vermutlich durch Glucocorticoide (Alfarez et al., 2009) sowie CRH (Ivy et al., 2010) vermittelt. ELS resultierte darüber hinaus in einer verminderten GR-Expression im PFC, was zu einer Beeinträchtigung der negativen Feedbackregulation des PFC auf die HNN-Achsen-Aktivität führt (Diorio et al., 1993). Diese reduzierte GR-Expression konnte sowohl nach PS (Green et al., 2011; Bingham et al., 2013) als auch nach postnatalen ELS-Paradigmen wie LN und MS (Avishai-Eliner et al., 2001; Ladd et al., 2004; Ladd et al., 2005) gefunden werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein Paradigma von unvorhersehbarem frühem Stress in männlichen Mäusen

neben gesteigertem Angstverhalten auch zu einer Hyperkonnektivität zwischen Amygdala und PFC sowie Hippocampus führt, wobei die Ausprägung des Angstverhaltens mit der Stärke dieser Konnektivität korreliert ist (Johnson et al., 2018). Langanhaltender Stress verringert die graue Masse und führt zu einer Unterfunktion des PFC (McEwen et al., 2016), sowie weiterer an der Regulation von Emotionen beteiligter Regionen wie des anterioren cingulären Cortex (ACC) und des insulären Cortex (Ansell et al., 2012), während andererseits eine zelluläre Hypertrophie und vermehrte dendritische Verzweigungen in der Amygdala gefunden werden konnten (Vyas et al., 2002).

Interessanterweise scheinen sowohl PS als auch die pränatale Applikation von Corticosteroiden die Entwicklung der Amygdala zeitweise zu verzögern (Kraszpulski et al., 2006; Zuloaga et al., 2011), wohingegen früher postnataler Stress die Ausreifung der Amygdala beschleunigt. Unter physiologischen Bedingungen wird die Amygdala in der ersten Lebenswoche noch nicht durch aversive Reize aktiviert und Jungtiere zeigen in diesem Zeitraum abgeschwächtes Furchtlernen, was vermutlich für die Ausbildung der Mutter-Kind-Bindung von Bedeutung ist (Sullivan et al., 2000; Sullivan & Holman, 2010). Früher postnataler Stress scheint zu einer verfrühten Ausreifung und Aktivierbarkeit der Amygdala zu führen, da Tiere, die dem LN-Paradigma unterworfen waren, bereits in der ersten Lebenswoche Lernverhalten auf aversive Reize sowie relevante Corticosteronstressantworten zeigten (Moriceau et al., 2006; Moriceau et al., 2009). Diese beschleunigte Entwicklung der Amygdala durch ELS scheint durch Corticosteroide vermittelt zu sein, da dieser Effekt durch Infusion von Corticosteroiden in die Amygdala simuliert (Moriceau et al., 2006) und durch Verabreichung von GR-Antagonisten verhindert werden kann (Moriceau et al., 2009). Ferner führt neonataler Stress zu einer verlängerter Retention von aversiven Erinnerungen (Callaghan & Richardson, 2012), sowie einem verfrühten Auftreten von adulten Formen von Extinktionslernen (Callaghan & Richardson, 2011; Cowan et al., 2013), was ebenfalls auf eine vorzeitige Reifung der Amygdalafunktion hinweist. In adulten Tieren, die ELS erfahren haben, ist die Amygdalaaktivität im Vergleich zu ungestressten Kontrolltieren gesteigert. Auf einen konditionierten Furchtreiz hin zeigten Tiere, die einem PS-Paradigma unterzogen waren, eine stärkere Aktivierung der Amygdala, gemessen am regionalen zerebralen Blutfluss (Laviola et al., 2004), sowie gesteigerte angstbezogene Verhaltensweisen, wie z.B. Freezing (Sadler et al., 2011) im Vergleich zu Tieren, die keinem ELS-Paradigma ausgesetzt waren. Darüber hinaus konnte in Tieren, die PS erfahren hatten, auch eine „Fear conditioning“-unabhängige erhöhte Aktivität der Amygdala, einhergehend mit gesteigertem Angstverhalten, beobachtet werden (Sadler et al., 2011).

Die Tatsache, dass sich in verschiedenen Studien, bei denen die Stressexposition zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb der Entwicklung erfolgte, teilweise sehr unterschiedliche Ergebnisse zeigen, kann dadurch erklärt werden, dass sich die für die Modulation von Angstverhalten wichtigen Regionen

zum Zeitpunkt der Stressexposition in der Entwicklung in unterschiedlichen Ausreifungsstadien befinden, und somit zu einem bestimmten Zeitpunkt mehr oder weniger vulnerabel gegenüber den Auswirkungen von Stress sind. So konnte gezeigt werden, dass MS zwischen P2-20 v.a. die Entwicklung des Hippocampus beeinträchtigt (Andersen & Teicher, 2004), wohingegen Stress zwischen P30-35 den PFC beeinflusst (Leussis et al., 2008).

Auch in humanen Studien zeigten sich relevante Auswirkungen von ELS auf das Verhalten sowie die Neurobiologie von Individuen.

Für körperlichen, emotionalen oder sexuellen Missbrauch sowie frühe Vernachlässigungserfahrungen konnten eine gesteigerte physiologische Erregbarkeit (Jovanovic et al., 2009), eine verstärkte Prozessierung negativer Informationen (Pollak & Sinha, 2002; Pollak & Tolley-Schell, 2003), sowie eine Verminderung der kognitiven Leistungsfähigkeit im Sinne eines eingeschränkten Arbeitsgedächtnisses und einer reduzierten Aufmerksamkeitsspanne (Geoffroy et al., 2016; Masson et al., 2015) gefunden werden. Diese Veränderungen machen das Individuum empfindlicher gegenüber den negativen Effekten von Stress und können die Entstehung psychischer Erkrankungen wie Depression, Suchterkrankungen oder PTBS fördern (Fergusson et al., 1996; Chapman et al., 2004; Faravelli et al., 2012). Kinder, die in Waisenhäusern aufgewachsen sind, was eine schwere Form der frühen Deprivation darstellt, wiesen im Erwachsenenalter ein reduziertes Volumen des Cortex, v.a. des PFC, sowie des Hippocampus auf, wobei die Reduktion des Hippocampusvolumens mit der Dauer der Stressexposition korrelierte (Hodel et al., 2015). Ferner können Menschen, die in der Kindheit chronischem Stress ausgesetzt waren, bereits ab dem mittleren Lebensalter kognitive Einschränkungen zeigen, welche einen Risikofaktor für die vorzeitige Entwicklung von Demenzerkrankungen darstellen (Kaplan et al., 2001). Neben den beschriebenen Veränderungen des Hippocampus konnte bei Personen, die Opfer von Kindesmisshandlung waren, eine gesteigerte Aktivierung der Amygdala auf bedrohliche Reize beobachtet werden (Tottenham et al., 2011). Eine mangelnde top-down Kontrolle des PFC auf die Amygdalaaktivität trägt hierbei zu einer verringerten Emotionsregulationsfähigkeit bei (Marusak et al., 2015). Im Sinne des Konzepts einer Gen-Umwelt-Interaktion konnten Studien darüber hinaus moderierende Effekte von FKBP5 (White et al., 2012; Holz et al., 2015) und MR Genotypen (Bogdan et al., 2012) auf Amygdalavolumen, Amygdalareaktivität und Amygdalakonnektivität in adulten Individuen, die ELS erfahren hatten, zeigen.

Des Weiteren konnte in humanen Studien gezeigt werden, dass Jugendliche, die in der Kindheit emotionale Vernachlässigung erfuhren, eine verminderte Aktivität des ventralen Striatums auf positive Reize zeigen, was einen Prädiktor für depressive Symptome im Erwachsenenalter darstellt (Hanson et al., 2016). Neben den Auswirkungen auf psychische Erkrankungen gibt es Hinweise, dass ELS auch als prädisponierender Risikofaktor für chronische Schmerzsyndrome fungieren kann (Davis et al., 2005) und zu einer gestörten Regulation des Immunsystems sowie der Entzündungsantwort führen kann

(Wieck et al., 2013).

Analog zu den Ergebnissen am Tiermodell zeigt sich das neuroendokrine System bei Erwachsenen mit aversiven Kindheitserfahrungen verändert, was in einer gesteigerten Aktivität der Stressachse resultiert (Danese & McEwen, 2012). Kinder von Müttern, die postnatal depressiv waren, zeigten eine erhöhte Reaktivität der HNN-Achse, sowie einen verstärkten Ausdruck negativer Emotionen und weniger reife Autoregulationsstrategien bei Konfrontation mit furchteinflößenden Reizen (Feldman et al., 2009).

Der Zeitpunkt in der Entwicklung, zu dem ein Stressor erlebt wird, und das Reifestadium, in dem sich die Gehirnregionen des Angstschaltkreises zu diesem Zeitpunkt befinden, spielen eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Effekte von ELS. Beim Menschen reift der Hippocampus etwa bis zum Alter von 2 Jahren aus, während die Reifung des PFC v.a. im Alter von 8-14 Jahren stattfindet und die Amygdala bis zum Ende der 3. Lebensdekade ausreift (Giedd et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass wiederholter sexueller Missbrauch während der frühen Kindheit zu einem reduzierten hippocampalen Volumen führt, wohingegen wiederholter sexueller Missbrauch im Jugendalter zu einem reduzierten Volumen des PFC führt (Andersen et al., 2008). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Effekte von frühkindlichem Stress v.a. über eine Schädigung des in dieser Phase besonders vulnerablen Hippocampus vermittelt werden. Auch die eventuell nachfolgende Entwicklung einer psychischen Erkrankung ist von dem Entwicklungsstadium, in dem die aversiven Erlebnisse stattfanden, abhängig. Während Frauen, die ein Kindheitstrauma vor dem 12. Lebensjahr erlebten, ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Depressionen aufweisen, erkrankten Frauen, die ein Traumatisierungsereignis zwischen dem 12.-18. Lebensjahr erlitten, häufiger an PTBS (Maercker et al., 2004).

Auch pränataler Stress, der auf das Ungeborene in utero einwirkt, stellt einen Risikofaktor für stimmungs- und verhaltensassoziierte Probleme im späteren Leben dar und konnte mit einem gesteigerten Auftreten von Angst, Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) und ungünstigen Problemlösestrategien assoziiert werden (Davis & Sandman, 2012; Van den Bergh & Marcoen, 2004).

Obwohl die meisten Studien vor allem negative Auswirkungen von ELS, welche Ausdruck einer erhöhten Responsivität gegenüber Umweltreizen sind, hervorheben, ist an dieser Stelle darauf hinzuweisen, dass eine erhöhte Sensitivität gegenüber Reizen aus der Umwelt kontextabhängig sowohl adaptiv als auch maladaptiv sein kann. Eine erhöhte Aufmerksamkeit gegenüber bedrohlichen Reizen kann in unsicheren Umgebungen sinnvoll und nützlich für den Organismus sein, um das Überleben zu sichern und entfaltet erst bei Generalisierung auf nicht-bedrohliche Situationen eine maladaptive Wirkung. So konnten Studien zeigen, dass Stress in frühen Entwicklungsphasen im Sinne unzureichender mütterlicher Fürsorge einerseits zu einer Störung des räumlichen Gedächtnisses (Liu et

al., 2000) und einer Beeinträchtigung des Langzeitgedächtnisses für neutrale Inhalte (Bredy et al., 2003) führt, andererseits aber die Gedächtnisbildung für aversive Inhalte, die z.B. im Rahmen der kontextabhängigen Furchtkonditionierung erfolgt, gesteigert ist (Champagne et al., 2008; Bagot et al., 2009). Daneben zeigte sich nach MS-Exposition eine verbesserte Fähigkeit zum Kontextlernen in einer Umgebung, die ein hohes Stressniveau hervorruft (Oomen et al., 2010). Die Exposition gegenüber mildem ELS scheint Tiere resilienter gegenüber akutem Stress zu machen, was sich in einer abgeschwächten Corticosteronausschüttung widerspiegelt (Kiank et al., 2009). Darüber hinaus scheint ELS den Organismus neben den oben beschriebenen positiven Auswirkungen auf Coping bei akutem Stress, zu einem gewissen Grad auch gegen die schädigenden Einflüsse von langandauernder Stressexposition im Erwachsenenalter zu schützen. Tiere, die ELS durch das LN-Paradigma erfahren haben, zeigten sich, wenn sie isoliert von Artgenossen aufwuchsen, weniger ängstlich und depressiv als Kontrolltiere, die keinem frühen Stressparadigma ausgesetzt waren (Santarelli et al., 2014). Es scheint also, dass Individuen, die frühen Stress erfahren haben, im Sinne der Match-Mismatch-Hypothese, besser angepasst an und hierdurch resistenter gegenüber stressvollen Lebensbedingungen im Erwachsenenalter sein können. Interessanterweise konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die MS-Exposition zwar zu deutlich erhöhten Corticosteronstressantworten im Erwachsenenalter führt (Ladd et al., 2004; Ladd et al., 2005; Plotsky et al., 2005), die zusätzliche Exposition gegenüber chronischen Stress im Erwachsenenalter die erhöhte Corticosteronantwort hingegen auf ein Niveau, das dem ungestresster Kontrolltiere entspricht (Ladd et al., 2005), oder sogar auf niedrigere Werte (Renard et al., 2007), absenken kann. Im Zusammenhang hiermit konnte eine Hochregulation von GRs im Hippocampus sowie eine Normalisierung der GR-Expression im PVN gezeigt werden (Renard et al., 2010). Auch im frontalen Cortex zeigen sich ein gesteigertes GR mRNA-Expressionsniveau in MS-Tieren, die zusätzlich chronischem Stress im Erwachsenenalter ausgesetzt waren, wodurch sich das GR-Expressionsmuster dem von ungestressten Kontrolltieren angleicht (Ladd et al., 2005). Diese Daten weisen darauf hin, dass chronischer Stress im Erwachsenenalter die durch MS verursachten Funktionsdefizite von PFC und Hippocampus normalisieren könnte, wodurch diese Strukturen wieder befähigt sein könnten, die Aktivität der HHN-Achse suffizient zu begrenzen. Allerdings kann zu intensive oder zu häufige Stressexposition im Erwachsenenalter auch gegenteilige Effekte ausüben. Dies beschreibt die „3-Hit-Hypothese“, die postuliert, dass während des späteren Lebens auftretende Stressoren die schädlichen Effekte von ELS weiter verstärken können, vor allem, wenn Organismen eine prädisponierende genetische Vulnerabilität aufweisen (Daskalakis et al., 2013). So konnte gezeigt werden, dass eine Kombination aus MS und chronischem Stress zu einem späteren Zeitpunkt im Leben stärkere negative Auswirkungen auf Lernen und Gedächtnis hat, als jedes dieser Stressparadigmen einzeln (Choy et al., 2008; Llorente et al., 2011). Ferner zeigten Tiere, die MS erlebt hatten und im Erwachsenenalter zusätzlich einem Beengungsstressparadigma ausgesetzt waren, erhöhte

Corticosteronstressantworten und stärkeres depressionsähnliches Verhalten als Tiere, die keine MS erfahren hatten (Uchida et al., 2010). Passend hierzu konnte ein reduziertes GR-Expressionsniveau im Hippocampus von Tieren, die MS ausgesetzt waren, gefunden werden, welches weiter verringert war, wenn die Tiere zusätzlich gegenüber chronischem Stress im Erwachsenenalter exponiert waren (Aisa et al., 2008).

Bemerkenswerterweise sind die negativen Effekte von ELS durch die Schaffung einer besonders günstigen Umwelt innerhalb der ersten 2-3 Lebensjahre eines Menschen reversibel, während Interventionen danach deutlich weniger effektiv sind, was auf eine sensible Periode für die Wirkung von ELS hinweist (Hostinar & Gunnar, 2013; Nelson et al., 2007).

1.3 Das serotonerge System

1.3.1 Serotonin – ein wichtiger Neurotransmitter mit zahlreichen Funktionen

5-HT ist ein bedeutsamer Neurotransmitter, dem viele wichtige Funktionen sowohl im zentralen Nervensystem als auch in der Peripherie zukommen. 5-HT wird durch die zwei Isoformen des Enzyms Tryptophanhydroxylase (Tph) produziert, wobei sich Tph1 in der Peripherie und Tph2 im ZNS befindet (Walther et al., 2003a). Etwa 95% des Gesamt 5-HT wird peripher und nur etwa 5% zentral produziert (Gershon & Tack, 2007). Peripheres 5-HT kann aufgrund der Blut-Hirn-Schranke nicht in das ZNS gelangen (Young, 2007).

Im adulten Mäusegehirn gibt es etwa 25.000 serotonerge Neurone (Ishimura et al., 1988), die das Enzym Tph2 exprimieren, vorwiegend in den medianen (MnR) und dorsalen (DR) Raphekernen des Hirnstamms lokalisiert sind (Dahlstroem & Fuxe, 1964) und topographisch größtenteils nach ihren Innervationsgebieten organisiert sind (Imai et al., 1986). Im menschlichen Gehirn enthält die DR etwa 165.000 Neurone und der MnR etwa 64.000 Neurone (Hornung, 2003). Die Neurone der DR projizieren vorwiegend in den PFC, das laterale Septum und die Amygdala, während die serotonergen Neurone des MnR v.a. das mediale Septum, den cingulären Cortex und den dorsalen Hippocampus innervieren (Molliver, 1987). Die serotonergen Afferenzen aus der DR sind dünn, zeigen pleomorphe Varikositäten und sind stark immunoreaktiv für 5-HTT (Brown & Molliver, 2000; Kosofsky & Molliver, 1987), wohingegen die serotonergen Fasern aus dem MnR dicker und mit großen, oft sphärischen Varikositäten besetzt sind und kein 5-HTT exprimieren (Brown & Molliver, 2000; Kosofsky & Molliver, 1987; Vertes et al., 1999). 5-HT kann seine Wirkung auf zwei unterschiedlichen Wegen entfalten: zum einen parakrin über Volumentransmission, zum anderen über synaptische Transmission. Diesen zwei

verschiedenen Ausschüttungsmodi könnten unterschiedliche, sich ergänzende Wirkungen zukommen, wobei synaptische Transmission v.a. kurzfristige Effekte vermitteln könnte und Volumentransmission langfristig zelluläre Netzwerke beeinflussen könnte (Fuxe et al., 2007).

Der erste Nachweis von 5-HT kann ab E10.5 der Embryonalperiode in Mäusen erbracht werden (Hawthorne et al., 2010). Es gibt Hinweise, dass im Zeitraum der 2.-3. postnatalen Woche tiefgreifende Veränderungen in der neuronalen Organisation des serotonergen Systems stattfinden (Zhang, 2003), was diesen Zeitraum, welcher mit der SHRP überlappt, zu einer sensiblen und kritischen Periode in der Entwicklung des serotonergen Systems macht.

Zentrales 5-HT ist u.a. für die Regulation von Appetit, Sexualverhalten, Schmerz, Schlaf und Emotionen wie Angst oder Aggression wichtig (Jacobs & Azmitia, 1992; Lucki, 1998). Ferner kommt 5-HT eine organisierende Rolle in der Entwicklung des ZNS und bei der Vernetzung von Neuronen zu (Gaspar et al., 2003).

Neben dem zentralen 5-HT spielt das periphere 5-HT, das vorwiegend in enterochromaffinen Zellen des Darms durch Tph1 produziert wird, eine wichtige Rolle für viele physiologische Vorgänge. Geringere Mengen an 5-HT werden im Pankreas, den Brustdrüsen sowie im Fettgewebe produziert (Martin et al., 2017). Dem peripheren 5-HT kommen wichtige Funktionen u.a. für die Blutgerinnung (Walther et al., 2003b), die Regulation der Knochendichte (Yadav et al., 2009), die gastrointestinale Motilität (Keating & Spencer, 2010) sowie metabolische Funktionen zu (Crane et al., 2015; Sumara et al., 2012).

1.3.2 Das serotonerge System und psychische Erkrankungen

Eine Dysregulation des serotonergen Systems ist ein wichtiger Pathomechanismus bei einer Vielzahl von psychischen Erkrankungen, v.a. im Bereich der Angsterkrankungen und affektiven Erkrankungen (Durant et al., 2010; Aan het Rot et al., 2009). So zeigen beispielsweise Patienten mit Panikstörung einen 4-fach gesteigerten 5-HT-Umsatz im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (Esler et al., 2007), wobei der gesteigerte 5-HT-Umsatz positiv mit der Erkrankungsschwere korreliert ist. Durch eine Behandlung mit SSRIs kann dieser erhöhte 5-HT-Umsatz in Panikpatienten und depressiven Patienten gesenkt werden (Esler et al., 2007; Barton et al., 2008). Ferner konnte in Patienten mit Panikstörungen oder Depressionen eine verringerte Bindung von 5-HT_{1A}R in für die Regulation von Emotionen wichtigen Gehirnregionen gefunden werden (Neumeister et al., 2004; Drevets et al., 1999). Ein

funktioneller Polymorphismus dieses Rezeptors ist darüber hinaus mit Depression assoziiert (Lemondé et al., 2003).

Medikamente, die auf das serotonerge System wirken, wie beispielsweise SSRIs, werden vielfach in der Behandlung von Angsterkrankungen und affektiven Erkrankungen eingesetzt. Diese Substanzen zeigen oftmals zunächst anxiogene und erst im Verlauf anxiolytische Wirkungen, da für die Wirkung von SSRIs vermutlich eine Desensitivierung der 5-HT_{1A}R in der DR erforderlich ist, was die vielschichtige Wirkung von 5-HT in der Modulation von Emotionen, v.a. Angst, unterstreicht. Auch wenn SSRIs spezifischer wirken als die zuvor vielfach angewandten Trizyklischen Antidepressiva, so können auch diese Substanzen andere Neurotransmittersysteme beeinflussen (Bymaster et al., 2002). Ferner ist bekannt, dass beispielweise das SSRI Citalopram zu einem Anstieg des Cortisolspiegels führt (Attenburrow et al., 2001), was insofern relevant ist, da Cortisol u.a. Angstlernen erleichtern kann (Roosendaal et al., 2006), was erneut die Wichtigkeit der Interaktion zwischen der Stressachse und dem serotonergen System in der Regulation von Angstverhalten unterstreicht.

1.3.3 Die Beeinflussung von Angstverhalten durch Serotonin

5-HT kann je nach Zeitpunkt in der Entwicklung, zeitlichem Zusammenhang der serotonergen Aktivität mit dem angstausslösenden Reiz, Art des Angststimulus, gehirnspezifischer Region mit regionenspezifischem 5-HT_R-Expressionsprofil sowie Geschlecht unterschiedliche Effekte auf Angstverhalten ausüben, sodass weder eine pauschale anxiogene, noch eine allgemeine anxiolytische Funktion für diesen Neurotransmitter postuliert werden kann.

Zahlreiche Komponenten des Angst-Netzwerks werden von serotonergen Neuronen der Raphe innerviert, wobei die Wirkungen von 5-HT auf diese Regionen vielschichtig und abhängig von neuronalem Subtyp und Rezeptorverteilung sind. Die Amygdala wird serotonerg aus der DR innerviert (Vertes, 1991), wobei in Nagetieren der BL die dichteste Innervation, der La eine mittelstarke, und der Ce eine schwache serotonerge Innervation aufweisen. Im Gegensatz hierzu weist der Ce beim Primaten eine starke serotonerge Innervation auf (Bauman & Amaral, 2005). Im BL wirkt 5-HT primär inhibierend, indem GABAerge INs durch 5-HT aktiviert werden, welche wiederum die exzitatorischen PNs des BL inhibieren (Rainnie, 1999). Der Hippocampus erhält serotonerge Projektionen aus dem MnR (McQuade & Sharp, 1997), wo 5-HT inhibitorische INs aktiviert und gleichzeitig die Erregbarkeit exzitatorischer Pyramidenneurone verringert (Corradetti et al., 1992; Passani et al., 1994). Sowohl MnR als auch DR innervieren den PFC (Azmitia & Segal, 1978), wobei 5-HT über die aktivierende

Wirkung auf inhibitorische INs und die Dämpfung der Erregbarkeit exzitatorischer Pyramidenneurone dort insgesamt ebenfalls eine inhibierende Wirkung entfaltet (Zhong & Yan, 2011).

Ein Anstieg des extrazellulären 5-HT in BL und La bei Konfrontation mit Angsttests oder nach Applikation anxiogener Substanzen (Amat et al., 1998; Amat et al., 2004; Kawahara et al., 1993; Zanoveli et al., 2009), sowie eine gesteigerte Expression des frühzeitigen Genprodukts c-Fos in der DR nach Exposition gegenüber angstauslösenden Stimuli (Grahn et al., 1999; Takase et al., 2004) sind wichtige Hinweise für eine Beteiligung des serotonergen Systems bei der Regulation von Angstverhalten. Die serotonergen Neurone der DR weisen ein topographisches Organisationsmuster auf, wobei in die Vermittlung von konditionierter Furcht involvierte serotonerge Neurone über die gesamte DR, für konfliktbezogene Angst relevante serotonerge Neurone v.a. in der rostralen DR (Clark et al., 2002; Clark et al., 2004; McDevitt et al., 2011), und hilfloses Verhalten in unkontrollierbaren Stresssituationen vermittelnde serotonerge Neurone überwiegend in der kaudalen DR lokalisiert zu sein scheinen (Hammack et al., 2002). Nachdem in der Vergangenheit in Bezug auf Angstverhalten v.a. die DR im Fokus der Untersuchungen stand, gibt es auch Hinweise, dass der MnR eine Rolle in der Vermittlung von Angstverhalten zukommen könnte. Eine Läsion der MnR sowie eine neurotoxische Schädigung der serotonergen Neurone in der MnR reduziert Angstverhalten in konfliktbasierten Angsttests (Andrade et al., 1999; Andrade & Graeff, 2001), wohingegen die Stimulation der MnR zu angstbezogenen Verhaltensweisen und physiologischen Reaktionen wie Freezing oder Piloerektion führt (Graeff & Silveira Filho, 1978). Manipulationen der MnR zeigen hingegen keinen Einfluss auf Panikverhalten (Andrade et al., 2013), was darauf hinweist, dass serotonerge Neurone in der MnR ausschließlich Angstverhalten beeinflussen, während serotonerge Neurone der DR sowohl Angst-, als auch Panikverhalten modulieren (Graeff et al., 1996).

Die Auswirkungen von 5-HT auf Angstverhalten scheinen sich im Laufe der Entwicklung zu verändern. Studien an Tiermodellen konnten zeigen, dass die Behandlung mit SSRIs während der frühen Entwicklung angstartiges und depressionsähnliches Verhalten im Erwachsenenalter verstärken kann, was im Gegensatz zu der therapeutischen Wirkung von SSRIs bei Angsterkrankungen und Depressionen im Erwachsenenalter steht (Ansorge et al., 2008; Oberlander et al., 2009; Olivier et al., 2008) und nahe legt, dass 5-HT auf unreife neuronale Netzwerke anders als auf reife Netzwerke wirkt.

Die serotonerge Neurotransmission wird maßgeblich von 5-HTT reguliert, welcher 5-HT durch Aufnahme in Neurone aus dem synaptischen Spalt entfernt und somit die Dauer und das Ausmaß der serotonergen Neurotransmission begrenzt (Blakely et al., 1994). Im Menschen konnte ein Längenpolymorphismus in der Promotorregion des 5-HTT-Gens (i.e. 5-HTTLPR) identifiziert werden, wobei es eine lange (l) und eine kurze (s) Variante gibt. Die kurze Variante ist mit einer reduzierten Expression des 5-HTT (etwa 60-70% erniedrigte 5-HTT mRNA-Expressionslevel) assoziiert, was zu einer

verringerten 5-HT-Wiederaufnahme und somit zu höheren extrazellulären 5-HT-Spiegeln führt (Greenberg et al., 1999). Ein wesentlicher Fortschritt in der Identifikation der Rolle von 5-HT in der Prozessierung von Emotionen stellte die Erkenntnis dar, dass das kurze Allel mit einem höheren Risiko für Angst und Depression assoziiert ist (Lesch et al., 1996). Spätere Studien zeigten zudem ein höheres Risiko für PTBS (Lee et al., 2005) sowie gesteigertes Furchtlernen bei Trägern dieser Variante (Brocke et al., 2006). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die kurze Variante des 5-HTTLPR vor allem in Kombination mit negativen Umweltfaktoren zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko für affektive Störungen beiträgt, was auf eine Gen-Umwelt-Interaktion hinweist (Caspi et al., 2003; Uher & McGuffin, 2010). Der Effekt des 5-HTTLPR auf emotionales Verhalten basiert u.a. auf funktionellen Unterschieden in der Amygdalaaktivität: s-Allel Träger zeigen eine stärkere Amygdalaaktivierung in Reaktion auf ängstliche Gesichter (Hariri et al., 2002) und weisen zudem eine verringerte Konnektivität zwischen Amygdala und PFC auf (Pezawas et al., 2005), wodurch die Top-down-Kontrolle des PFCs auf die Amygdala weniger effektiv ist.

Insgesamt sind aktuell 14 verschiedene 5-HTR-Typen bekannt, die nach ihrem Signalmechanismus in die Familien 5-HT 1-7 eingeteilt werden (Barnes & Sharp, 1999; Hoyer & Martin, 1997). Die Existenz von 14 Rezeptorsubtypen unterstreicht die große funktionale Diversität des Neurotransmitters 5-HT, wobei diese Vielfalt durch Mechanismen wie alternatives Spleißen, RNA-Editing und Heterodimerisierung weiter vergrößert wird (Nichols & Nichols, 2008). Hierbei kann jeder Rezeptorsubtyp sowohl auf glutamatergen, als auch GABAergen Neuronen (McDonald & Mascagni, 2007), und mehr als ein Rezeptorsubtyp auf einem Neuron vorkommen. (Araneda & Andrade, 1991). Jedem Rezeptorsubtyp können darüber hinaus unterschiedliche Wirkungen auf Angstverhalten zugeschrieben werden, abhängig von der jeweiligen Zielregion im Gehirn und dem verwendeten Testparadigma (Handley & McBlane, 1993; Griebel, 1996).

Ein wichtiger Rezeptor in der Vermittlung der Effekte von 5-HT auf Angstverhalten ist der 5-HT_{1A}-Rezeptor (5-HT_{1A}R) (Akimova et al., 2009; Lesch & Gutknecht, 2004; Strobel et al., 2003). 5-HT_{1A}R ist ein inhibitorischer G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR), der seine Wirkung durch Kopplung an inhibitorische G_i/G_o Proteine entfaltet, was zur Inhibition des cAMP produzierenden Enzyms Adenylatcyclase sowie zur Schließung von Calciumkanälen und Öffnung von Kaliumkanälen führt (Barnes & Sharp, 1999). Im ZNS kommt 5-HT_{1A}R sowohl als inhibitorischer Autorezeptor auf serotonergen Neuronen, als auch als Heterorezeptor auf anderen Neuronenpopulationen vor (Barnes & Sharp, 1999). Die Aktivierung des auf Soma und Dendriten von serotonergen Neuronen in der Raphe lokalisierten 5-HT_{1A}-Autorezeptors führt zu einer Verringerung der Feuerrate dieser Neurone, wodurch die 5-HT-Ausschüttung in den jeweiligen Projektionsarealen durch negative Feedbackregulation abnimmt (Hjorth & Sharp, 1991; Meller et al., 1990). Man nimmt an, dass diese

durch 5-HT_{1A}R vermittelte negative Regulation auch für die verzögerte therapeutische Wirkung von SSRIs in der Behandlung von Angsterkrankungen und Depressionen verantwortlich ist (Gardier et al., 1996): der Anstieg des extrazellulären 5-HTs wird zunächst durch die Aktivität autoinhibitorischer 5-HT_{1A}Rs begrenzt, bis diese desensitivieren (Dawson & Nguyen, 2000).

Die Aktivität von 5-HT_{1A}R scheint in Abhängigkeit davon, ob Auto- oder Heterorezeptoren aktiviert werden, unterschiedliche Wirkungen auf Angstverhalten zu vermitteln. Mehrere Studien zeigten anxiolytische Effekte nach Injektion eines 5-HT_{1A}R Agonisten in MnR oder DR (Andrews et al., 1994; Hogg et al., 1994), während die Aktivierung postsynaptischer 5-HT_{1A}Rs im dorsalen Hippocampus Angstverhalten auslösen kann (Andrews et al., 1994; File et al., 1996). Darüber hinaus spielen 5-HT_{1A}-Heterorezeptoren im Vorderhirn eine Rolle in der Kontrolle von Angstverhalten (Goodfellow et al., 2009). Auch in der Entwicklung kommen 5-HT_{1A}-Heterorezeptoren möglicherweise eine zentrale Rolle in der Modulation von Angstverhalten zu: während der 2. und 3. Lebenswoche scheinen 5-HT_{1A}-Heterorezeptoren in Mäusen für die Ausformung von normalem Angstverhalten wichtig zu sein; Tiere, die während dieser Periode keine funktionalen 5-HT_{1A}Rs aufweisen (Gross et al., 2002) oder in denen die 5-HT_{1A}R Aktivität blockiert wird (Lo Iacono & Gross, 2008), weisen pathologisches Angstverhalten auf. Dieser Phänotyp konnte auch in Mäusen mit konstitutivem 5-HT_{1A}R-Knockout, jedoch nicht bei einem selektiv im Erwachsenenalter induziertem Knockout gefunden werden (Richardson-Jones et al., 2011). In humanen Studien gibt es zudem Hinweise, dass sich Polymorphismen des 5-HT_{1A}R-Promotors, die zu veränderter 5-HT_{1A}R-Expression führen, modulierend auf die Stressanfälligkeit auswirken (Albert & Lemonde, 2004).

Innerhalb der Amygdala als der zentralen Struktur in der Regulation von Angstverhalten zeigt 5-HT_{1A}R eine insgesamt eher geringe Expression in Nagetieren (Miquel et al., 1991), nicht-menschlichen Primaten (Law et al., 2009) und Menschen (Hall et al., 1997; Varnas et al., 2004).

Ein weiterer wichtiger Rezeptor in der Vermittlung der Effekte von 5-HT auf Angstverhalten ist der 5-HT_{2C}R, der v.a. im La, aber auch im BL stark exprimiert wird (Li et al., 2003; Rainnie, 1999, Greenwood et al., 2011). Die Infusion eines 5-HT_{2A/C}-Agonisten in den BL, sowie eine Überexpression des 5-HT_{2C}R im BL wirken in Nagetieren anxiogen (Gibson et al., 1994; Campbell & Merchant, 2003), wohingegen ein 5-HT_{2C}R Knockout anxiolytische Effekte bewirkt (Heisler et al., 2007). Marcinkiewicz et al. konnten zeigen, dass 5-HT aus der DR ferner über 5-HT_{2C}R eine Subpopulation von CRH-produzierenden Neuronen im BNST aktiviert, was über einen inhibitorischen Mikroschaltkreis zur Abdämpfung von anxiolytischen Projektionen des BNST zum ventralen tegmentalen Areal (VTA) sowie zum lateralen Hypothalamus (LH) führt (Marcinkiewicz et al., 2016). Auch im menschlichen Gehirn ist 5-HT_{2C}R in der Amygdala beschrieben (Pasqualetti et al., 1999).

5-HT₂ARs werden in Nagetieren u.a. im Hippocampus, medialem PFC (mPFC), La, Ce und BL exprimiert (Cornea-Hebert et al., 1999; Bombardi, 2011; Schiller et al., 2003) und spielen beim Erlernen von Furcht eine Rolle. Die i.p. Injektion eines 5-HT₂A-Agonisten erleichtert sowohl stimulusabhängige als auch kontextabhängige Furchtkonditionierung in Mäusen, was darauf hinweist, dass diesem Rezeptor eine wichtige Funktion in der Konsolidierung des Furchtgedächtnisses zukommen könnte (Zhang et al., 2013). Auch in der Amygdala von Primaten und Menschen finden sich 5-HT₂AR (Lopez-Gimenez et al., 2001; Guest et al., 2000).

Die verschiedenen Facetten der Wirkweise von 5-HT in der Modulation von Angst und Panik werden in der Deakin-Graeff-Hypothese dargelegt. Dieses bedeutsame Modell postuliert, dass verschiedene, topographisch organisierte Subpopulationen serotonerger Neurone in jeweils unterschiedliche Gehirnregionen projizieren und 5-HT dort spezifische, für die Pathophysiologie von Angstverhalten wichtige Funktionen vermittelt. Hierbei werden drei verschiedene Systeme unterschieden: 1) Ein panikinhibierendes System, ausgehend von serotonergen Neuronen in der DR, welches ins DPAG projiziert und dort panik- und fluchtassoziiertes Verhalten inhibiert. 2) Ein angstförderndes System mit Ursprung in der DR, welches in die Amygdala projiziert und Furchtkonditionierung sowie Angst in konfliktbezogenen Verhaltenskontexten begünstigt. 3) Ein antidepressiv wirkendes System, das im MnR lokalisiert ist und Stressresilienz sowie antidepressive Wirkungen vermittelt (Deakin & Graeff, 1991; Graeff et al., 1996). Das panikinhibierende System, das sich im ventrolateralen Teil der DR (DRVL) sowie im ventrolateralen PAG (VLPAG) befindet und zum DPAG projiziert, wird durch panikinduzierende Substanzen wie CO₂ und Natriumlactat aktiviert (Johnson et al., 2008; Johnson et al., 2005) und es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität dieses antipanischen System in Tiermodellen für Panikverhalten abgeschwächt ist (Johnson et al., 2004; Johnson et al., 2007). Das angstfördernde System ist in den dorsalen und kaudalen Anteilen der DR (DRD/DRC) lokalisiert und projiziert zum BL (Abrams et al., 2005). Dieses System wird durch anxiogene Pharmaka (Abrams et al., 2005), Neuropeptide (Staub et al., 2005; Staub et al., 2006) und angstausslösende Reize (Spannuth et al., 2011) aktiviert und durch unentrinnbare Schockapplikation in einem Modell für gelernte Hilflosigkeit sensitiviert (Rozeske et al., 2011). Das antidepressive System befindet sich im interfaszikulären Anteil der DR (DRI) und MnR und projiziert zum Hippocampus (Kohler & Steinbusch, 1982) und mPFC (Porrino & Goldman-Rakic, 1982). Die unterschiedlichen Systeme können auch miteinander interagieren: das angstfördernde System kann das panikinhibierende System über einen Ce → DRVL/VLPAG-Schaltkreis aktivieren, wodurch das Angst-Netzwerk die Aktivität des Panik-Netzwerks hemmen kann.

Ein Beispiel, das die Interaktionen zwischen 5-HT und der Stressachse im Kontext von Angstverhalten verdeutlicht, ist, dass in männlichen Ratten, die Beengungsstress ausgesetzt sind, ein Anstieg des

extrazellulären 5-HT festgestellt werden kann, welcher durch die Aktivität von CRH-Rezeptoren in der DR bedingt wird und angstfördernde Effekte vermittelt (Mo et al., 2008). Ferner führt die Infusion von CRH in die DR in Ratten zu einem Anstieg von 5-HT im Ce, sowie zu einer Verhaltensinhibition im Sinne von Freezing (Forster et al., 2006), was auf ein funktionelles Zusammenspiel von CRH-Erhöhung in der DR, 5-HT-Anstieg im Ce und angstbezogenem Verhalten hinweist.

1.3.4 Tiermodelle zur Untersuchung des Effekts von Serotonin auf Verhalten

1.3.4.1 5-HT_{1A}-Rezeptor

Wie im vorherigen Abschnitt ausgeführt, spielt der 5-HT_{1A}R eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Effekte von 5-HT auf Angstverhalten. Mäuse mit einem homozygoten oder heterozygoten 5-HT_{1A}R-Knockout zeigen ängstliches Verhalten in konfliktevozierenden Verhaltenstests wie dem EPM oder dem OF (Heisler et al., 1998), jedoch kein depressionsähnliches Verhalten in entsprechenden Verhaltenstests, bei gleichzeitig normalen 5-HT-Spiegeln (Ramboz et al., 1998). Hierbei muss zwischen Effekten auf 5-HT_{1A}-Auto- und Heterorezeptoren unterschieden werden. Während 5-HT_{1A}-Autorezeptoren v.a. für die regelrechte Ausbildung von Angstverhalten wichtig zu sein scheinen, wobei der Verlust von 5-HT_{1A}R durch verstärkte 5-HT-Ausschüttung aufgrund fehlender Autoinhibition der Raphekerne Angstverhalten begünstigt, scheinen 5-HT_{1A}-Heterorezeptoren eher in die Modulation von depressionsähnlichem Verhalten involviert zu sein (Richardson-Jones et al., 2011). Mäuse mit einer 5-HT_{1A}R-Überexpression weisen hingegen eine Reduktion ängstlicher Verhaltensweisen sowie erhöhte 5-HT-Spiegel in den an der Emotionsregulation beteiligten Regionen Hippocampus und Striatum auf (Kusserow et al., 2004).

1.3.4.2 Serotonin-Transporter

5-HTT Knockout Mäuse zeigen aufgrund des Fehlens von 5-HTT eine reduzierte Aufnahme von 5-HT aus dem synaptischen Spalt, was zu erhöhten extrazellulären 5-HT-Spiegeln im Gehirn führt (Greenberg et al., 1999). Besonders interessant sind hierbei die 5-HTT +/- Mäuse, die eine etwa 40-50% reduzierte 5-HTT Expression aufweisen (Homborg et al., 2007). Dies entspricht in etwa dem 5-HTT Expressionsniveau in s-Allel Carriern des 5-HTTLPR, weshalb 5-HTT +/- Mäuse ein gutes translationales Modell für diese genetische Variante darstellen (Bengel et al., 1998). Ähnlich wie s-Allel Träger des 5-HTTLPR unterscheiden sich 5-HTT +/- Mäuse in ihren basalen 5-HT-Spiegeln nicht von wildtypischen Tieren (Bengel et al., 1998), jedoch konnte ein im Vergleich zu wildtypischen Tieren verringerter 5-HT-

Umsatz im frontalen Cortex, Hippocampus und Striatum von 5-HTT +/- Mäusen gefunden werden (Carola et al., 2008; Bartolomucci et al., 2010). Bei Stressexposition zeigt sich in 5-HTT +/- Mäusen eine weitere Reduktion des 5-HT-Umsatzes im frontalen Cortex, welcher in wildtypischen Tieren nicht beobachtet werden kann (Bartolomucci et al., 2010). In Verhaltensversuchen konnte bei Mäusen dieses Genotyps eine verschlechterte Furchtextinktion festgestellt werden (Wellman et al., 2007). Darüber hinaus zeigten 5-HTT-defiziente Mäuse und Ratten, die frühem Stress ausgesetzt waren, ein erhöhtes Risiko einerseits angst- oder depressionsähnliches Verhalten zu entwickeln, andererseits wiesen diese Mäuse interessanterweise besseres Copingverhalten im Vergleich zu wildtypischen Tieren auf (Carola et al., 2008; van den Hove et al., 2011; van der Doelen et al., 2013). Ähnlich Trägern des kurzen Allels des 5-HTTLPR, die nicht nur empfindlicher gegenüber negativen, sondern auch empfänglicher gegenüber positiven Reizen zu sein scheinen (Schoebi et al., 2012; Fox et al., 2011), zeigten sich 5-HTT-defiziente Mäuse im Vergleich zu wildtypischen Tieren nicht nur vulnerabler gegenüber negativen, sondern auch stärker beeinflussbar durch positive Erfahrungen. So wiesen 5-HTT +/- Mäuse, die mit einer weiblichen Artgenossin zusammenleben durften, verringertes Angstverhalten im OF-Test auf, während sich dieser anxiolytische Effekt in wildtypischen Mäusen nicht zeigte (Kästner et al., 2015).

Mäuse mit konstitutiver 5-HTT-Überexpression zeigen im Gegensatz hierzu verringerte 5-HT-Spiegel, beeinträchtigt Furchtlernen und einen im Vergleich zu wildtypischen Tieren weniger ängstlichen Phänotypen (Jennings et al., 2006).

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse aus Studien mit 5-HTT Mäusen auf eine positive Korrelation zwischen 5-HT und Furcht/Angst hin. Hierbei gilt jedoch zu beachten, dass, wie stets bei konstitutiven genetischen Manipulationen, adaptive Mechanismen die Effekte beeinflussen und u.U. begrenzen können. So konnten sowohl für Mäuse mit 5-HTT Knockout als auch mit 5-HTT Überexpression Veränderungen in der 5-HT1AR- und 5-HT2AR-Expression nachgewiesen werden (Holmes et al., 2003; Li et al., 2003; Jennings et al., 2008). Beispielsweise konnte in 5-HTT-defizienten Mäusen eine reduzierte 5-HT1AR- und 5-HT2CR-Bindung in der Amygdala gefunden werden, die in Weibchen stärker ausgeprägt war als in Männchen (Li et al., 2003).

1.3.4.3 Tryptophanhydroxylase 2

Tph2-defiziente Mäuse, wie sie in dieser Studie verwendet wurden, zeichnen sich durch einen Knockout des Enzyms TPH2, das vorwiegend in den Raphekernen produziert wird, aus, was in einer 5-HT Defizienz im Gehirn resultiert. Das Enzym TPH2 katalysiert den Schritt der Hydroxylierung von Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan, welches den limitierenden Schritt in der Synthese von 5-HT darstellt (Walther et al., 2003a). 5-Hydroxytryptophan wird dann von dem ubiquitär exprimierten

Enzym Aminosäuredecarboxylase (AACD) zu 5-Hydroxytryptamin, also 5-HT, umgewandelt. Der Tph2-Knockout führt zu einer Reduktion des 5-HT Gehalts um über 95% im Vergleich zu wildtypischen Tieren, sowie einer noch stärkeren Verminderung des 5-HT-Metaboliten 5-Hydroxyindolylelessigsäure (5-HIAA) (Gutknecht et al., 2012). Die serotonergen Neurone werden trotz des Tph2 Knockouts ausgebildet und weisen eine unauffällige Morphologie (Gutknecht et al., 2008), eine normale Expression serotonerger Marker wie 5-HTT und die typischen elektrophysiologischen Eigenschaften serotonerger Neurone auf (Gutknecht et al., 2012).

5-HT-defiziente Mäuse zeigen in der Verhaltenstestung einige auffällige Verhaltensweisen. So konnten Studien aus unserer Gruppe in männlichen Tph2 $-/-$ Mäusen verstärkte Aggressivität und Impulsivität (Gutknecht et al., 2015), sowie verringertes prosoziales Verhalten und vermehrte Regelverstöße in einem Resident-Intruder-Test zeigen (Weidner et al., 2019). Vorhergehende Arbeiten unserer Gruppe zeigten in ethologischen Angsttests diskret reduziertes Angstverhalten in Tph2 $-/-$ Mäusen (Gutknecht et al., 2015), eine neuere Studie aus unserer Gruppe konnte darüber hinaus ein verringertes Vermeidungsverhalten der offenen Arme des EPM in männlichen Tph2 $-/-$ Tieren finden, wobei sich dieser Effekt durch MS-Exposition verstärkt zeigte (Weidner et al., 2019). Darüber hinaus zeigten Tph2 $-/-$ Mäuse einen gesteigerten Furchterwerb im Rahmen von Furchtkonditionierungsparadigmen sowie ein gesteigertes Furchtgedächtnis, was wiederum durch die Exposition gegenüber chronischem Stress weiter verstärkt werden konnte und darauf hinweisen könnte, dass 5-HT für das Verhindern eines übersteigerten Erwerbs von Furchtgedächtnisinhalten wichtig sein könnte (Gutknecht et al., 2015). Des Weiteren konnte in Tph2 $-/-$ Mäusen gesteigertes depressionsähnliches Verhalten, bewertet durch eine schnellere Latenz bis zur Resignation im „Tail suspension“-Test und „Forced swim“-Test, gefunden werden. Interessanterweise konnte dieser depressionsfördernde Effekt durch ein chronisches Stressparadigma in Tph2 $-/-$ Mäusen normalisiert werden (Lesch et al., 2012).

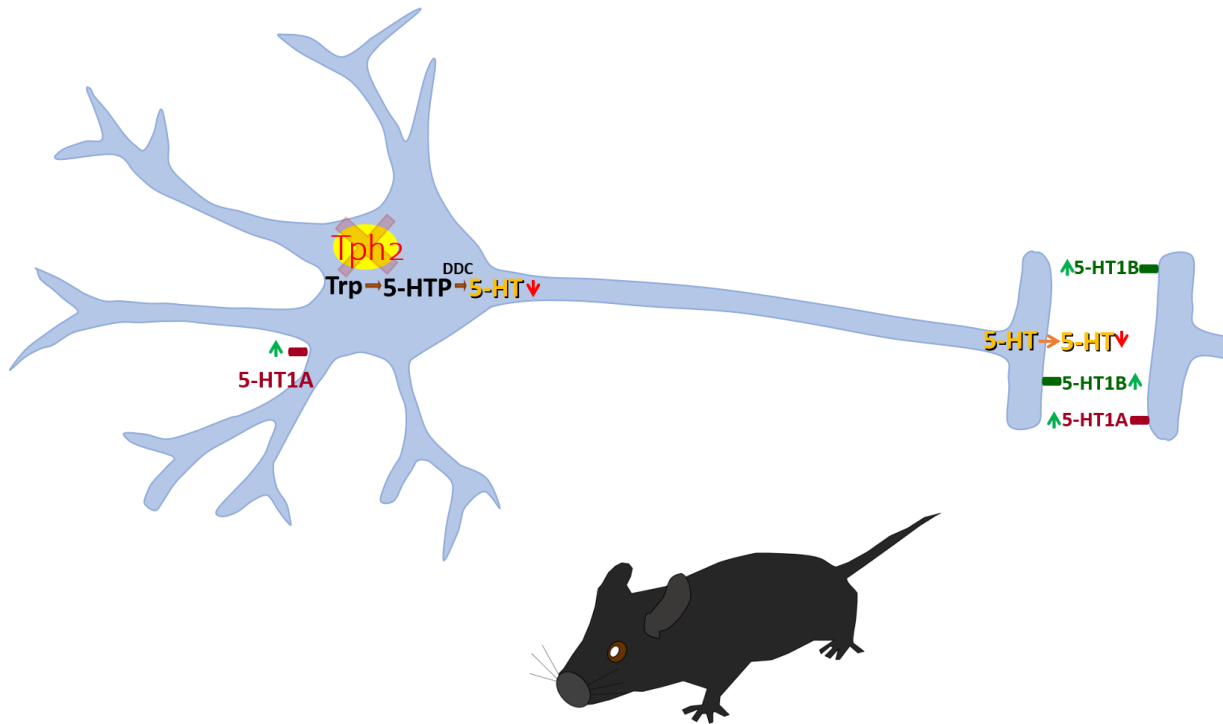


Abb. 6: **Modell der Tph2-Defizienz**

Tph2 = Tryptophanhydroxylase 2, Trp = Tryptophan, 5-HTP = 5-Hydroxytryptophan, DDC = DOPA-Decarboxylase, 5-HT = Serotonin. Grüner Pfeil = Gesteigerte Synthese, roter Pfeil = verringerte Synthese

Neben den Unterschieden im Verhalten konnten einige Besonderheiten in der Neurobiologie von Tph2-defizienten Tieren festgestellt werden. In Tph2^{-/-} Mäusen konnte eine Reduktion GABAerger Neurone in BL und La im Vergleich zu wildtypischen Tieren festgestellt werden, während die Anzahl GABAerger Neurone in der Amygdala von Tph2^{+/-} Mäuse vermehrt war (Waider et al., 2012). Darüber hinaus konnte eine Hochregulation von 5-HT1AR und 5-HT2AR, v.a. im frontalen Cortex und Septum, festgestellt werden (Lesch et al., 2012). Diese Anpassung könnte zum einen durch direkte zelluläre Mechanismen vermittelt sein, über die durch eine vermehrte Genexpression von 5-HT1AR und 5-HT2AR die verringerte Verfügbarkeit von 5-HT als Liganden kompensieren werden soll. Zum anderen ist bekannt, dass stressbedingt erhöhte Corticosteronspiegel über eine transkriptionelle Repression des 5-HT1AR-Promotors zu einer Herunterregulation der 5-HT1AR-Expression führen (Farisse et al., 2000; Fernandes et al., 1997). Dieser Mechanismus könnte die in Tph2^{-/-} Mäusen gefundenen erniedrigten Corticosteronspiegel und die erhöhte 5-HT1AR-Expression miteinander in Beziehung setzen. Neben einer Hochregulation des 5-HT1AR zeigt sich in homozygot Tph2-defizienten Mäusen auch eine vermehrte Expression des 5-HT1BR (Gutknecht et al., 2012). Dieser Rezeptorsubtyp ist an der Regulation von emotionalem Verhalten beteiligt, wobei ein Knockout des 5-HT1BR in männlichen Tieren zu gesteigerter Aggressivität (Bouwnecht et al., 2001) und reduziertem Angst- sowie

depressionsähnlichem Verhalten (Nautiyal et al., 2016). Interessanterweise wirkt sich die 5-HT-Defizienz auch auf andere Neurotransmittersysteme aus. Neben reduzierten NA-Spiegeln konnte auch eine reduzierte Anzahl noradrenerger Neurone im LC von 5-HT defizienten Mäusen festgestellt werden (Gutknecht et al., 2012). Dies könnte vor dem Hintergrund einer dichten serotonergen Innervation des LC auf einen trophischen Effekt von 5-HT für Entwicklung und/oder Überleben noradrenerger Neurone hinweisen.

1.3.5 Die Rolle des serotonergen Systems in der Vermittlung der Effekte von „Early Life“-Stress

Verschiedene Studien in unterschiedlichen Spezies fanden, dass die gegenseitige Beeinflussung von serotonerger System und Stressexposition einen wichtigen Mechanismus in der Vermittlung der Effekte von ELS darstellt (Booij et al., 2015). Einerseits konnte gezeigt werden, dass Veränderungen des serotonergen Systems die Auswirkungen von ELS auf Verhalten modifizieren können (van den Hove et al., 2011; Sachs et al., 2015; Wong et al., 2015). Auf der anderen Seite sind frühe aversive Lebensereignisse in der Lage, die Expression wichtiger Komponenten des serotonergen Systems wie TPH2 oder 5-HTT, zu verändern (Gardner et al., 2009a; Gardner et al., 2009b; Hiroi et al., 2016; Holloway et al., 2013; Wong et al., 2015).

Die serotonergen Neurone in der DR stellen aufgrund der starken Interaktion des serotonergen Systems mit der HPA-Achse einen wichtigen modulatorischen Knotenpunkt in der Vermittlung der Effekte von frühem Entwicklungsstress dar (Lowry et al., 2008). Diese stressbezogenen Aktivitätsveränderungen in der DR sind u.a. durch CRH bedingt (Gray, 1993; Fox & Lowry, 2013). Vereinfachend kann man sagen, dass die Aktivierung von CRHR1 in der DR zu einer Verringerung und die Aktivierung von CRHR2 zu einem Anstieg der 5-HT Ausschüttung führt (Kirby et al., 2000), wobei die Wirkung einer CRHR1-Aktivierung v.a. über GABAerge, und die Wirkung einer CRHR2 Stimulation vorwiegend über serotonerge Neurone vermittelt werden. Insgesamt scheinen, im Gegensatz zu den meisten anderen Gehirnregionen, wo CRHR1 eine wichtigere Rolle in der Vermittlung von Angstverhalten zukommt (Heinrichs et al., 1997; Gehlert et al., 2005), die stressmodulierenden Wirkungen von CRH in der DR v.a. über CRHR2 reguliert zu sein (Lukkes et al., 2008; Wood et al., 2013). In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass eine inhibitorische Blockade von CRHR2 in der DR furcht- bzw. angstartiges Verhalten reduziert (Takahashi et al., 2001; Hammack et al., 2003; Vuong et al., 2010), was darauf hinweist, dass CRHR2 in der DR eine wichtige Rolle in der Aktivierung des serotonergen Systems zukommt, welche v.a. in stressauslösenden Situationen relevant ist. Prolongierte MS kann die Anzahl serotonerger Neurone sowie die 5-HT Synthesekapazitäten in der

ventrolateralen DR von erwachsenen Ratten steigern (Gardner et al., 2009a), ferner konnte eine verstärkte CRH mRNA-Expression in der DR nach MS gefunden werden (Bravo et al., 2011). Darüber hinaus konnten eine verstärkte Expression von 5-HT_{1A}R im Hippocampus von Ratten, die MS erfahren hatten (Vázquez et al., 2002), sowie eine Desensitivierung des 5-HT_{1A}R in den Raphekernen nach MD festgestellt werden (Gartside et al., 2003), was auf eine Rolle des 5-HT_{1A}R in der Vermittlung der Effekte von ELS auf das serotonerge System hinweist.

In humanen Studien konnte gezeigt werden, dass Träger des kurzen Allels des 5-HTTLPR eine Hypersensitivität der HHN-Achse aufweisen (Way & Taylor, 2010; Miller et al., 2013). Gesunde Individuen, die s-Allel-Träger sind, zeigen eine erhöhte Cortisolausschüttung unter Stressbedingungen (Alexander et al., 2009), was auf eine gesteigerte Vulnerabilität gegenüber stressbezogenen Erkrankungen hinweisen könnte. Individuen mit dem s/s Genotyp des 5-HTTLPR wiesen mehr depressive Symptome auf, wenn sie zu einem früheren Zeitpunkt in ihrem Leben oder aktuell Stress ausgesetzt waren, zeigten aber andererseits interessanterweise weniger depressive Symptome im Vergleich zu s/l und l/l Allelträgern, wenn sie ein supportives Umfeld in der Kindheit oder aktuell positive emotionale Unterstützung erfahren hatten (Taylor et al., 2006), was auf eine bidirektionale Modulation von Emotionalität durch 5-HT vor dem Hintergrund der Stressexposition hinweist. Auch in der Vermittlung von PS kommt dem serotonergen System eine Rolle zu. Mütterliche Depression und Angsterkrankungen während der Schwangerschaft gehen mit einer verminderten Expression des Enzyms MAOA einher (Blakeley et al., 2013), welches für den Abbau von Monoaminen, u.a. 5-HT, wichtig ist und dem eine Rolle bei verschiedenen psychischen Erkrankungen wie Angsterkrankungen (Tadic et al., 2003), ADHS (Jiang et al., 2001) und Sucht (Vanyukov et al., 2004) zukommt.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine Interaktion zwischen der Funktion des serotonergen Systems und frühen aversiven Lebensereignissen die Aktivität von für Angstverhalten relevanten Gehirnstrukturen sowie der HHN-Achse modifiziert, was sich in veränderten Phänotypen in angstbezogenen Verhaltenstests widerspiegelt. Zusammenfassend kann das serotonerge System in diesem Zusammenhang als eine modulierende Schnittstelle verstanden werden, die die Effekte von frühen aversiven Erfahrungen kontextabhängig verstärken oder abmildern kann.

1.4 Der Einfluss geschlechtsspezifischer Faktoren

Angsterkrankungen weisen, neben weiteren Störungen, in deren Pathogenese Stress eine Rolle spielt, wie Depressionen oder PTBS, eine höhere Prävalenz in Frauen im Vergleich zu Männern auf (Pigott, 2003; Burt & Stein, 2002; Kessler, 2003b). Diese Gegebenheit kontrastiert mit der Tatsache, dass der Großteil der gegenwärtig vorhandenen wissenschaftlichen Studien an männlichen Modellorganismen durchgeführt wurde, vermutlich um eine etwaige höhere Verhaltensvariabilität bei Weibchen, bedingt durch hormonelle Schwankungen im Rahmen des Östruszyklus, und die damit einhergehende schwierigere Kontrollierbarkeit der Experimente, zu vermeiden (Palanza, 2001; Palanza & Parmigiani, 2017). Aufgrund dieses Mangels an Studien in weiblichen Modellorganismen sind viele pathogenetische geschlechtsspezifische Faktoren und Mechanismen noch nicht gründlich erforscht.

1.4.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei psychischen Erkrankungen

Bei zahlreichen psychischen Erkrankungen können Unterschiede in der Prävalenz zwischen den Geschlechtern beobachtet werden. Frauen entwickeln fast doppelt so häufig stressassoziierte Erkrankungen wie Männer, wobei affektive Erkrankungen wie Depression sowie Angsterkrankungen im Vordergrund stehen (Pigott, 2003; Burt & Stein, 2002; Kessler, 2003b), wohingegen Männer höhere Prävalenzen für Autismusspektrumerkrankungen und ADHS aufweisen (May et al., 2019). Darüber hinaus zeigen sich geschlechtsspezifische Unterschiede in Hinblick auf Erkrankungsbeginn, Erkrankungsschwere, klinischen Verlauf und therapeutisches Ansprechen (Pigott, 2003).

Aus murinen Studien ist bekannt, dass männliche Mäuse bei Geburt einen mehrere Stunden anhaltenden Testosteronpeak erfahren (Corbier et al., 1992). Das Enzym Aromatase wandelt das während dieser Phase im Gehirn zirkulierende Testosteron in Östradiol um (Amateau et al., 2004). Dieses im Gehirn generierte perinatale Östrogen scheint der wichtigste Motor für die geschlechtsspezifische Gehirndifferenzierung zu sein und dauerhafte geschlechtsspezifische Unterschiede in der Funktion und Struktur von neuronalen Netzwerken zu vermitteln (Wu & Shah, 2011; McCarthy, 2008). Auch wenn die neuronalen Schaltkreise für geschlechtsspezifisches Verhalten bereits während dieser kritischen perinatalen Periode geprägt werden, zeigen sich geschlechtsspezifische Unterschiede im Verhalten erst ab der Pubertät, wenn die Produktion der Geschlechtshormone ansteigt.

1.4.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Wirkung von „Early Life“-Stress

Wie im vorherigen Abschnitt erläutert, weisen psychische Erkrankungen, in deren Pathogenese Stress eine wichtige Rolle spielt, eine höhere Prävalenz in Frauen als in Männern auf. Diese erhöhte Vulnerabilität von Frauen gegenüber mit Stress im Zusammenhang stehenden Erkrankungen ist u.a. durch unterschiedliche geschlechtsspezifische Auswirkungen von ELS mitbedingt. Frauen, die während der frühen Kindheit Traumata erlitten oder körperlichen Missbrauch erfuhr, weisen ein höheres Risiko auf, an Depressionen, Angsterkrankungen oder PTBS zu erkranken als Männer, die Gleiches in der Kindheit erlebt haben (MacMillan et al., 2001). Das Geschlecht scheint hierbei einen relevanten Modulator der Interaktion zwischen negativen Kindheitserfahrungen und HHN-Achsen-Aktivität im späteren Leben darzustellen. Eine Studie zeigte, dass frühe Traumatisierungserfahrungen zu erhöhten basalen CRH-Spiegeln in Frauen, jedoch erniedrigten basalen CRH-Spiegeln in Männern führen (DeSantis et al., 2011).

Auch in Tierstudien, die Tiere beider Geschlechter in einem vergleichenden Ansatz untersucht haben, konnten über die Lebenszeit bestehende Unterschiede in der Vulnerabilität gegenüber Stress festgestellt werden (Bale & Neill Epperson, 2015). Eine Vielzahl an Studien haben geschlechtsspezifische Unterschiede in der Corticosteroauschüttung sowohl unter basalen Bedingungen, als auch in Reaktion auf pharmakologische, physiologische oder psychologische Stressoren gezeigt. Es wird vermutet, dass diese Unterschiede durch unterschiedliche regulatorische Wirkungen der Geschlechtshormone auf die HHN-Achsenaktivität vermittelt sind: während Östrogene eine Sensibilisierung der Stressachse begünstigen sollen, soll Testosteron die Stressachsenaktivität dämpfen (Goel et al., 2014).

Im Gegensatz zu dem, was eine erhöhte Empfindlichkeit der Stressachse in weiblichen im Vergleich zu männlichen Organismen nahelegen würde, hat MS in verschiedenen Studien zu langandauernd gesteigerter Angst in männlichen, jedoch nicht in weiblichen Mäusen geführt. In Weibchen scheint MS je nach Paradigma weniger anxiogen als in Männchen und in manchen Studien sogar anxiolytisch zu wirken (Wigger & Neumann, 1999; McIntosh et al., 1999; Romeo et al., 2003). Darüber hinaus führen akustische Reize bei Männchen, jedoch nicht bei Weibchen, die MS erfahren hatten, zu gesteigerten Schreckreaktionen und verstärkten Ultraschallvokalisationen (Kalinichev et al., 2002). Auch das vorzeitige Absetzen von der Mutter, was eine Form von frühem Stress darstellt, zeigt in Mäusen und Ratten stärkere und länger andauerndere Auswirkungen auf Männchen als auf Weibchen (Kikusui & Mori, 2009; Kodama et al., 2008). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass hippocampales Lernen in männlichen Mäusen, die ELS erlebt haben, stärker beeinträchtigt ist als in weiblichen Mäusen (Joëls, 2018).

Weibliche Ratten scheinen hingegen empfindlicher gegenüber prä- und periadoleszentem Stress zu sein (McCormick et al., 2008; Pohl et al., 2007; Weintraub et al., 2010). So wiesen weibliche Ratten, die während der Adoleszenz einem Stressparadigma ausgesetzt waren, vermehrt depressionsähnliches Verhalten auf, wohingegen sich das Verhalten männlicher Tiere nicht verändert zeigte (Bourke & Neigh, 2011).

Obwohl weibliche Tiere in den beschriebenen Verhaltenstests weniger stark von den Effekten von ELS betroffen zu sein schienen als Männchen, zeigen Weibchen, die einem PS-Paradigma ausgesetzt waren, im Erwachsenenalter höhere Plasmacorticosteronspitzenspiegel bei akutem Stress, sowie höhere basale Plasma-ACTH-Spiegel und eine höhere basale CRH-Expression im PVN als Männchen (Brunton & Russell, 2010). Auch Studien an Primaten weisen darauf hin, dass die Stressachse in Weibchen empfindlicher gegenüber den Effekten von MS als in Männchen sein könnte, was sich sowohl in akut höheren Cortisolantworten während der Trennungsepisoden, als auch in langfristig veränderten diurnalen Cortisolausschüttungsrhythmen widerspiegelt (Sanchez et al., 2005). Eine Studie in Ratten zeigte hingegen, dass weibliche Tiere zwar höhere basale Corticosteronspiegel als Männchen aufweisen, diese durch MS-Exposition jedoch reduziert werden (Slotten et al., 2006). Eine weitere Studie, die das LN-Stressparadigma angewandt hat, beobachtete in gestressten Weibchen reduzierte, in gestressten Männchen hingegen erhöhte Corticosteronspiegel (Arp et al., 2016). Diese inkonsistenten Ergebnisse sowie die insgesamt vergleichsweise spärliche Datenlage für weibliche Modellorganismen unterstreichen die Wichtigkeit einer genaueren Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Entwicklung von stressbedingten Störungen.

Neben den beschriebenen Unterschieden in der Funktion der HHN-Achse zeigen sich auch geschlechtsspezifische Unterschiede in der Expression von CRH-Rezeptoren in der Amygdala, welchen eine wichtige stressmodulierende Funktion zukommt. Während in präpubertären Ratten die Expression von CRHR1 zwischen den Geschlechtern gleich ist, zeigt sich nach der Pubertät eine Abnahme dieses Rezeptors in der Amygdala von Männchen, jedoch eine Zunahme in Weibchen (Weathington & Cooke, 2012; Weathington et al., 2014). Gleichzeitig weisen Männchen eine vermehrte CRHR2 Expression in der Amygdala auf, welche in Weibchen nicht beobachtet werden kann (Weathington & Cooke, 2012; Weathington et al., 2014). Insgesamt scheinen in adulten Männchen mehr CRHR2 und in adulten Weibchen mehr CRHR1 vorzuliegen, wobei letzteren im limbischen System v.a. eine Rolle in der Vermittlung anxiogener Effekte zukommt, was einen möglichen Mechanismus, der zur höheren Prävalenz von Angsterkrankungen in Frauen im Vergleich zu Männern beiträgt, darstellen könnte (Weathington & Cooke, 2012; Weathington et al., 2014). Eine Ausnahme stellt hierbei die dorsale ventrolaterale DR dar, wo die CRHR2 Expression in Weibchen höher als in Männchen ist, wobei der DR eine Sonderstellung zukommt, insofern der anxiogene Effekt von CRH in

der DR, im Gegensatz zu anderen Hirnregionen, über CRHR2 vermittelt wird (Lukkes et al., 2016). So konnte gezeigt werden, dass die selektive Antagonisierung von CRHR2 in der DR angstähnliches Verhalten in erwachsenen Ratten, die einem sozialen Isolationsstressparadigma in der Adoleszenz ausgesetzt waren, reduziert (Lukkes et al., 2009).

Da die geschlechtsspezifischen Unterschiede im Expressionsniveau der CRH-Rezeptoren nach der Pubertät auftreten, liegt die Vermutung nahe, dass diese Unterschiede durch Geschlechtshormone vermittelt sind. In Primaten konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Östradiol, vermutlich über eine Demethylierung des Promotors des CRHR2-Gens, die CRHR2 mRNA-Expression in der DR hochreguliert (Sanchez et al., 2010b). Darüber hinaus zeigen sich geschlechtsspezifische Unterschiede in der Kopplung der CRH-Rezeptoren an regulatorische G-Proteine: weibliche Ratten zeigen unter Kontrollbedingungen eine höhere Kopplung des CRHR1 an das stimulatorische G-Protein $G\alpha_s$ als männliche Ratten; Stress führt in Männchen zu einem Anstieg der CRHR1- $G\alpha_s$ -Kopplung auf weibliche Niveaus, während sich bei Weibchen kein weiterer Effekt von Stress auf die Rezeptorkopplung nachweisen lässt (Bangasser et al., 2013). Weibchen, die einem PS-Paradigma ausgesetzt waren, zeigten einen Anstieg der Expression von CRHR2 mRNA in der basomedialen Amygdala, wohingegen Männchen in dieser Region eine stressinduzierte Verringerung der CRHR2 mRNA-Expression zeigten (Brunton et al., 2011). Auch für die CRHR1 mRNA Expression nach PS-Exposition zeigt sich ein geschlechts- und subregionenspezifisches Muster, wobei in Männchen nach Stress die CRHR1 mRNA-Expression in Ce und BL, in Weibchen hingegen in der medialen Amygdala erhöht ist (Brunton et al., 2011). In einer anderen Studie konnten nach PS-Exposition in Männchen, jedoch nicht in Weibchen, Veränderungen in der Methylierung von CRH und NR3C1 gefunden werden, die mit einer verringerten Expression des GR im Hippocampus und einer gesteigerten CRH-Expression in der Amygdala einhergingen, und somit auf eine erhöhte Vulnerabilität der HHN-Achse männlicher Organismen gegenüber ELS-Exposition hinweisen (Mueller & Bale, 2008). Darüber hinaus zeigte sich nach 24-stündiger MD eine reduzierte Expression von MR und GR im Hippocampus von Männchen, jedoch eine gesteigerte GR-Expression in dieser Region in Weibchen (Sutanto et al., 1996). Die geschlechtsspezifischen Effekte von Trennungsepisoden während des frühen Lebensalters werden auch durch die Länge der Trennungsepisoden beeinflusst. Weibliche Individuen scheinen hierbei empfänglicher für die positiven Effekte von kurzen Trennungen (5-15 Minuten) im Rahmen von frühem Handling zu sein als Männchen (Bondar et al., 2018).

Auch in humanen Studien gibt es Hinweise auf geschlechtsspezifische Unterschiede in der Funktion und Regulation der Stressachse. Eine humane Studie konnte zeigen, dass ein Polymorphismus von CRHR1 nur beim männlichen Geschlecht den Effekt von Misshandlungen in der Kindheit auf die Ausprägung von Depressionen im Erwachsenenalter moderiert: das rs110402 A-Allel zeigte bei

Männern, jedoch nicht bei Frauen, die in der Kindheit Misshandlungen erlitten hatten, einen protektiven Effekt gegenüber der Entwicklung von Depressionen. Ferner war das Vorliegen dieses Allels mit abgeschwächten Cortisolantworten im Dexamethason- und CRH-Test verbunden (Heim et al., 2009a). Geschlechtsspezifische Unterschiede zeigen sich auch in der Interaktion von Stress mit Haplotypen des MR. Der CA-Haplotyp des MR Gens vermittelt geschlechtsspezifisch unterschiedliche stressabhängige Effekte auf die Entwicklung einer Depression: während der CA-Haplotyp bei Frauen, die in der Kindheit Traumata erfahren hatten, eine protektive Wirkung entfaltet, stellt er bei Männern einen Vulnerabilitätsfaktor für die Ausbildung einer Depression dar. Der GA-Haplotyp, der bei Frauen einen Risikofaktor darstellt, zeigt hingegen keinen Effekt bei Männern, und der CG-Haplotyp, der bei Männern Resilienz gegen Depression vermittelt, zeigt keinen Effekt auf Frauen (Vinkers et al., 2015). Eine andere Studie konnte zeigen, dass die Cortisolausschüttung weiblicher Schulkinder, deren Mütter in der Pränatalzeit depressiv waren, reduziert war, wohingegen diese in männlichen Schulkindern erhöht war (Stonawski et al., 2018).

Die geschlechtsspezifisch unterschiedliche Vulnerabilität gegenüber den Effekten von ELS spiegelt sich auch im Ausprägungsgrad psychischer Erkrankungen wider. So konnte gezeigt werden, dass emotionale Vernachlässigung im Kindesalter bei Frauen stärker mit der Erkrankungsschwere bei Substanzmissbrauch assoziiert ist als bei Männern (Hyman et al., 2006).

1.4.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Ausbildung und Wirkweise des serotonergen Systems

Es ist bekannt, dass es geschlechtsspezifische Unterschiede in der 5-HT-Synthese (Nishizawa et al., 1997), den Spiegeln der 5-HT-Metaboliten (Gottfries et al., 1974) sowie der Expression und Aktivität verschiedener 5-HT-Rezeptoren und -Transporter gibt (Jovanovic et al., 2008) und dass Geschlechtshormone die serotonerge Neurotransmission modulieren können. So konnte gezeigt werden, dass Androgene die Bindung von 5-HT an 5-HTT erleichtern, während Östrogene die Bindung an 5-HTT verzögern (Kranz et al., 2015). Darüber hinaus können Östrogene die Expression von Tph2 in der DR modulieren, u.a. in denjenigen Regionen, welche wichtige Strukturen des Angst-Netzwerks innervieren (Hiroi et al., 2006). Die Depletion von 5-HT durch einen Tph2-Knockout kann die anxiolytischen Effekte von Östrogenen beseitigen (Hiroi et al., 2011), was auf eine Rolle des serotonergen Systems in der Vermittlung geschlechtsspezifischer Effekte auf Angstverhalten hinweist. Die Effekte von Östrogen auf das serotonerge System scheinen u.a. über den die 5-HT Synthese regulierenden Östrogenrezeptor ER β vermittelt zu sein (Hughes et al., 2008; Jacome et al., 2010). In

ER β -defizienten Mäusen zeigt sich neben gesteigertem Angstverhalten auch eine gesteigerte Induktion von LTP in der Amygdala sowie ein Anstieg der Expression des inhibitorischen 5-HT_{1A}R in dieser Struktur (Kre \ddot{u} zel et al., 2001), was darauf hinweist, dass eine gesteigerte Aktivierung des 5-HT_{1A}R über eine Hemmung der inhibitorischen Neurotransmission zu einer verstärkten LTP in der Amygdala beitragen könnte (Kre \ddot{u} zel et al., 2001). Auch dem G-Protein gekoppelten Östrogenrezeptor GPR30 scheint eine Rolle in der Modulation serotonerger Aktivität zuzukommen, indem über diesen Rezeptor die östrogeninduzierte Desensitivierung von 5-HT_{1A}R im PVN weiblicher Ratten vermittelt wird (McAllister et al., 2012).

Die Tph2 mRNA-Expression in den Raphekernen weist zwischen den Geschlechtern ein im Zeitverlauf unterschiedliches Muster auf: in Männchen steigt das Expressionsniveau über die gesamte Adoleszenz hinweg an, während in Weibchen um P42 ein Höhepunkt erreicht wird und die Expression hiernach abfällt (Lukkes et al., 2016). Diese unterschiedliche serotonerge Aktivität in adulten Männchen und Weibchen könnte zu den sexuell dimorphen Verhaltensreaktionen auf Stress beitragen (Burke et al., 2017). Eine frühere Arbeit aus unserer Gruppe konnte zeigen, dass die genetische Manipulation von Komponenten des serotonergen Systems die Stressreaktivität beeinflusst, wobei weibliche Tiere stärker betroffen sind als männliche Tiere (van den Hove et al., 2011). Neben der Tph2-Expression beeinflussen Geschlechtshormone auch die Expression von 5-HT_{1A}R-Autorezeptoren in den Raphekernen, wobei gezeigt werden konnte, dass Östrogen, Progesteron und Testosteron das 5-HT_{1A}R mRNA-Expressionsniveau in der DR von Nagetieren sowie Primaten reduzieren können (Pecins-Thompson & Bethea, 1999; Zhang et al., 1999). Darüber hinaus führen Östrogene auch zu einer verminderten Expression von 5-HT_{1B}R mRNA in der DR, wobei die Expression von 5-HT_{1B}R in dieser Region mit gesteigertem Angstverhalten assoziiert ist (Hiroi & Neumaier, 2009).

Zusätzlich zur 5-HT-Synthese und der Expression von 5-HTRs unterscheidet sich auch die Feuerrate der serotonergen Neurone in der DR zwischen den Geschlechtern, wobei in männlichen Tieren höhere Feuerfrequenzen als in weiblichen Tieren festgestellt werden konnten (Klink et al., 2002).

Neben den beschriebenen geschlechtsspezifischen Unterschieden des serotonergen Systems im Basalzustand können auch geschlechtsspezifische Unterschiede in der serotonergen Innervation der Amygdala bei Stressexposition festgestellt werden. In Ratten, die während des Erwachsenenalters einem milden Stressparadigma ausgesetzt waren, zeigten Weibchen erhöhte 5-HT-Spiegel in der Amygdala, während Männchen einen erhöhten Spiegel an 5-HT-Metaboliten aufwiesen, was auf einen verstärkten 5-HT-Umsatz in dieser Region hinweist. Dieser Effekt wurde durch frühen Stress in Form von postnatalem Handling weiter verstärkt (Duchesne et al., 2009). Eine andere Studie zeigte eine höhere 5-HT-Ausschüttung im BL in Männchen als in Weibchen unter Kontrollbedingungen, sowie

einen Anstieg der 5-HT-Ausschüttung nach Beengungsstress in beiden Geschlechtern, wobei der Anstieg in Weibchen deutlich höher ausfiel als in Männchen (Mitsushima et al., 2006).

1.4.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede im Angstverhalten

Wie bereits in vorhergehenden Abschnitten ausgeführt, weisen Angsterkrankungen eine höhere Prävalenz bei Frauen als bei Männern auf. Bei Frauen stellen sowohl die Menarche, wenn der Östradiolspiegel von präpubertären auf erwachsene Niveaus ansteigt (Patton et al., 1996), als auch die Postmenopause, wenn die Geschlechtshormone am Ende der reproduktiven Phase auf niedrige Werte abfallen, kritische Phasen mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung von Angsterkrankungen dar (Sahingoz et al., 2011). Diese Veränderungen des Angstniveaus in Abhängigkeit von den Sexualhormonspiegeln zeigen sich nicht nur am Anfang und am Ende der reproduktiven Phase, sondern auch im Verlauf des Östruszyklus: gegen Ende der Lutealphase fallen die Geschlechtshormone stark ab, was zu einer Verstärkung von Angstsymptomen in Patientinnen mit Angsterkrankungen führt (Cameron et al., 1988).

In Tierstudien konnte keine pauschale anxiogene oder anxiolytische Wirkung von Östrogenen nachgewiesen werden, wobei die uneinheitlichen Effekte u.a. mit unterschiedlichen Dosierungen und verschiedenen Testparadigmen in Verbindung stehen können (Kastenberger & Schwarzer, 2014; Tomihara et al., 2009; Mora et al., 1996). Die unterschiedlichen Wirkungen von Östrogenen auf Angstverhalten können zudem auch durch die Aktivierung verschiedener Rezeptorsubtypen bedingt sein. Die beiden klassischen Östrogenrezeptoren sind ER α und ER β , welche nukleäre Hormonrezeptoren darstellen (Huang et al., 2010) und als Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren die Genexpression beeinflussen. Neben den genomischen Effekten konnten für diese klassischen Östrogenrezeptoren auch direkte, nicht-genomische Wirkmechanismen gefunden werden (Björnström & Sjöberg, 2005). Die nukleäre Wirkung wird durch eine Rezeptordimerisierung nach Ligandenbindung und die darauffolgende Anlagerung an östrogensensitive Promotorregionen von Zielgenen unter Rekrutierung von co-regulatorischen Proteinen entfaltet (Björnström & Sjöberg, 2005). Des Weiteren gibt es einen dritten, weniger lang bekannten Östrogenrezeptor, GPR30, der einen G-Protein gekoppelten Östrogenrezeptor darstellt und nicht mit den nukleären Östrogenrezeptoren verwandt ist (Prossnitz et al., 2008).

Der Aktivierung von ER α kommt im Allgemeinen eine angstfördernde Wirkung zu (Spiteri et al., 2010; Spiteri et al., 2012), während ER β , vermutlich über eine Interaktion mit der Stressachse, anxiolytische Effekte vermittelt (Imwalle et al., 2005; Walf et al., 2008; Walf et al., 2009). ER β kann nicht nur von

Östrogenen, sondern auch von Androgenmetaboliten aktiviert werden kann (Weihua et al., 2002; Saijo et al., 2011).

Die Exposition gegenüber Stress und angstauslösenden Stimuli ruft in erwachsenen Tieren geschlechtsspezifisch verschiedene Verhaltensweisen hervor, denen, abhängig vom Geschlecht, unterschiedliche neurobiologische Mechanismen zugrunde liegen. Diese Unterschiede werden u.a. über CRH vermittelt, welches geschlechtsspezifisch verschiedene Ausschüttungsmodi aufweist. Darüber hinaus zeigen sich geschlechtsbedingt unterschiedliche CRH-Rezeptorexpressionsprofile, die zu den Unterschieden in der Wirkung von CRH zwischen den Geschlechtern beitragen. Beispielsweise führt akuter Beengungsstress in Weibchen zu einer stärkeren Aktivierung von CRH-produzierenden Neuronen im BNST und Hypothalamus als in Männchen (Babb et al., 2013). Es konnte gezeigt werden, dass Östrogene in weiblichen Mäusen die Erregbarkeit von CRH-produzierenden Neuronen im PVN erhöhen, was auf eine Rolle der Sexualhormone in der Vermittlung geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Stressachsenreaktivität hinweist (Hu et al., 2016). Zudem ist die Wirkung von CRH in Weibchen abhängig von der Östrusphase und somit vom Hormonspiegel. Während des Diöstrus, wenn die Geschlechtshormone niedrige Spiegel aufweisen, führt CRH zu einer Störung der Aufmerksamkeit, die sich in Östrusstadien, die mit hohen Sexualhormonspiegeln einhergehen, nicht zeigt (Cole et al., 2016), was darauf hinweist, dass weibliche Geschlechtshormone protektiv gegenüber den negativen Effekten von CRH auf die Aufmerksamkeitsfähigkeit wirken können. Darüber hinaus konnte in Primaten gezeigt werden, dass eine i.v. Injektion von CRH in Weibchen zu stärker erhöhten Cortisolantworten führt als in Männchen (Sanchez et al., 2010a). Dieser Effekt könnte durch eine Reduktion der CRH-stimulierten Cortisolausschüttung durch männliche Geschlechtshormone bedingt sein (Johnson et al., 1996). Auch in gesunden Erwachsenen zeigt sich nach CRH-Injektion eine stärkere ACTH-Antwort in Frauen als in Männern (Gallucci et al., 1993), was ebenfalls darauf hinweist, dass die HHN-Achse in weiblichen Organismen sensibler gegenüber den Effekten von CRH ist als in männlichen. Neben ihrer Wirkung auf die HHN-Achse können Östrogene auch über eine Aktivierung des magnozellulären oxytocinergen Systems im PVN des Hypothalamus Angstverhalten modulieren. Östradiol kann die Plasmaoxytocinspiegel erhöhen (Amico et al., 1981), wobei Oxytocin angstähnliches Verhalten abschwächen und die Aktivierung der HHN-Achse auf Stressreize abdämpfen kann (Mak et al., 2012; Sabihi et al., 2014; Windle et al., 1997). Die stressdämpfenden Effekte von Östrogen auf das oxytocinerge System werden vermutlich über die Bindung an ER β im PVN vermittelt (Hrabovszky et al., 2004). Ein weiterer Faktor, der zu den Unterschieden im Angstverhalten zwischen Männchen und Weibchen beitragen könnte, stellt die geringere Expression von μ -Opioidrezeptoren in wichtigen Regionen des Angst-Netzwerks in Weibchen im Vergleich zu Männchen dar, was auf eine verringerte inhibitorische Wirkung endogener Opiode auf CRH-induzierte neuronale Aktivität in diesen Regionen

in Weibchen im Vergleich zu Männchen hinweisen könnte und die erhöhte Vulnerabilität von Frauen gegenüber Angsterkrankungen mitbedingen könnte (Guajardo et al., 2017).

Die Corticosteronspiegel nach Stressexposition sind in weiblichen Tieren stark von der Zyklusphase (Atkinson & Waddell, 1997), in der sich die Tiere befinden, sowie von der Art des Stressors (Figueiredo et al., 2002) abhängig. Damit einhergehend ist auch die Ausprägung von Angstverhalten abhängig von der Östrusphase. Im Nagetiermodell kann während des Diöstrus eine gesteigerte Ausprägung von Angstverhalten beobachtet werden (Gouveia et al., 2004; Marcondes et al., 2001; Mora et al., 1996). Frauen mit Angststörungen zeigen während der prämenstruellen Phase verstärkte physiologische Reaktionen auf angstausslösende Stimuli und bei Frauen mit Panikstörung treten während dieser Zyklusphase vermehrt CO₂-induzierte Panikattacken auf (Sigmon et al., 2000; Sigmon et al., 1996).

Einen interessanten Aspekt in der geschlechtsspezifischen Modulation von Angstverhalten stellen Neurosteroiden, und hier v.a. das Progesteronderivat Allopregnanolon, dar, das in glutamatergen und GABAergen Neuronen des ZNS gebildet wird (Baulieu & Robel, 1990; Agís-Balboa et al., 2006). Allopregnanolon ist ein potenter Modulator von GABA_A-Rezeptoren (Belelli & Lambert, 2005) und vermittelt u.a. anxiolytische, sedierende und schmerzlindernde Effekte (Belelli et al., 2009). Neurosteroidspiegel zeigen sich zum einen durch hormonale Veränderungen, z.B. im Rahmen der Schwangerschaft oder des Östruszyklus, beeinflusst (Concas et al., 1998; Maguire et al., 2005), können aber auch im Rahmen psychischer Erkrankungen wie Angst oder Depression verändert sein (Romeo et al., 1998; Uzunova et al., 1998). Veränderte Neurosteroidspiegel scheinen auch eine Rolle in der Pathogenese postpartaler Depressionen zu spielen (Nemeroff, 2008). Direkt nach der Geburt kommt es zu einem starken Abfall der Progesteron- und Allopregnanolonspiegel, was das postpartale Auftreten ängstlicher und depressiver Symptome begünstigen kann (Smith et al., 2007). Eine langfristige antidepressive Behandlung mit SSRIs führt zu einem Wiederanstieg erniedrigter Neurosteroidspiegel, einhergehend mit einer Verbesserung der depressiven Symptomatik (Uzunova et al., 1998; Romeo et al., 1998). Untersuchungen an Ratten konnten einen dramatischen Abfall der Progesteronkonzentration während des Diöstrus feststellen, was mit einer Überexpression des extrasynaptischen $\alpha 4\beta 1$ -GABA_A-Rezeptors im PAG, welcher die anxiolytischen und stimmungsstabilisierenden Effekte von Allopregnanolon während dieser Östrusphase vermittelt, einhergeht und eine Veränderung der Erregbarkeit des Panik-Netzwerks bedingen könnte (Lovick, 2006).

Zusammenfassend können unterschiedliche Geschlechtshormonspiegel zwischen männlichen und weiblichen Individuen, Schwankungen des Hormonspiegels im Rahmen des Östruszyklus, Neurosteroiden wie Allopregnanolon, geschlechtsspezifische Unterschiede in den Expressionsmustern von CRH-Rezeptoren sowie geschlechtsspezifische Unterschiede in den CRH-Rezeptor-aktivierten

Signalwegen zu den Unterschieden im Angstverhalten zwischen weiblichen und männlichen Individuen beitragen (Donner & Lowry, 2013).

Bei der Exposition mit konfliktbezogenen Angstreizen kommt es zu einer vermehrten CRH-Ausschüttung aus dem BNST (Walker et al., 2009), welche CRHR2 vermittelt sowohl direkt als auch indirekt über die Inhibierung lokaler GABAerger INs zu einer Aktivierung der serotonergen Neurone in der DRD/DRC führt (Kirby et al., 2008; Sink et al., 2013; Pernar et al., 2004). Während des Diöstrus könnte ein gesteigerter stressinduzierter Anstieg von CRH zu einer verstärkten 5-HT-Ausschüttung aus der DRD/DRC, welchem eine wichtige Rolle in der Modulation konfliktbasierter Angst zukommt, führen. Ferner können die während des späten Diöstrus abfallenden Spiegel von Progesteron und Allopregnanolon zu einem veränderten Expressionsprofil GABAerger Rezeptoren im PAG führen (Griffiths & Lovick, 2005a; Griffiths & Lovick, 2005b), was zu einer verringerten Abschwächung der GABAergen Inhibition serotonerger Neurone und somit ebenfalls zu gesteigerter serotonerger Aktivität in der DRD/DRC führen könnte. Die gesteigerte Ausschüttung von 5-HT aus der DRD/DRC in für konfliktäres Angstverhalten relevanten Zielregionen wie dem BL (Christianson et al., 2010; Hale et al., 2008a), dem Ce (Commons et al., 2003), sowie dem ventralen Hippocampus trägt zu einer Modulation des Angstverhaltens bei (Hale et al., 2008b).

Für den Panikschaltkreis nimmt man an, dass ein Anstieg der CRH-Ausschüttung im Ce bei Stressexposition auf CRHR2-exprimierende serotonerge Neurone in der DRVL/VLPAG wirkt, welche inhibitorische Projektionen in den DPAG senden und somit panikassoziertes Verhalten begrenzen. Die serotonergen Neurone der DRVL/VLPAG vermitteln ihren antipanischen Effekt auf das DPAG zum einen direkt über postsynaptische inhibitorische 5-HT_{1A}R auf glutamatergen Outputneuronen des DPAG und zum anderen indirekt über aktivierende 5-HT_{2A}R auf GABAergen INs (Pobbe & Zangrossi, 2005; Pobbe, 2011; Reimer et al., 2012). Während des späten Diöstrus nimmt der GABAerge inhibitorische Tonus auf das DPAG ab, was diese für Panikverhalten wichtige Region während dieser Zyklusphase empfindlicher gegenüber panikinduzierenden Stimuli macht (Lovick, 2012). Darüber hinaus könnte ein geschlechtshormonabhängiger Anstieg der CRHR1-Expression auf GABAergen INs in der DRVL/VLPAG bei der Vermittlung geschlechtsspezifischer Effekte auf Panikverhalten eine Rolle spielen. Insgesamt würden die beschriebenen Mechanismen zu einer verstärkten Inhibierung serotonerger Neurone in der DRVL/VLPAG und somit über eine verringerte inhibitorische Wirkung auf das DPAG zum verstärkten Auftreten von Panikreaktionen führen.

2 Studiendesign und Fragestellung der Studie

Das Ziel dieser Studie war es, den Effekt der Interaktion von frühen, negativen Lebensereignissen und genetischer 5-HT-Defizienz auf Angstverhalten in weiblichen Mäusen zu untersuchen. Als Modellorganismus für 5-HT-Defizienz wurden weibliche Tph2-defiziente homozygote (Tph2 $-/-$), heterozygote (Tph2 $+/-$) und wildtypische (Tph2 $+/+$) Mäuse verwendet. Die Tiere wurden zufällig zwei Gruppen zugeteilt, wobei die Hälfte der Tiere zwischen postnatalem Tag 2 (P2) und 15 (P15) einem mütterlichen Trennungsparadigma unterzogen wurde, während die andere Hälfte als Kontrollgruppe diente. Als die Mäuse das Erwachsenenalter erreicht hatten, wurden sie einem von zwei verschiedenen Angsttests, der DLB oder dem OF, ausgesetzt, in denen das Angstverhalten evaluiert wurde. Zusätzlich zur Untersuchung des Angstverhaltens in den entsprechenden Verhaltenstests wurde die neuronale Aktivität in bestimmten Hirnregionen, welche für Angstverhalten relevant sind und vom serotonergen System beeinflusst werden (Paul & Lowry, 2013), mittels c-Fos-Immunhistochemie analysiert. In dieser Studie wurden der basolaterale (BL), laterale (La) sowie zentrale (Ce) Kern der Amygdala, der paraventriculäre Kern des Hypothalamus (PVN) sowie das ventrolaterale (VLPAG) und dorsolaterale (DLPAG) periaquäduktale Höhlengrau untersucht.

3 Materialien

Verhaltensversuche

Produkt	Hersteller
Polysulfonkäfige (267 x 207 x 140 mm)	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland
OF-Arena (schwarzes Acrylglas, 50cm x 50cm x 40cm)	-
DLB-Arena (weißes, opakes Acrylglas, 50cm x 50cm. Helles Kompartiment: 34 cm x 50 cm x 40 cm, Dunkles Kompartiment: 16cm x 50 cm x 40 cm)	-
Wärmelampen	-
Infrarotsensitive High-speed Kamera	The Imaging Source, Bremen, Deutschland
VideoMot2 tracking Software	TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland
Terralin liquid	Schülke, Norderstedt, Deutschland

Östruszyklusbestimmung

Produkt	Hersteller
Pipette Eppendorf Research Plus 10-100µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
0,1% Kristallviolettlösung in ddH ₂ O - Kristallviolett-pulver - ddH ₂ O (doppeldestilliertes Wasser)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glasobjektträger	Marienberg, Deutschland
Aufsteigende Alkoholreihe - 70% Ethanol - 96% Ethanol - 100% Ethanol - Xylol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
VitroClud	NOVOGLAS, Langenbrinck, Deutschland
Lichtmikroskop, Olympus CX 41	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland

Gewebebegewinnung und Aufbereitung

Produkt	Hersteller
Isofluran	cp-pharma, Burgdorf, Deutschland
Safety-Multifly® Kanüle, 21G, 0,8 x 19mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Tyrode - 134 mM NaCl - 2,68 mM KCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland AppliChem, Darmstadt, Deutschland

<ul style="list-style-type: none"> - 1,8 mM CaCl₂ - 1,05 mM MgCl₂ - 0,417 mM NaH₂PO₄ - 11,9 mM NaHCO₃ - 5,56 mM Glucose in ddH ₂ O, pH 6,6	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA AppliChem, Darmstadt, Deutschland
4% PFA in 1x PBS, pH 7,5 <ul style="list-style-type: none"> - Paraformaldehyd - 1x PBS, verdünnt aus 10x PBS 	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Lonza Group, Basel, Schweiz
10% Sucrose in 1x PBS <ul style="list-style-type: none"> - D (+) Sucrose - 1x PBS, verdünnt aus 10x PBS 	AppliChem, Darmstadt, Deutschland Lonza Group, Basel, Schweiz
20% Sucrose in 1x PBS <ul style="list-style-type: none"> - D (+) Sucrose - 1x PBS, verdünnt aus 10x PBS 	AppliChem, Darmstadt, Deutschland Lonza Group, Basel, Schweiz
<ul style="list-style-type: none"> - Isopentan 	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Schneiden des Gehirngewebes

Produkt	Hersteller
Cryostat	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
TissueTek O.C.T	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlanden
HistoBond®+ Objektträger	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland

Immunhistochemische Färbung

Produkt	Hersteller
Pipetten Eppendorf Research Plus 1-10µl, 10-100µl 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Natriumcitratpuffer, pH 6,0 <ul style="list-style-type: none"> - 2,94 g/l Trinatriumcitrat - 500µl/l Tween 20 - destilliertes Wasser 	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Waschpuffer 1x PBS, verdünnt aus 10x PBS	Lonza Group, Basel, Schweiz
0,6% H ₂ O ₂ in 1x PBS <ul style="list-style-type: none"> - Hydrogenperoxid - 1x PBS, verdünnt aus 10x PBS 	Merck, Darmstadt, Deutschland Lonza Group, Basel, Schweiz
Blocking-Lösung <ul style="list-style-type: none"> - 5% Normal Horse Serum (NHS) - 2x Bovines Serumalbumin (BSA) - 0,25% Triton X-100 	Vector Laboratories, Burlingame, California, USA Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Primärantikörper, 1:2000 verdünnt in Blocking-Lösung	

- Anti-c-Fos (sc-52 Lot. F1715)	Santa Cruz, Dallas, Texas, USA
ImmPRESS™ Reagent Anti-Rabbit IgG Peroxidase Cat. No. MP-7401	Vector Laboratories, Burlingame, California, USA
VECTOR® SG Peroxidase (HRP) Substrate Kit, Cat. No. SK-4700	Vector Laboratories, Burlingame, California, USA
Nuclear Fast Red Vector H-3403	Vector Laboratories, Burlingame, California, USA
Aufsteigende Alkoholreihe <ul style="list-style-type: none"> - 70% Ethanol - 96% Ethanol - 100% Ethanol - Xylol 	<ul style="list-style-type: none"> Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
VitroClud	NOVOGLAS, Langenbrinck, Deutschland

Stereologische Auswertung

Produkt	Hersteller
Mikroskop Olympus BX 51	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland
Stereo Investigator Software	MBF Biosciences, Williston, Vermont, USA
Franklin K.B.J. & Paxinos G.: „The Mouse Brain in stereotaxic coordinates“, 3. Auflage, 2008	Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA

Statistik

Produkt	Hersteller
IBM SPSS Statistics	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland

4 Methoden

4.1 Verhalten

4.1.1 Tiere und Tierhaltung

Alle Experimente wurden im Einvernehmen mit der Richtlinie des Europäischen Parlaments und des Europäischen Rates (2010/63/EU) durchgeführt und von lokalen Behörden genehmigt (Tierversuchsgenehmigung Würzburg: 55.2- 2531.01-57/12). Sämtliche Bemühungen wurden unternommen, um die Tierzahlen gering zu halten und das Leiden der Tiere zu minimieren. Die Gesamtheit der in dieser Studie eingeschlossenen Tiere wurde im Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM) in Würzburg verpaart, gehalten und getestet. Die Studie wurde in zwei Kohorten mit einer zeitlichen Differenz von einem Monat durchgeführt. Die erste Kohorte wurde im OF, die zweite Kohorte in der DLB getestet. Jede Testkohorte hatte eine komplementäre Gruppe testnaiver Tiere, die keiner Verhaltenstestung unterzogen wurden. Die Elterngeneration wurde in Gruppen von 2-7 Tieren in einem 14h/10h Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten, die Lichtphase erstreckte sich von 7 bis 21 Uhr. Die Temperatur wurde in der Einrichtung konstant auf $21\pm 1^\circ\text{C}$ bei 45-55% Luftfeuchtigkeit gehalten. Standardnahrung sowie Wasser waren den Tieren *ad libitum* verfügbar.

4.1.2 Verpaarung

Für die Verpaarung wurden jeweils zwei weibliche und eine männliche vollständig auf C57BL/6N zurückgekreuzte Tph2^{+/-} Maus von etwa 3 Monaten Alter zusammen in einen Standardkäfig (267 x 207 x 140 mm; Tecniplast Deutschland GmbH) gesetzt. Die Weibchen wurden zwei Mal täglich auf das Vorhandensein eines vaginalen Pfropfens, welcher die erfolgreiche Begattung anzeigt, untersucht. Nach 5 Tagen wurden alle Zuchtpaare getrennt und diejenigen Weibchen, die mindestens einmal einen vaginalen Pfropfen aufgewiesen hatten, in einen Einzelkäfig transferiert. Das Gewicht der Weibchen wurde vor der Verpaarung sowie 4, 7 und 10 Tage nach Trennung von den Männchen kontrolliert. Weibchen, die innerhalb der ersten 10 Tage keine Gewichtszunahme aufwiesen, wurden nochmals mit einem anderen Männchen verpaart. Ab Tag 14 nach Trennung der Zuchtpaare wurden die Käfige zwei Mal täglich auf das Vorhandensein von Jungtieren überprüft.

4.1.3 Maternale Separation

Der Tag der Geburt wurde als postnataler Tag (P) 0 definiert. Zwischen P2 und P15 wurden etwa die Hälfte der Muttertiere und ihre jeweiligen Würfe einem von Veenema et al. (Veenema et al., 2006) angepassten MS-Paradigma unterzogen, während die andere Hälfte als Kontrollgruppe diente und gemäß Standardprotokoll aufgezogen wurde. Die Tiere wurden zufällig zu den jeweiligen Gruppen zugeteilt und es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Jungtiere zwischen den Gruppen, weder innerhalb der Kohorten, noch im Vergleich zwischen den beiden Kohorten. Während der MS-Episoden wurden die Jungtiere gemeinsam mit ihrem jeweiligen Nistmaterial aus dem Heimkäfig entnommen und in einen benachbarten Raum gebracht, um eine Kommunikation über Laute mit dem Muttertier zu verhindern. In dem Raum, in dem die MS durchgeführt wurde, wurden die Würfe zusammen mit ihrem jeweiligen Nistmaterial in einen sauberen Käfig gesetzt und verblieben dort unter Wärmelampen bei einer Temperatur von etwa 29°C und einer Luftfeuchtigkeit von über 60% für eine Trennungsdauer von 3 Stunden. Die Tiere wurden zu zufällig festgelegten Zeitpunkten innerhalb der hellen Phase separiert, sodass der Zeitpunkt der Trennung für die Muttertiere nicht vorhersehbar war. Die Kontrolltiere wurden bis auf P5, P10 und P15, wo das Gewicht der Würfe sowie der Mütter kontrolliert wurde, sowie P5, P12 und P19, wo die Käfige gewechselt wurden, ungestört in ihrem Heimkäfig belassen. An P25 \pm 3 wurden die Jungtiere abgesetzt und die weiblichen Tiere in Gruppen von 6 \pm 2 Tieren getrennt nach Genotyp und Versuchsgruppe gehalten. Die Mäuse durften bis auf wöchentliche Käfigwechsel sowie Gewichtskontrollen und die Bestimmung der Östruszyklusphase an P41 und P55 ungestört aufwachsen. Die Verhaltenstestung wurde im Alter von etwa 2 Monaten durchgeführt. Die Tiere wurden in der postovulatorischen Phase (Metöstrus/Diöstrus) getestet, in der die Geschlechtshormone niedrige Spiegel aufweisen, um für hormonelle Schwankungen im Rahmen des Zyklus zu kontrollieren.

4.1.4 Bestimmung der Östrusphasen

Da es im Rahmen der Schwankungen des Östrogenspiegels während des Östruszyklus zu Unterschieden im Verhalten kommen kann, wurde die Phase des Östruszyklus zwei Mal um P41 und P55 bestimmt und der Testtag so festgelegt, dass die Tiere sich zum Zeitpunkt der Verhaltenstestung in der postovulatorischen Phase (Metöstrus/Diöstrus) befanden. Um die Östrusphase am Testtag zu berechnen, wurde ein regelmäßiger 4 Tage dauernder Zyklus, bestehend aus 4 verschiedenen Stadien, zugrunde gelegt, sowie keine Abweichungen der Östruszyklusdauer für Tph2 -/- und Tph2+/- im Vergleich zu wildtypischen Mäusen angenommen. Um zu überprüfen, ob die tatsächliche Östrusphase am Testtag der vorkalkulierten entsprach, wurde die Östrusphase zusätzlich am

Testtag bevor die Tiere geopfert wurden, bestimmt. Es zeigte sich, dass sich 77,9% der Tiere im DLB-Test und 80,6% der Tiere im OF-Test am Testtag tatsächlich in der postovulatorischen Phase befanden und die Tiere, die sich nicht in der postovulatorischen Phase befanden, relativ gleichmäßig über die Gruppen hinweg verteilt waren (12,5-28,6% der Tiere pro Gruppe im OF-Test, 14,3-25% der Tiere pro Gruppe im DLB-Test). Aufgrund der geringen Tierzahl in der Studie und der vergleichsweise ausgeglichenen Verteilung über die Gruppen hinweg, beschlossen wir, alle Testtiere in die Verhaltensanalyse und die immunhistochemische Auswertung einzuschließen.

Die Östrusphasen wurden nach einem modifizierten Protokoll von McLean et al. (Mc Lean et al., 2012) bestimmt. Eine vaginale Spülung wurde durchgeführt, indem 100 µl autoklaviertes, doppeldestilliertes Wasser (ddH₂O) mithilfe von autoklavierten Pipettenspitzen und einer 100 µl Pipette (Eppendorf) in die Vagina pipettiert wurden, wobei darauf geachtet wurde, dass die Pipettenspitze nicht in die Vagina eingeführt wurde. Die Spülflüssigkeit wurde in den Vaginalkanal freigesetzt und dann wieder zurück in die Pipette gesogen. Dieser Vorgang wurde etwa 20 Mal wiederholt, um eine für die Untersuchung ausreichende Zellzahl in der Spülflüssigkeit zu erlangen. Anschließend wurde die Spülflüssigkeit aspiriert, auf einen Glasobjektträger (Marienberg) pipettiert und bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Während des nachfolgenden Färbeprotokoll wurden die Präparate zunächst für 30s in ein Glas mit 0,1% Kristallviolettlösung (0,1 g pulverisiertes Kristallviolett, verdünnt in 100 ml ddH₂O) gelegt und dann vorsichtig mit ddH₂O gewaschen, um überflüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Objektträger wurden anschließend einer verkürzten Alkoholreihe zugeführt, wobei sie für jeweils eine Minute nacheinander in 70% Ethanol, 96% Ethanol, 100% Ethanol und Xylol transferiert wurden. Zuletzt wurden die Objektträger mit Vitro Clud (NOVOGLAS) eingedeckt. Nach dem Färbeprozess konnte das Östrusstadium mithilfe eines Lichtmikroskops bestimmt werden (Abb. 7).

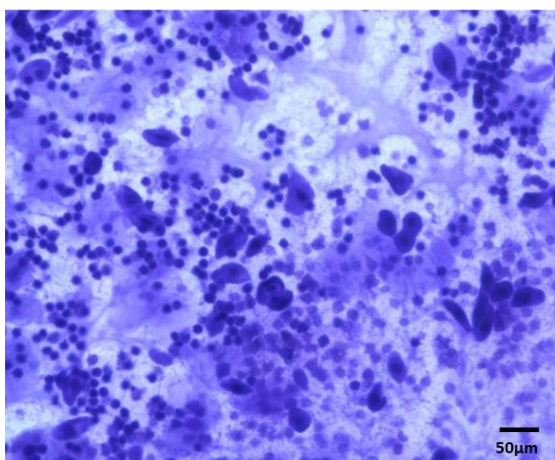


Abb. 7: Beispielhaftes Bild eines Vaginalabstrichs in der Diöstrus-Phase, Kristallviolettfärbung

4.1.5 Verhaltenstestung

Die Versuchstiere wurden entweder dem DLB-Test (n= 45, n= 6-9 Tiere pro Gruppe) oder dem OF-Test (n= 45, n= 4-9 Tiere pro Gruppe) unterzogen. Innerhalb jeder Kohorte wurden die Tiere zufällig entweder der Test-, oder der testnaiven Gruppe zugeteilt. Während der Verhaltenstestung wurde die Aktivität der Mäuse konstant bei Infrarotlicht, welches die Arena von unterhalb des entsprechenden Testapparats beleuchtet hat, verfolgt. Die Verhaltensexperimente wurden von oben mit einer infrarot-sensitiven, an der Decke befestigten Kamera aufgezeichnet. Für die Verhaltensanalyse wurde die VideoMot2 Tracking-Software (TSE Systems) verwendet. Die Verhaltenstestung wurde innerhalb der Hellphase zwischen 8 und 13 Uhr durchgeführt. Die Testdauer betrug jeweils 10 Minuten und das Verhalten wurde über die gesamte Testdauer analysiert. Um durch eine unbekannte Umgebung induzierte Effekte zu berücksichtigen (Kalueff et al., 2006), wurde jeder Test zusätzlich in zwei separaten Intervallen (0-5 und 5-10 min) ausgewertet. Zwischen den Verhaltensversuchen wurde die entsprechende Testarena mit Terralin liquid (Schülke) gereinigt.

Das Prinzip der DLB basiert auf den entgegengesetzten, miteinander in Konflikt stehenden Bestrebungen, einerseits eine unbekannte Umgebung zu explorieren und andererseits hell beleuchtete, offene Gebiete zu vermeiden (Crawley & Goodwin, 1980; Onaivi & Martin, 1989). Der Versuchsaufbau bestand aus einer quadratischen Arena (50 x 50 x 40 cm) aus weißem Acrylglas, die in ein helles und ein dunkles Kompartiment aufgeteilt ist. Der helle Bereich (34 x 50 x 40 cm) war mit einer Lichtintensität von 100 Lux im Zentrum und 70 Lux in den Ecken ausgeleuchtet, während das dunkle Kompartiment (34 x 50 x 40cm) nicht beleuchtet war (0 Lux). Die beiden Kompartimente sind durch ein offenes Ausgangsloch verbunden, das es dem Tier ermöglicht, frei von einem in das andere Kompartiment zu gelangen (Waider et al., 2017). Die Testtiere wurden zu Beginn des Tests jeweils in die vordere rechte Ecke des dunklen Kompartiments gesetzt. Die gesamte zurückgelegte Strecke, sowie die Zeit, die jeweils im dunklen und hellen Kompartiment verbracht wurde, die Anzahl der Eintritte in das helle Kompartiment und die Latenzzeit, bis das helle Kompartiment zum ersten Mal betreten wurde, wurden bestimmt. Der Eintritt in das helle Kompartiment wurde als Übertritt des gesamten Körpers der Maus mit allen 4 Pfoten durch die Verbindungstür in das helle Kompartiment definiert.

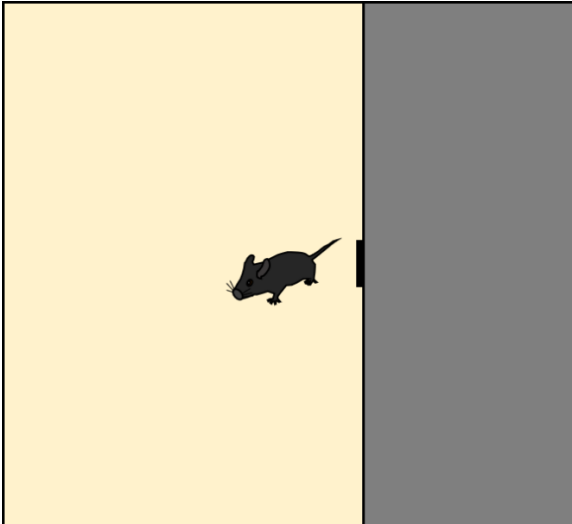


Abb. 8: Schematische Darstellung des DLB-Tests

Das OF ist eine quadratische Arena aus schwarzem Acrylglas mit den gleichen Maßen wie die DLB (50 x 50 x 40 cm). Die Arena war mit einer Lichtintensität von 90 Lux im Zentrum und 50 Lux in den Ecken ausgeleuchtet, um einen aversiven Reiz für die Testtiere darzustellen (Waider et al., 2017). Jedes Versuchstier wurde zu Beginn des Tests in die rechte vordere Ecke der Arena gesetzt und durfte die Arena frei erkunden. Die Zeit, die in der Zentrumzone verbracht wurde, die Latenz, bis das Zentrum zum ersten Mal betreten wurde, die Anzahl der Besuche des Zentrums, die Zeit, die pro Besuch im Zentrum verbracht wurde und die Distanz, die im Zentrum sowie über die gesamte Arena zurückgelegt wurde, wurden bestimmt (Seibenhener & Wooten, 2015).

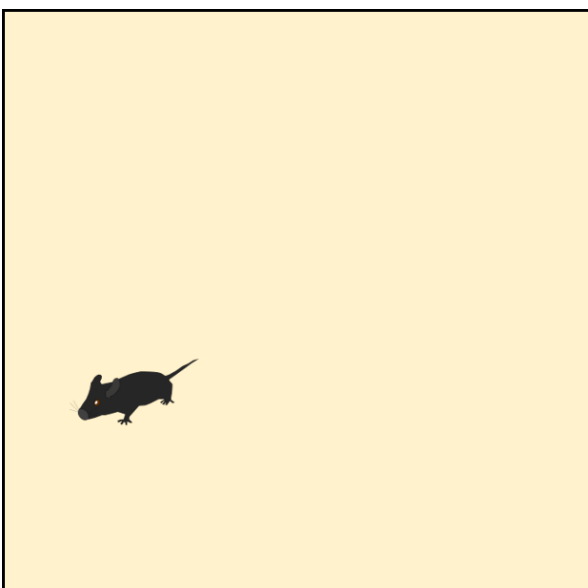


Abb. 9: Schematische Darstellung des OF-Tests

Zusätzlich wurden für beide Tests das Aufstellen auf die Hinterbeine, das Auftreten von Sprüngen und die initiale lokomotorische Latenz, definiert als die Dauer, bis sich das Tier zum ersten Mal in der Arena fortbewegt hat, wobei alle vier Pfoten ihre Position geändert haben müssen, für Genotyp und Kondition verblindet manuell anhand der aufgezeichneten Videodateien ausgewertet.

Springen wurde als nach oben gerichtete Bewegung definiert, bei der alle vier Pfoten den Boden verlassen. Es konnten zwei Subtypen von Sprüngen unterschieden werden: „zielgerichtete Sprünge“ sind aufwärts gerichtete Sprünge, die meist nach Aufstellen auf die Hinterbeine in der Nähe der Wand erfolgen und die als gerichteter, intentionierter und koordinierter Versuch, der Arena zu entfliehen, interpretiert wurden. Daneben konnten „Paniksprünge“ beobachtet werden. Diese Sprünge bezeichnen impulsive Sätze gegen die Wände, die nicht zwingend nach Aufstellen auf die Hinterbeine stattfinden, und die weniger wie ein zielgerichteter Versuch, der Arena zu entkommen erscheinen, als wie ein eruptives Ausagieren von panikähnlichen Emotionen in einer Situation, die als bedrohlich und ausweglos empfunden wird. Die Bewegungsabfolge bei „Paniksprüngen“ erscheint weniger koordiniert und ungerichteter, sie sind variabler in der Ausführung und können nicht nur aus der aufrechten Position, sondern aus verschiedenen Stellungen heraus, wie beispielsweise seitwärts, erfolgen. Darüber hinaus imponieren Paniksprünge impulsiver, kraftvoller und gewaltsamer.

Um der hohen Variabilität in der Anzahl der Sprungereignisse Rechnung zu tragen, wurde Springen als kategorialer Parameter analysiert. Wie später gezeigt werden wird, scheint Springen keine normale Reaktion auf aversive Umgebungen zu sein, was die Annahme unterstützt, dass nicht die Anzahl der Sprünge, sondern das Auftreten oder Nicht-Auftreten dieses Verhaltensparameter, den für die Untersuchung relevanten Verhaltensparameter darstellt.

Aufstellen wurde als Stehen in aufrechter Position, wobei beide Vorderpfoten vom Boden abgehoben sein müssen, definiert und konnte sowohl an den Wänden der Arena, als auch in jedem anderen Bereich der Arena, stattfinden. Das Aufstellen auf die Hinterbeine wurde als Parameter für exploratives Verhalten interpretiert (Tanaka et al., 2012).

In der DLB wurden Aufstellen und Sprünge getrennt für das helle und das dunkle Kompartiment erfasst und ausgewertet, und die Anzahl der Aufstellereignisse wurde in Relation zu der Zeit, die in dem jeweiligen Kompartiment verbracht wurde, angegeben.

4.2 Auswertung der durch die Verhaltensexperimente bedingten neuronalen Aktivierungsmuster

4.2.1 Gewebeverarbeitung

2 Stunden nach der Verhaltenstestung wurden die Tiere der Testgruppe sowie die korrespondierenden verhaltensnaiven Mäuse mit Isofluran narkotisiert, geopfert, zunächst 2,5 min mit 1x Tyrode transkardial vorgespült und anschließend mit 4% Paraformaldehyd (PFA; gelöst in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), pH 7,5) für 10 min mithilfe eines automatisierten Druckperfusionsystems bei einem Perfusionsdruck von 16 Einheiten perfundiert. Die Gehirne wurden vorsichtig herauspräpariert und in 4% PFA für 48 h bei 4° C postfixiert. Anschließend wurden die Gehirne bei 4° C für 24 h in 10% Sucrose in 1x PBS, und dann für weitere 48 h in 20% Sucrose in 1x PBS eingelegt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Gehirne erst dann von einer Konzentration in die nächsthöhere Konzentration transferiert bzw. eingefroren wurden, wenn sie auf den Boden des Behältnisses abgesunken waren. Im Anschluss wurden die Gehirne bei -80° C in auf Trockeneis gekühltem Isopentan eingefroren, indem die Gehirne langsam über eine Zeitspanne von etwa 60 s in Isopentan eingetaucht wurden. Anschließend wurden die Gehirne bei -80° C im Gefrierschrank aufbewahrt. Bevor die Gehirne mit dem Cryostat geschnitten wurden, wurden sie 30 min im Cryostat bei -20° C belassen, um einen Temperaturangleich des Gewebes zu ermöglichen. Anschließend wurden die Gehirne mit Tissue-Tek O.C.T. (Sakura) aufgezogen. Mithilfe eines Cryostaten (Leica Biosystems) wurden 30µm dicke Schnitte im Bereich Bregma -0,22 mm bis -5,80 mm angefertigt und auf Histobond+ Objektträger (Marienfeld Superior) in sechs Serien mit einem Abstand von 180 µm zwischen benachbarten Schnitten aufgezogen. Im Anschluss wurden die Schnitte 1 h an der Luft getrocknet und anschließend bei -80° C im Gefrierschrank aufbewahrt.

4.2.2. c-Fos-Immunhistochemie

Die neuronale Aktivierung wurde mittels Immunhistochemie gegen c-Fos bestimmt. C-Fos ist ein „immediate early gene“ oder frühzeitig auftretendes Genprodukt, dessen Expression infolge neuronaler Aktivierung gesteigert ist und 2 h nach Exposition gegenüber einem Reiz sein Maximum erreicht (Hale et al., 2006; Hale et al., 2008a; Hale et al. 2008b).

Die gefrorenen Schnitte wurden 30 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet, danach 3 x 5 min in 1 x PBS gewaschen und anschließend für 20 min einer Antigendemaskierung bei 80° C im Wasserbad in Natriumcitratpuffer (pH 6,0) unterzogen. Im Anschluss an den Antigen-Retrieval wurden die Schnitte 3x für jeweils 5 min in 1x PBS gewaschen. Danach wurden gewebeeigene Peroxidasen inaktiviert, indem eine Lösung aus 0,6% Hydrogenperoxid in 1x PBS zubereitet, auf die Objektträger pipettiert und

diese 30 min bei Raumtemperatur auf ebenem Untergrund inkubiert wurden. An diesen Vorgang schlossen sich 3 weitere Waschschrte à 5 min in 1x PBS an. Nachfolgend wurden die Schnitte mit einer Blockinglösung aus 5% Normalem Pferdeserum (NHS), 2% Rinderserumalbumin (BSA) und 0,25% Triton X-100 in 1x PBS für 2 h bei Raumtemperatur auf ebenem Untergrund inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Blockinglösung entfernt und die Schnitte wurden 48 h in einer feuchten Kammer bei 4° C auf ebenem Untergrund mit einem 1:2000 in der Blockinglösung aus dem vorherigen Schritt verdünnten Antikörper gegen c-Fos (sc-52 Lot. F1715, Santa Cruz) inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Schnitte 3x 10 min in 1x PBS gewaschen und für 50 min mit 300 µl ImmPRESS (Peroxidase) Polymer Anti-Kaninchen IgG Lösung (Cat. No. MP-7401, Vector Laboratories) in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur auf ebenem Untergrund inkubiert. Nach 3 jeweils 10-minütigen Waschschrten in 1x PBS wurde 300 µl Vector SG Peroxidasesubstrat (Cat. No. SK-4700, Vector Laboratories) nach Packungsanweisung zubereitet, auf die Schnitte pipettiert, und 5-15 min inkubiert, bis der gewünschte Färbungsgrad erreicht wurde.

Hiernach wurden die Schnitte 5x 7 min in 1x PBS und anschließend 2x 5 min in Leitungswasser gewaschen bevor die Schnitte mit Nuclear Fast Red (Vector H-3403) gegengefärbt wurden. Abschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, indem sie nacheinander für jeweils 5 min in 70%igen Ethanol und 96%igen Ethanol, zwei Mal für jeweils 5 min in 100%igen Ethanol, 10 min in eine 1:1 Mischung aus Xylol und Propanol, 15 min in Xylol, und dann erneut für mindestens 15 min in einen frischen Behälter mit Xylol getaucht wurden. Im Anschluss an die Alkoholreihe wurden die Schnitte mithilfe von Vitro Clud (NOVOGLAS) eingedeckt.

Es wurden in beiden Kohorten Kontrollfärbungen durchgeführt, bei denen das Protokoll wie beschrieben durchgeführt, jedoch kein Antikörper verwendet wurde. Bei diesen Kontrollen zeigte sich kein immunhistochemisches Signal.

4.2.3 Stereologische Auswertung

Zur Bestimmung der Anzahl an c-Fos positiven (c-Fos+) Zellen in BL, La, Ce, VLPAG, DLPAG und PVN wurde ein mit der Stereo Investigator Software (MBF Biosciences) ausgestattetes Computermikroskopiesystem verwendet. Mithilfe dieses Systems wurden c-Fos+ Zellen in design-basierter Stereologie ausgezählt. Die Konturen der Amygdalakerne BL, La und Ce (Bregma -0,70 mm bis -2,40 mm), PAG (Bregma -4,16 mm bis -4,96 mm) und PVN (Bregma -0,46 mm bis -1,06 mm) wurden bei 4-facher Vergrößerung auf mikroskopischen Bildern mithilfe eines Computermonitors live umfahren, wobei die jeweiligen Grenzen der Strukturen anhand eines Mausgehirnatlanten (Franklin & Paxinos, 2008) bestimmt wurden. Anschließend wurden die c-Fos+ Zellen bei 20-facher Vergrößerung

unter Zuhilfenahme des Optical Fractionator Workflows ausgezählt. Im Rahmen dieser Studie fiel bei der Ausmessung der Gehirnregionen eine reduzierte Größe verschiedener Zielregionen in Tph2^{-/-} Tieren auf, die wir in Zusammenhang mit der von uns in dieser Studie beobachteten und von verschiedenen Autoren (Alenina et al., 2009; Gutknecht et al., 2012) beschriebenen reduzierten Körpergröße der Tph2^{-/-} Mäuse sahen, die allerdings zum Teil auch durch Gewebeschädigung oder den Verlust einzelner Schnitte mitbedingt sein kann. Neben der Anzahl an c-Fos⁺ Neuronen wurde daher auch die Dichte der c-Fos⁺ Neurone (Zellen pro Fläche) bestimmt und ausgewertet.

4.3 Statistik

Die statistische Analyse der Verhaltens- und immunhistochemischen Daten wurde mithilfe der SPSS Statistiksoftware (IBM Deutschland GmbH) durchgeführt. Die Daten wurden unter Zuhilfenahme des Shapiro-Wilks-Test sowie visuell durch die Bewertung von Histogrammen auf Normalverteilung überprüft. Wenn die Annahme einer Normalverteilung nicht getroffen werden konnte, wurden die Daten mit dem non-parametrischen Kruskal-Wallis Test für multifaktorielle Analysen (Tph2-Genotyp und MS) und anschließend mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert, oder mittels log₁₀ oder Quadratwurzel transformiert und anschließend mit einer multifaktoriellen 3-way ANOVA getestet. Für die Transformation der Daten wurde zunächst mit einer log₁₀-Transformation begonnen und im Anschluss ein Test auf Normalverteilung durchgeführt. Wenn die log₁₀-Transformation keine Normalverteilung herstellen konnte, wurde eine Quadratwurzeltransformation durchgeführt. Normalverteilung konnte nach log₁₀- oder Quadratwurzeltransformation für alle Datensätze erreicht werden. Im Anschluss wurde eine multifaktorielle 3-way ANOVA (Tph2-Genotyp * MS * Test), gefolgt von Bonferroni-korrigierten t-Tests durchgeführt. Korrelationen wurden mithilfe des Spearmanschen Korrelationskoeffizienten berechnet. P-Werte ≤0,050 wurden als signifikant betrachtet. Kategoriale Parameter wurden mithilfe des Chi-Quadrat Tests ausgewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Einfluss von Tph2-Genotyp und MS auf Körpergewicht, Größe der Zielregionen im Gehirn und Überleben der Versuchstiere

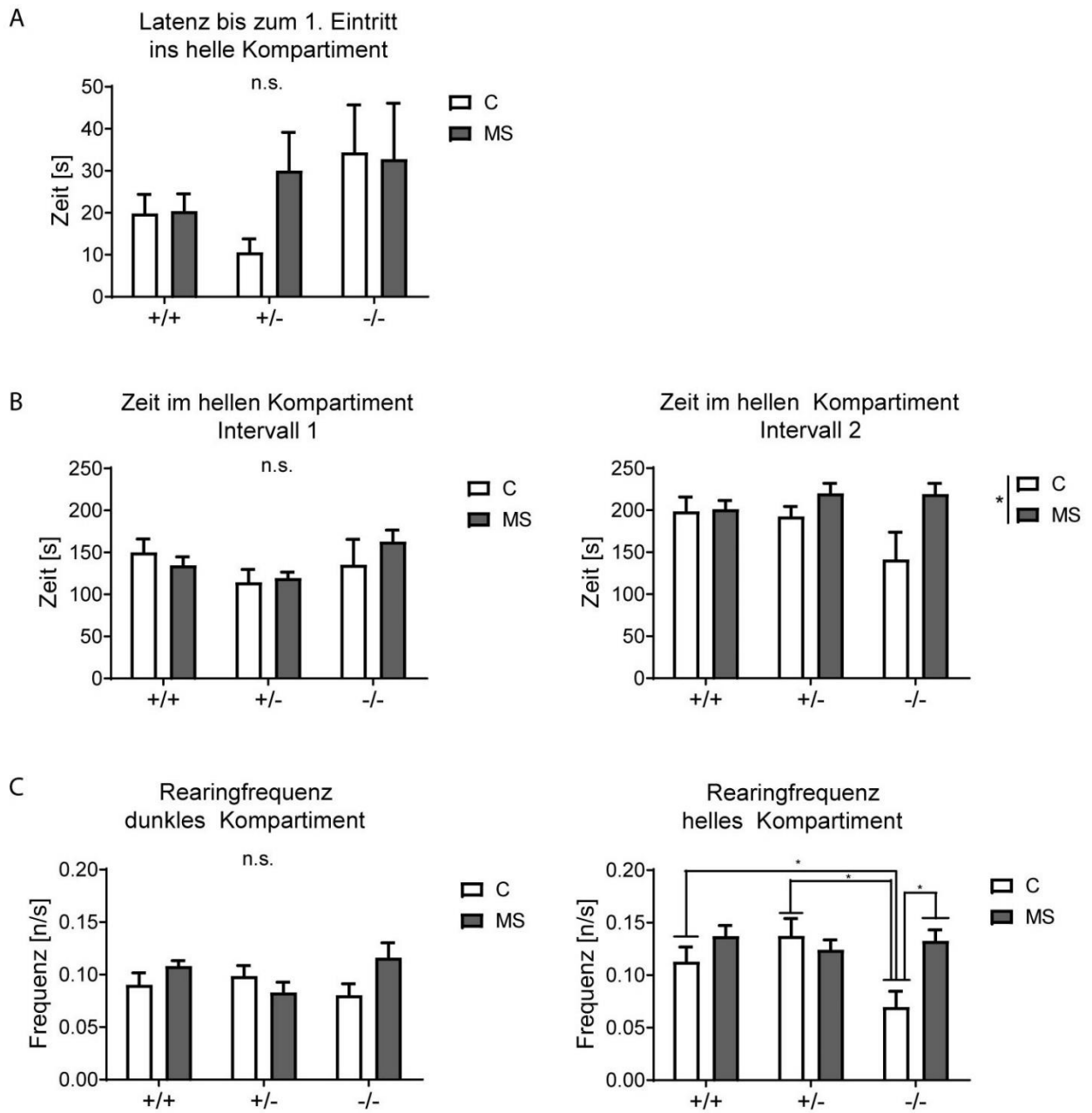
Ab dem Zeitpunkt des Absetzens konnte ein signifikanter Genotypeneffekt auf das Gewicht der weiblichen Nachkommen festgestellt werden. Dieser Effekt bestand in beiden Kohorten und zu allen erhobenen Zeitpunkten (P25, P41 und P55, $p < 0,001$). Post hoc-Analysen ergaben, dass weibliche Tph2^{-/-} Mäuse beider Kohorten zu allen Zeitpunkten ein niedrigeres Körpergewicht im Vergleich zu Tph2^{+/+} und Tph2^{+/-} Tieren aufwiesen (siehe Tabelle S.1, Anhang 12.1). Dieser Effekt zeigte sich unabhängig von der Exposition gegenüber MS. Darüber hinaus konnte ein MS-Effekt in Tph2^{+/+} Nachkommen der 2. Kohorte an P41 und P55 ($p < 0,010$) und in Tph2^{+/-} Nachkommen der 1. Kohorte an P55 ($U = 77,0$; $p = 0,020$) festgestellt werden, wobei Tiere, die einem MS-Paradigma unterzogen worden waren, ein höheres Gewicht als nichtgestresste Kontrolltiere aufwiesen (siehe Anhang 12.1). In Tph2^{-/-} Mäusen konnte eine verringerte Größe verschiedener untersuchter Gehirnregionen (La und BL, $p \leq 0,030$) festgestellt werden, wobei die Fläche des La in Tph2^{-/-} Tieren kleiner als in Tph2^{+/-} ($p < 0,001$) sowie Tph2^{+/+} Mäusen ($p = 0,003$) war. Ferner konnte eine verkleinerte Fläche des BL in Tph2^{-/-} Tieren im Vergleich zu Tph2^{+/-} Tieren gefunden werden ($p = 0,021$). Die detaillierten Maße der Gehirnareale sowie deren Diskussion finden sich im Anhang unter 12.4. Das Überleben der Versuchstiere wurde durch die MS-Exposition nicht beeinflusst.

5.2 Maternale Separation reduziert Angstverhalten in Tryptophanhydroxylase 2-defizienten Mäusen im „Dark-light box“-Test

Im DLB-Test zeigten Tiere aller Gruppen eine vergleichbare Latenz bis zum ersten Eintritt in das helle Kompartiment (Abb. 10A). Ferner konnten im ersten 5 min Testintervall keine Unterschiede zwischen den Gruppen in der Zeit, die die Tiere im hellen Kompartiment verbrachten, beobachtet werden (Abb. 10B, linke Tafel). Die Zeitdauer, die die Tiere während des ersten Besuchs im hellen Kompartiment zubrachten, unterschied sich signifikant zwischen den Gruppen ($\chi^2(5) = 15,7$; $p = 0,008$): Tph2^{-/-} ($U = 2,0$; $p = 0,003$) und Tph2^{+/-} ($U = 8,5$; $p = 0,040$) Tiere, die dem MS-Paradigma ausgesetzt waren, verbrachten während des ersten Besuchs mehr Zeit im hellen Kompartiment als ihre wildtypischen Artgenossen (Abb. 11A). Innerhalb der Kontrollgruppe verbrachten Tph2^{-/-} Tiere während des ersten Besuchs signifikant mehr Zeit im hellen Kompartiment als Tph2^{+/-} Tiere der Kontrollgruppe ($U = 10,0$;

$p = 0,045$; Abb. 11A). Während des zweiten 5 min Testintervalls verbrachten Tiere der MS-Gruppe signifikant mehr Zeit im hellen Kompartiment als Kontrolltiere ($U = 145,0$; $p = 0,023$; Abb. 10 B, rechte Tafel). In der Post hoc-Analyse ergab sich ein Trend für eine längere im hellen Kompartiment verbrachte Zeit während des zweiten Intervalls in Tph2 $-/-$ Tieren der MS-Gruppe im Vergleich zu Tph2 $-/-$ Tieren der Kontrollgruppe ($p = 0,071$). Ein MS-Effekt zeigte sich auch als Trend, wenn die Zeit, die über die gesamte 10 min Testperiode im hellen Kompartiment verbracht wurde, betrachtet wurde ($U = 168,0$; $p = 0,082$; Abb. 11 C). Ein signifikanter Unterschied in der totalen Aufstellfrequenz im hellen Kompartiment konnte zwischen den verschiedenen Gruppen beobachtet werden ($\chi^2(5) = 12,6$; $p = 0,027$; Abb. 10 C, rechte Tafel). Tph2 $-/-$ Tiere der Kontrollgruppe stellten sich mit einer niedrigeren Frequenz auf die Hinterbeine als heterozygote ($U = 8,0$; $p = 0,039$) und wildtypische ($U = 8,0$; $p = 0,039$) Kontrolltiere, sowie Tph2 $-/-$ Tiere, die MS ausgesetzt waren ($U = 2,0$; $p = 0,005$). Die Aufstellfrequenzen im dunklen Kompartiment unterschieden sich hingegen nicht signifikant zwischen den Gruppen (Abb. 10 C, linke Tafel). In einer getrennten Analyse der beiden Intervalle zeigte sich die Aufstellfrequenz im hellen Kompartiment während des ersten Intervall von Gruppeneffekten betroffen ($\chi^2(5) = 16,9$; $p = 0,005$), während die Aufstellfrequenz im Dunklen sich im zweiten Intervall signifikant zwischen Gruppen unterschied ($\chi^2(5) = 11,4$; $p = 0,043$; Anhang, Tab. S2). Während des ersten Intervalls hat MS im hellen Kompartiment die Aufstellfrequenz in Tph2 $+/+$ ($U = 7,0$; $p = 0,015$) und Tph2 $-/-$ Tieren ($U = 5,0$; $p = 0,014$) erhöht, während Tph2 $+/-$ Tiere der Kontrollgruppe eine höhere Aufstellfrequenz aufwiesen als Tph2 $+/+$ ($U = 9,0$; $p = 0,016$) und Tph2 $-/-$ ($U = 2,0$; $p = 0,005$) Tiere der Kontrollgruppe (Abb. 11 F, linke Tafel). Im zweiten Intervall führte die Exposition gegenüber MS im dunklen Kompartiment zu einer gesteigerten Aufstellfrequenz in Tph2 $+/-$ ($U = 11,0$; $p = 0,049$) und Tph2 $-/-$ ($U = 7,0$; $p = 0,028$), jedoch nicht in Tph2 $+/+$ Mäusen (Abb. 11 G, rechte Tafel).

Der Anteil an Tieren, bei denen Sprünge beobachtet werden konnten, war von einer Interaktion zwischen Tph2-Genotyp und MS ($\chi(5) = 18,3$; $p = 0,003$), sowie der Helligkeit des Bereichs der Arena abhängig (helles Kompartiment ($\chi(5) = 19,2$; $p = 0,002$), dunkles Kompartiment ($\chi(5) = 4,4$; $p = 0,493$; Abb. 10 D). Die meisten Tiere zeigten das erste Sprungereignis im zweiten 5 min Test-Intervall (Anhang, Abb. S1). Im hellen Kompartiment konnte kein Effekt innerhalb der Kontrollgruppe gefunden werden ($\chi(2) = 3,8$; $p = 0,148$), wo 11,1% der Tph2 $+/+$, 12,5% der Tph2 $+/-$ und 50% der Tph2 $-/-$ Mäuse Sprünge aufwiesen (Abb. 10 D). Die Exposition gegenüber MS war mit einem erhöhten Anteil an springenden Tph2 $-/-$ Tieren (75%) im Vergleich zu sowohl Tph2 $+/+$ (0%) als auch Tph2 $+/-$ (0%) Tieren der MS Gruppe verbunden ($\chi(2) = 14,4$; $p = 0,001$; Abb. 10 D). Für die Parameter Anzahl der Besuche des hellen Kompartiments, totale zurückgelegte Distanz über die gesamte Testdauer und beide Kompartimente, sowie initiale Latenz zur Lokomotion konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet werden (Abb. 11 B, D, E).



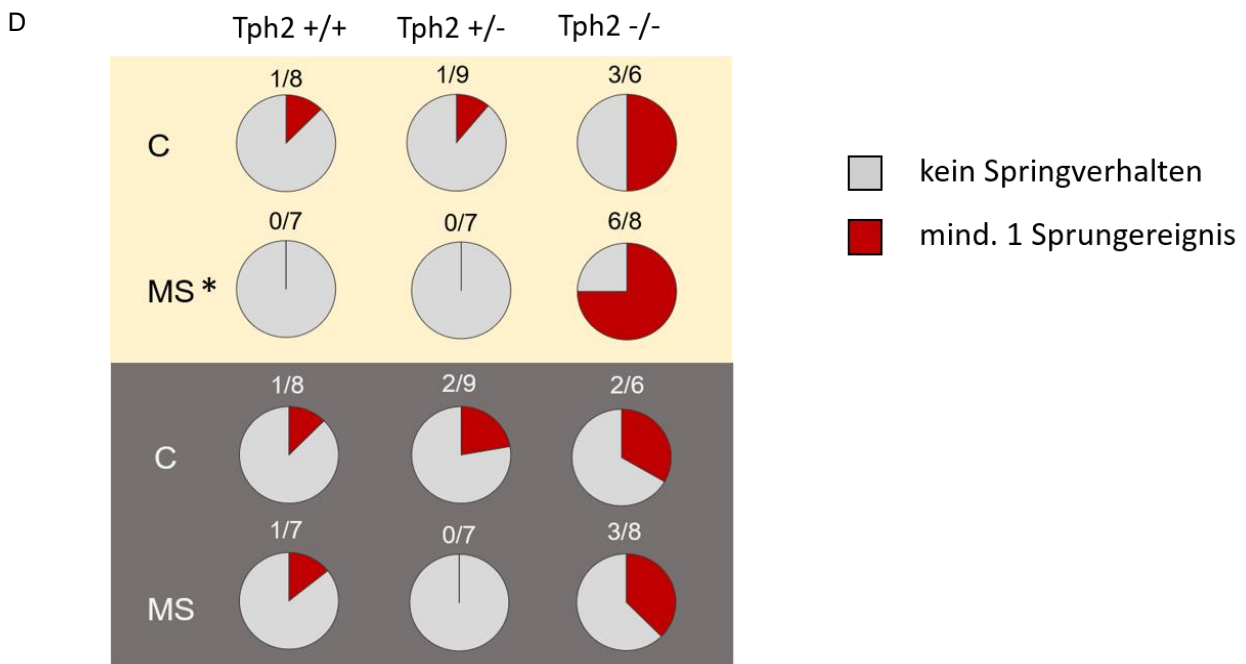


Abb. 10: **Angstbezogenes Verhalten im DLB-Test.** (A) Die Latenz zum ersten Eintritt in das helle Kompartiment [s] wurde nicht durch Tph2-Defizienz, MS oder ihrer Interaktion beeinflusst. (B) Zeit [s], die im ersten Intervall (Int. 1; n.s. = nicht signifikant) und zweiten Intervall (Int. 2; $p = 0,023$) im hellen Kompartiment verbracht wurde. (C) Aufstellfrequenz [n/s] im hellen und dunklen Kompartiment zeigt vermehrtes Aufstellen nach MS im hellen Kompartiment, abhängig vom Tph2-Genotypen ($p < 0,050$). Säulen zeigen Gruppenmittelwerte \pm Standardfehler ($n = 6-8$ /Gruppe). * $p < 0,050$, (Post hoc: Mann-Whitney U). (D) Tortendiagramm des Anteils an Tieren, die Sprungverhalten (rot) im hellen (gelb unterlegt) und dunklen (grau unterlegt) Kompartiment springen. * $p < 0,050$ (Chi-Square Test für Assoziation; $n = 6-9$ /Gruppe).

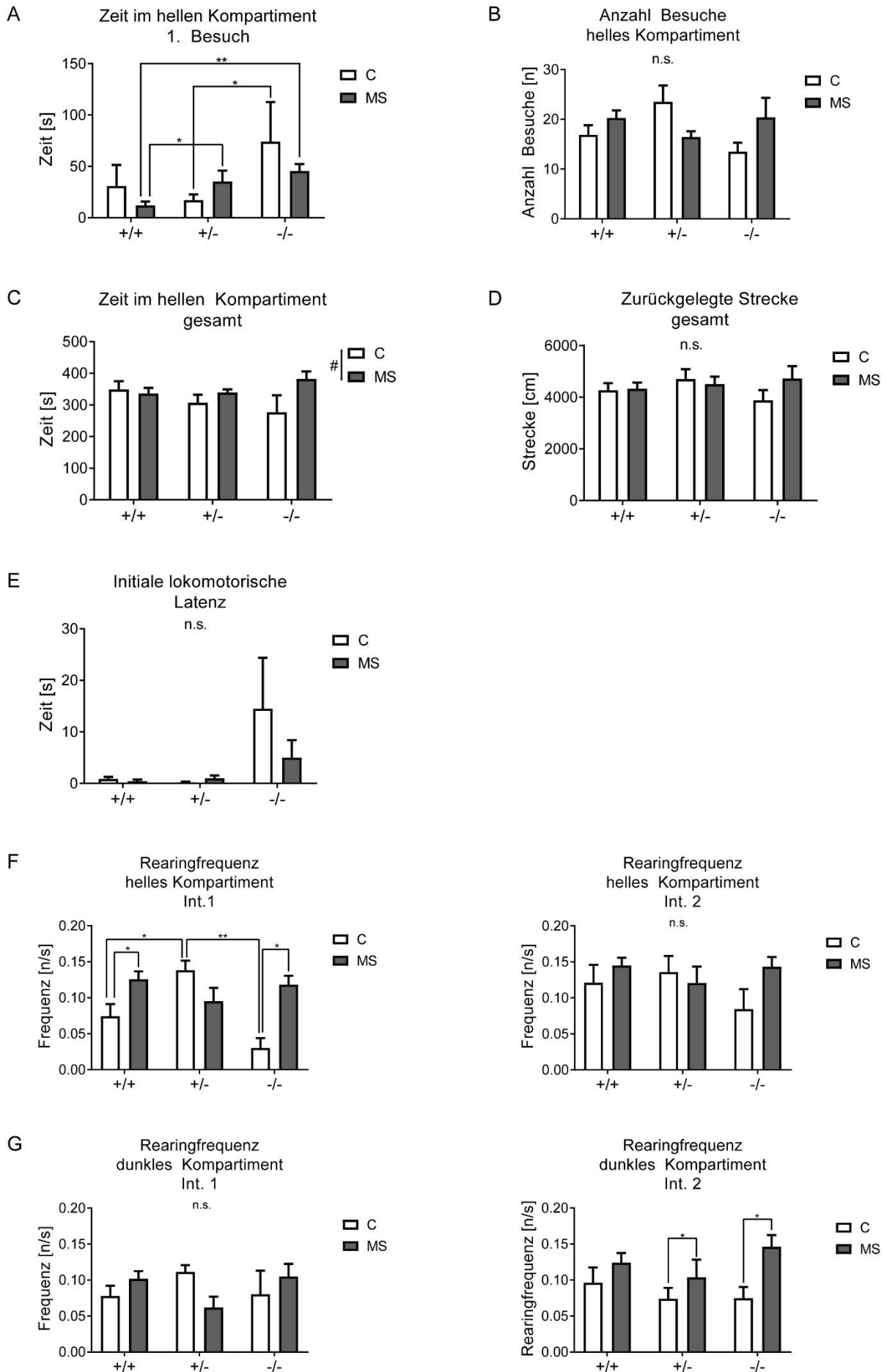


Abb. 11: **Ausgewählte angstbezogene Verhaltensparameter im DLB-Test.** (A) Die Zeit, die beim ersten Besuch im hellen Kompartiment verbracht wurde, unterscheidet sich signifikant zwischen den Gruppen. (B) Die Anzahl der Besuche des hellen Kompartiments wird nicht durch Tph2-Defizienz, MS oder ihre Interaktion beeinflusst. (C) Es gibt einen Trend für einen Effekt von MS auf die Zeit, die über die gesamte Testdauer im hellen Kompartiment verbracht wird ($p < 0,100$). (D) Die Distanz, die Tiere über die gesamte Testdauer und beide Intervalle zurücklegen und (E) die Latenzzeit zur initialen Lokomotion sind nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen. (F) Die Rearingfrequenz im hellen Kompartiment im 1. Intervall unterscheidet sich signifikant zwischen den Gruppen. (G) Die Rearingfrequenz im dunklen Kompartiment im 2. Intervall wird in 5-HT-defizienten Tieren durch MS beeinflusst. Säulen entsprechen Gruppenmittelwerten \pm Standardfehlern ($n = 6-8$ /Gruppe für die automatisch erhobenen Verhaltensparameter; $n = 6-9$ /Gruppe für die manuell erhobenen Verhaltensparameter). * $p < 0,050$; ** $p < 0,01$ # $p < 0,100$; n.s. = nicht signifikant (Post hoc: Mann-Whitney U).

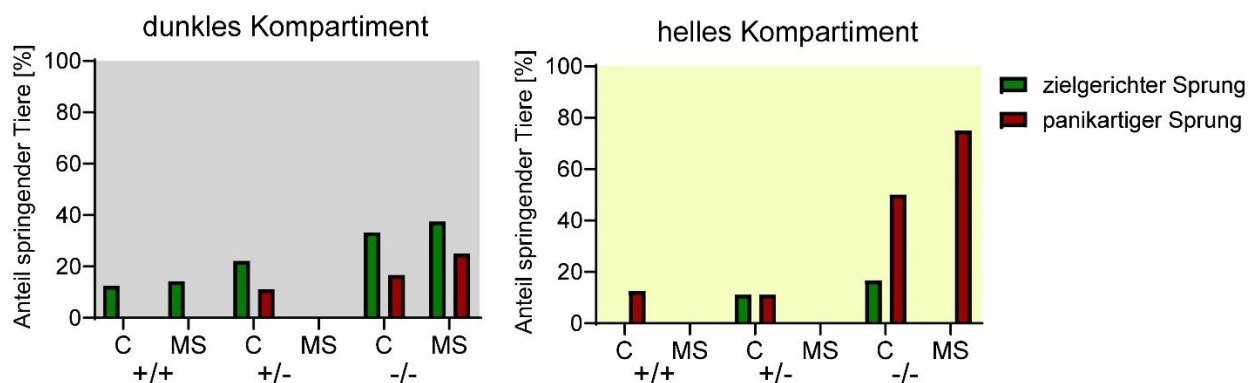
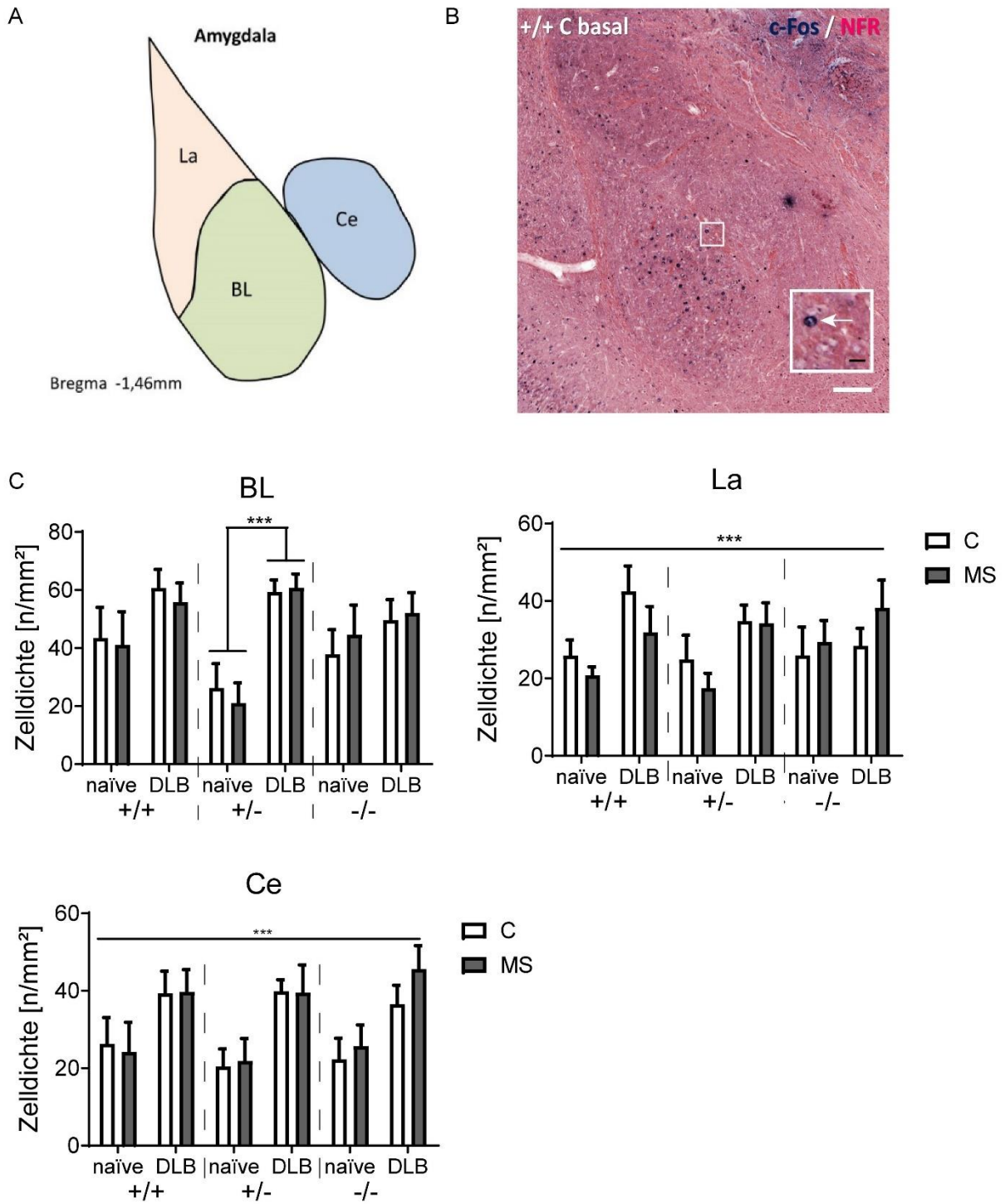


Abb. 12: **Sprungverhalten im DLB-Test, unterteilt nach zielgerichteten vs. Paniksprüngen und hellem vs dunklem Kompartiment, nach Gruppen aufgetragen.** Säulen geben den Anteil an Tieren (%) an, die den Parameter „Sprungverhalten“ (mindestens 1 Sprungereignis) aufwiesen.

Wenn zwischen „zielgerichteten Sprüngen“ und „Paniksprüngen“ im dunklen vs. hellen Kompartiment unterschieden wird, können verschiedene interessante Beobachtungen gemacht werden: im dunklen Kompartiment kommen „zielgerichtete Sprünge“ (Abb. 12, linke Tafel, gezeigt in grün) zu einem gewissen Grad über die meisten Gruppen hinweg vor, und ihr Auftreten war bei nur etwa 40% der Tiere von „Paniksprüngen“ im weiteren Verlauf des Tests gefolgt (davon 75% in Tph2 -/- Mäusen, Abb. 12, linkes Panel, gezeigt in lila). Im hellen Kompartiment traten „zielgerichtete Sprünge“ (rechtes Panel, gezeigt in grün) deutlich seltener auf, und wenn sie auftraten, waren sie in 100% der Fälle von „Paniksprüngen“ im weiteren Verlauf des Tests gefolgt. Ein bedeutender Anteil von 75% der Tph2 -/- Mäuse, die MS unterzogen wurden, vollführte mindestens einen „Paniksprung“ (Abb. 12, rechte Tafel, gezeigt in lila).

Mithilfe der c-Fos-Immunhistochemie konnte eine generell gesteigerte Aktivität im La ($F(1,74) = 11,9$; $p = 0,001$) und Ce ($F(1,74) = 24,4$; $p < 0,001$) nach DLB-Testung festgestellt werden, was sich an einer

höheren Dichte an c-Fos+ Zellen in Test- im Vergleich zu verhaltensnaiven Tieren zeigt (Abb. 13 C). Außerdem wurde eine Tph2-abhängige Zunahme an c-Fos+ Zellen im BL ($F(2,74) = 3,3$; $p = 0,043$) beobachtet: ein Anstieg der Dichte an c-Fos+ Zellen konnte nur in getesteten in Vergleich zu nicht getesteten Tph2 +/- Mäusen gefunden werden, unabhängig davon, ob diese der MS- oder Kontrollkondition ausgesetzt waren ($p < 0,001$; Abb. 13 C), wohingegen ein solcher Effekt des DLB-Tests auf die neuronale Aktivierung für die anderen Genotypen nicht beobachtet werden konnte. Im PVN wurde die Dichte an c-Fos+ Zellen vom Tph2-Genotypen beeinflusst ($F(2,74) = 3,8$; $p = 0,028$; Abb. 13 F). Tph2 -/- Tiere zeigten keinen Anstieg der Dichte an c-Fos+ Zellen nach Verhaltenstestung im Vergleich zu verhaltensnaiven Tph2 -/- Tieren, während ein signifikanter Anstieg in Tph2 +/- ($p < 0,001$) und Tph2 +/- ($p < 0,001$) Mäuse gefunden werden konnte (Abb. 13 F). Zudem war die Dichte an c-Fos+ Zellen im La zum einen positiv mit der Aufstellfrequenz im hellen Kompartiment ($\rho = 0,318$; $p = 0,035$), v.a. während des zweiten Intervalls ($\rho = 0,331$; $p = 0,028$), und zum anderen mit der Aufstellfrequenz im dunklen Kompartiment über die gesamte Testdauer ($\rho = 0,474$; $p = 0,001$), sowie während des ersten Intervalls ($\rho = 0,422$; $p = 0,004$) assoziiert. Darüber hinaus war die Dichte an c-Fos+ Zellen im La positiv mit der Anzahl der Besuche des hellen Kompartiments über die gesamte Testdauer ($\rho = 0,343$; $p = 0,023$) sowie während des ersten Intervalls ($\rho = 0,313$; $p = 0,039$) korreliert. Die Dichte an c-Fos+ Zellen sowohl im BL ($\rho = 0,389$; $p = 0,009$) als auch im Ce ($\rho = 0,353$; $p = 0,019$) waren nur positiv mit der Aufstellfrequenz im dunklen Kompartiment korreliert. Die Dichte an c-Fos+ Zellen im BL korrelierte mit der Aufstellfrequenz im Dunklen während des ersten Intervalls ($\rho = 0,356$; $p = 0,018$) und die Dichte an c-Fos+ Zellen im Ce korrelierte mit der Aufstellfrequenz im dunklen Kompartiment während des zweiten Intervalls ($\rho = 0,300$; $p = 0,048$).



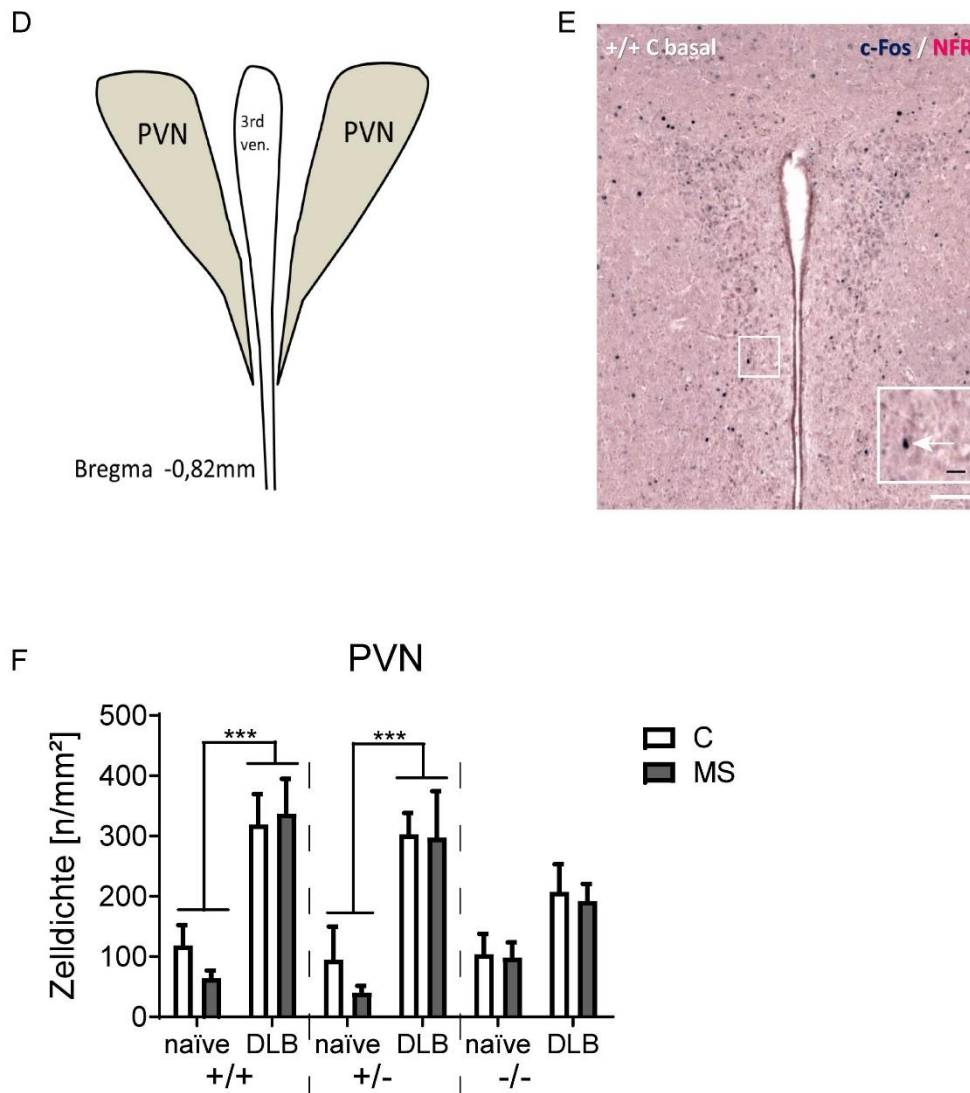


Abb. 13: **Neuronale Aktivierung in Amygdala und PVN nach DLB-Verhaltenstestung, bestimmt über die Dichte an c-Fos+ Zellen.** (A) und (D) Anatomische Schemazeichnungen, die die Unterkerne der Amygdala (A) bzw. den PVN (D) zeigen. (B) und (E) Repräsentative histologische Schnitte, der c-Fos immunhistochemischen Färbung mit Nuclear Fast Red (NFR) Gegenfärbung in der Amygdala (Bregma -1,5 mm) (B) und dem PVN (Bregma -0,8 mm) (E) weißer Maßbalken = 250 μ m. Einsätze zeigen höhere Vergrößerung, Pfeile zeigen auf c-Fos-positive Neurone (schwarzer Maßbalken = 50 μ m). (C) DLB-Exposition führt zu einem allgemeinen Anstieg an neuronaler Aktivität im La und Ce. Im BL führt die DLB-Exposition zu einem genotypabhängigen Anstieg der neuronalen Aktivität ($p < 0,050$). (F) DLB-Exposition führt in Abhängigkeit vom Genotyp zum Anstieg der neuronalen Aktivität im PVN ($p < 0,050$). Die Exposition gegenüber MS zeigte keinen Effekt auf die DLB-abhängige neuronale Aktivierung. Säulen entsprechen Gruppenmittelwerten \pm Standardfehler ($n = 6-9$). *** $p \leq 0,001$ (Post hoc: t-test, Bonferroni).

5.3 Maternale Separation befördert fluchtartiges Verhalten in Tryptophanhydroxylase 2-defizienten Mäusen im „Open field“-Test

Im OF-Test haben Tiere über alle Gruppen hinweg eine vergleichbare Distanz sowohl in der zentralen Zone, als auch über die gesamte Arena zurückgelegt (Abb. 14 A und B). Ferner zeigten sich weder die Latenz, bis das Zentrum zum ersten Mal betreten wurde (Abb. 15 A), noch die Anzahl an Besuchen der zentralen Zone (Abb. 15 B), noch die Zeit, die pro Besuch im Zentrum verbracht wurde (Abb. 15 C), noch die Zeit, die insgesamt in der Zentrumzone verbracht wurde (Abb. 14 C) von einem der untersuchten Faktoren beeinflusst. Für die insgesamt während des 1. Testintervalls zurückgelegte Zeit zeigte sich ein Interaktionseffekt zwischen Tph2-Genotyp und MS ($\chi^2(5) = 11,6$; $p = 0,040$; Abb. 15 E). Tph2 -/- Tiere, die MS erlebt hatten, legten eine geringere Distanz zurück als Tph2 +/- (U = 10,0; $p = 0,012$) und Tph2 +/+ (U = 8,0; $p = 0,012$) Tiere der MS-Gruppe, und MS führte zu einer Abnahme der Distanz, die Tph2 -/- Tiere der MS-Gruppe im Vergleich zu Tph2 -/- Tieren der Kontrollgruppe zurücklegten (U = 3,0; $p = 0,027$; Abb. 15 E). Dieser Effekt zeigte sich nicht mehr im 2. Testintervall (Abb. 15 F). Zusätzlich könnte eine Genotyp-abhängige Reduktion des Aufstellens auf die Hinterbeine ($\chi^2(2) = 7,9$; $p = 0,019$) über die gesamte Testperiode gefunden werden, wobei sich Tph2 -/- Tiere über die gesamte Testperiode weniger häufig auf die Hinterbeine stellten als Tph2 +/+ und Tph2 +/- Tiere ($p < 0,020$; Abb. 14 D). Während des 1. Testintervalls konnte ein Interaktionseffekt von MS mit Tph2-Defizienz ($\chi^2(5) = 12,0$; $p = 0,035$) gefunden werden, der darin bestand, dass Tph2 -/- MS Tiere sich weniger häufig auf die Hinterbeine aufstellten als Tph2 +/+ (U = 8,0; $p = 0,011$) und Tph2 +/- (U = 11,5; $p = 0,018$) Tiere, die MS erlebt hatten und MS nur in Tph2 -/- Mäusen, die Häufigkeit, mit der sich die Tiere auf die Hinterbeine stellten reduzierte (U = 4,5; $p = 0,050$; Abb. 15 G), während dieser Effekt in den anderen Genotypen nicht beobachtet werden konnte. Während des 2. Testintervalls stellten sich Tph2 -/- Tiere seltener auf die Hinterbeine als Tph2 +/- Mäuse (U = 47,0; $p = 0,010$), unabhängig von der Exposition gegenüber MS ($\chi^2(2) = 7,1$; $p = 0,028$; Abb. 15 H). Das Erleben von MS führte zu einem erhöhten Anteil an Tieren, die Sprünge während des OF-Tests zeigten, im Vergleich zu Tieren der Kontrollkondition ($\chi(1) = 5,1$; $p = 0,024$). Dieser Effekt war in Tph2 +/- Tieren besonders ausgeprägt, wo 0% der Kontrolltiere sprangen, hingegen 44,4% der Tph2 +/- Tiere, die MS erfahren hatten (Abb. 14 E). Sprünge traten meist in der zweiten Hälfte der Testperiode auf und waren positiv mit der Anzahl der Besuche im Zentrum ($\rho = 0,30$; $p = 0,045$), sowie mit der insgesamt zurückgelegten Strecke ($\rho = 0,37$; $p = 0,012$) in diesem Intervall assoziiert. Darüber hinaus zeigten sich gruppenspezifische Unterschiede in der initialen lokomotorischen Latenz ($\chi^2(5) = 14,4$; $p = 0,013$) (Abb. 15 D). Tph2 -/- Tiere, die MS ausgesetzt waren, zeigten eine verlängerte initiale lokomotorische Latenz im Vergleich zu Tph2 +/+ (U = 12,5; $p = 0,040$) und Tph2 +/- (U = 9,0; $p = 0,009$) Tieren der MS-Gruppe. Tph2 +/- Tiere, die MS

erfahren hatten, zeigten die kürzeste lokomotorische Latenz ($p < 0,020$). Die Differenzierung zwischen "zielgerichteten Sprüngen" und "Paniksprüngen" zeigte, dass der Anteil an Tieren, die "Paniksprünge" zeigten höher war, als der Anteil der Tiere, die „zielgerichtete Sprünge“ zeigten. Ferner traten bei 100% der Tiere, die zielgerichtete Sprünge vollführt hatten, im Verlauf auch "Paniksprünge" auf (Abb. 14 F).

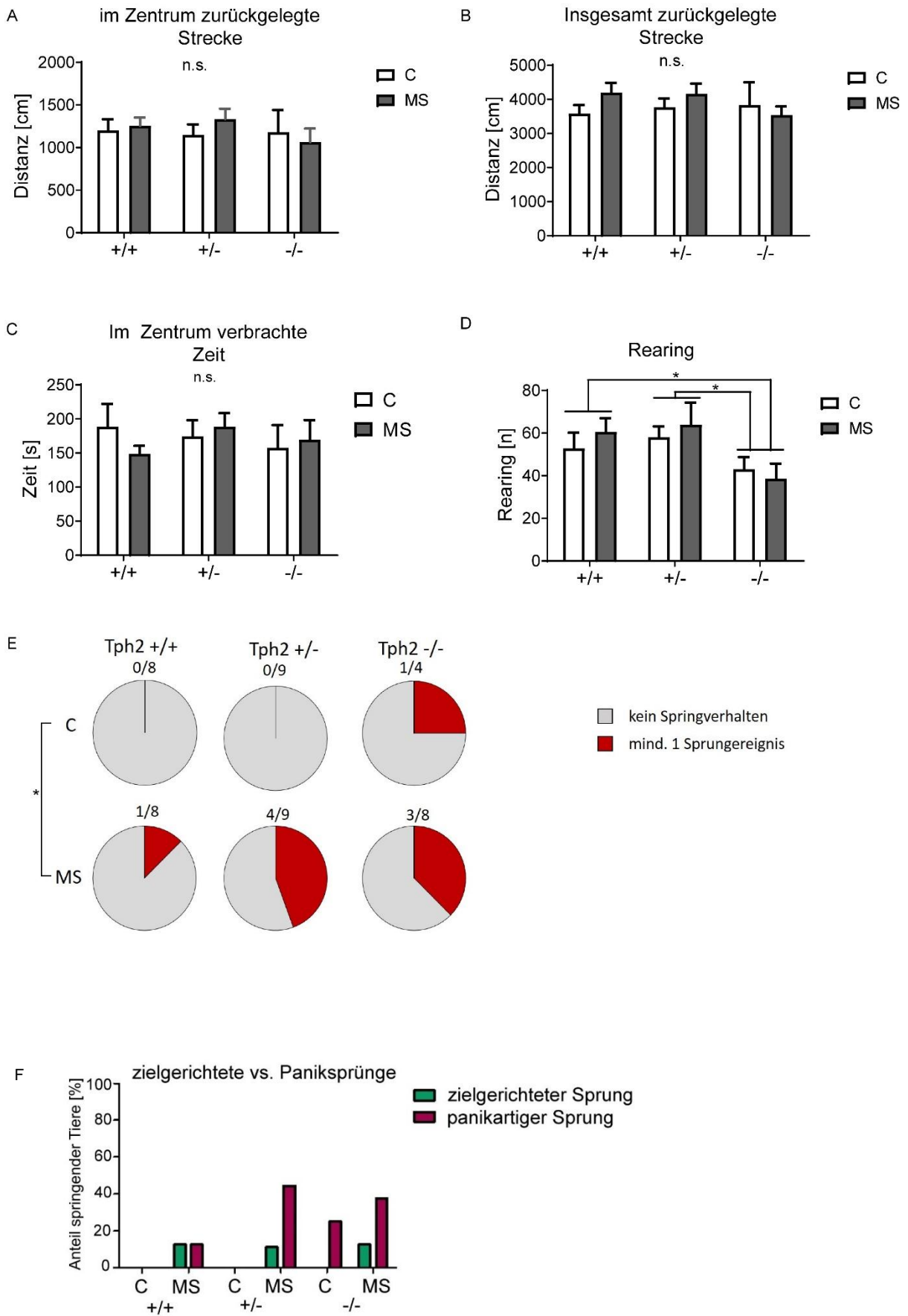


Abb. 14: **Angstbezogenes Verhalten im OF-Test.** Weder Tph2-Defizienz noch MS zeigten einen Effekt auf (A) die im Zentrum zurückgelegte Distanz [cm] (B) die insgesamt zurückgelegte Distanz [cm] und (C) die im Zentrum verbrachte Zeit [s]. (D) Homozygote Tph2-Defizienz führte zu einem verringerten Auftreten von Aufstellen auf die Hinterbeine ($p < 0,020$) (E) MS erhöhte den Anteil der Tiere, die Sprünge (in Rot dargestellt) zeigten ($p = 0,030$). Dieser Effekt ist am deutlichsten in Tph2 +/- Tieren. Die Tortendiagramme zeigen den Anteil an Tieren in Prozent, die pro Gruppe gesprungen sind (F) Anteil der Tiere in Prozent, die „zielgerichtete Sprünge“ (in Grün dargestellt) vs. „Paniksprünge“ (in Lila dargestellt) aufwiesen * $p < 0,050$, n. s. = nicht signifikant (Post hoc: Mann-Whitney U). Säulen zeigen Gruppenmittelwerte \pm Standardfehler (n = 4–9/Gruppe).

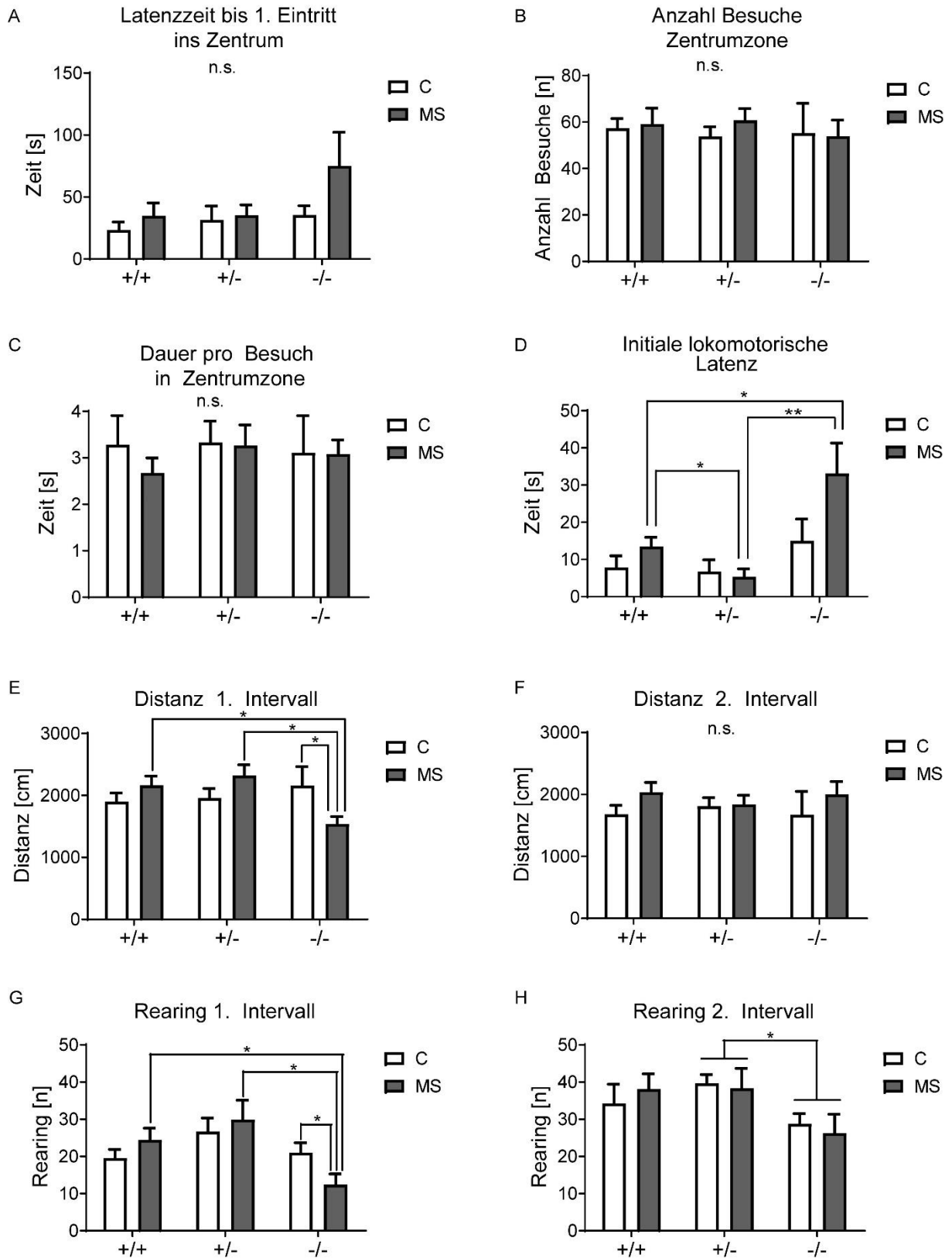
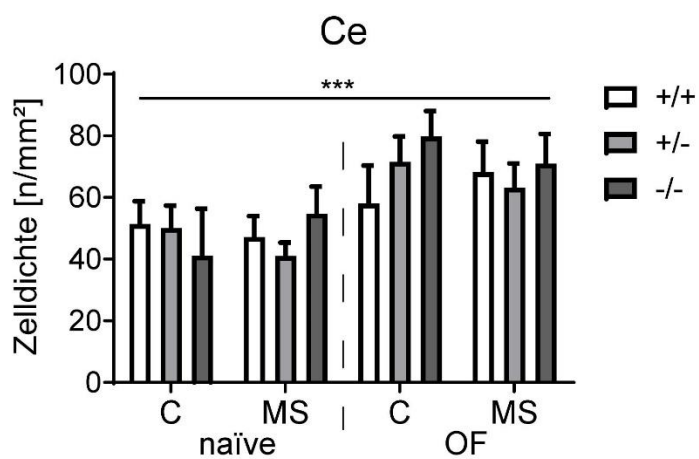
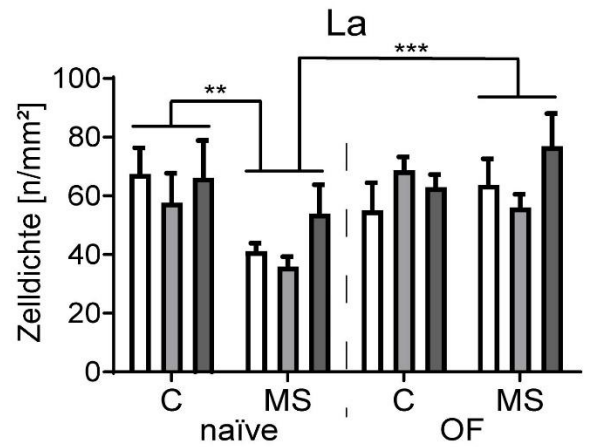
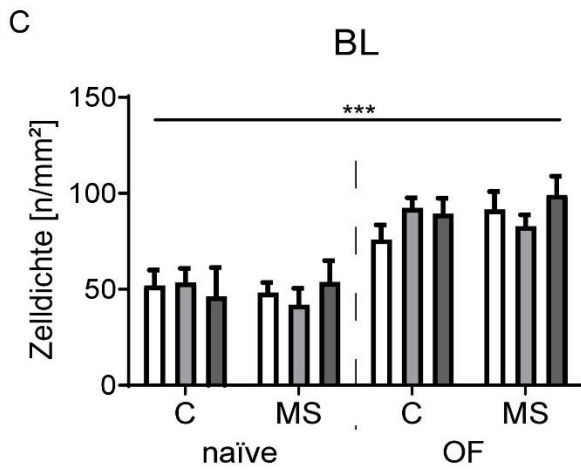
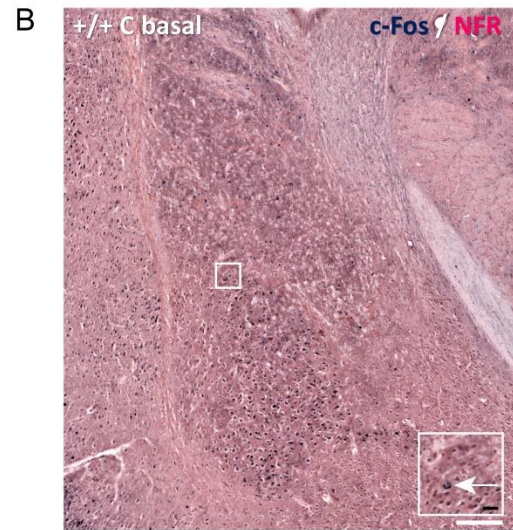
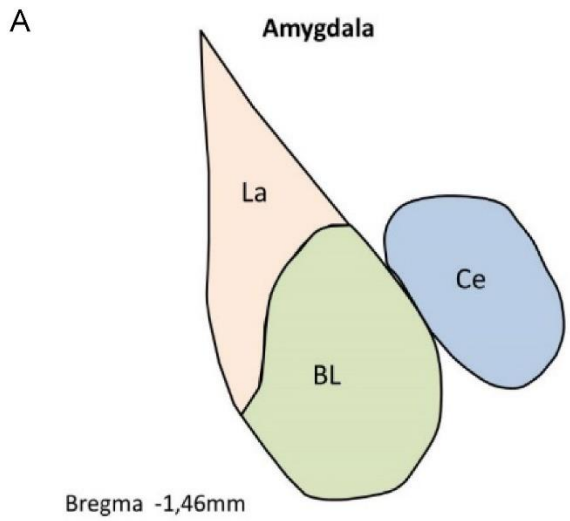
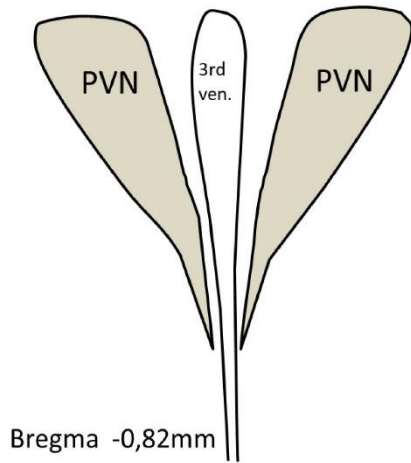


Abb. 15: **Ausgewählte angstbezogene Verhaltensparameter im OF-Test** (A) Weder die Latenz bis zum ersten Besuch des Zentrums, noch (B) die Anzahl an Besuchen des Zentrums, noch (C) die Zeit, die pro Besuch im Zentrum verbracht wurde waren von genetischer Tph2 Inaktivierung, MS oder ihrer Interaktion beeinflusst. (D) Tph2 -/- Tiere, die MS erfahren hatten, zeigten eine längere initiale lokomotorische Latenz im Vergleich zu Tph2+/+ und Tph2+/- Tieren derselben Gruppe ($p < 0,050$). Tph2 +/- Tiere, die MS erfahren hatten, wiesen die kürzeste lokomotorische Latenz auf ($p < 0,020$). (E) Während des ersten Intervalls legten Tph2-/- Mäuse, die MS Exposition erfahren hatten, eine geringe Strecke zurück als Tph2 +/- ($p = 0,012$) oder Tph2 +/+ ($p = 0,012$) Tiere der gleichen Kondition. MS reduzierte die Distanz, die Tph2 -/- Tiere zurücklegten ($p = 0,027$). (F) Dieser Effekt zeigte sich nicht im zweiten Testintervall. (G) Im ersten Intervall konnte ein MS x Tph2 Effekt ($p = 0,035$) gezeigt werden, mit weniger häufigem Aufstellen auf die Hinterbeine in Tph2 -/- MS im Vergleich zu Tph2 +/+ MS ($p = 0,011$) und Tph2 +/- MS ($p = 0,018$) Tieren, wobei MS die Aufstellfrequenz nur in Tph2 -/- Mäusen reduzierte ($p = 0,050$). (H) Im zweiten Intervall stellten sich Tph2 -/- Mäuse seltener auf die Hinterbeine als Tph2 +/- Mäuse ($p = 0,010$), unabhängig von der Exposition gegenüber MS ($p = 0,028$). Säulen zeigen Gruppenmittelwerte \pm Standardfehler ($n = 4-9$ /Gruppe). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, n.s. = nicht signifikant (Post hoc: Mann-Whitney U).

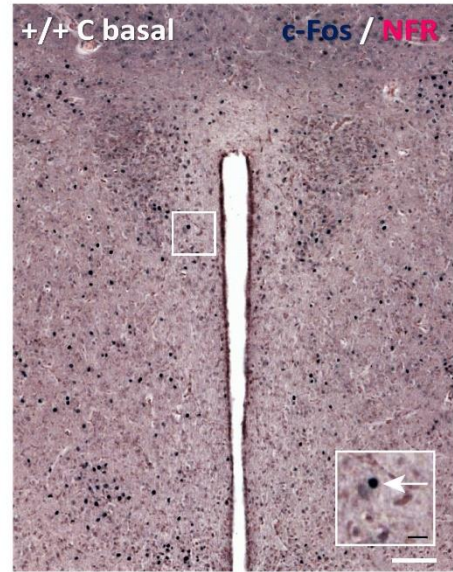
Die Auswertung der c-Fos-Immunhistochemie zeigte einen generellen Effekt des OF-Tests auf die neuronale Aktivierung im BL ($F(1,76) = 59,2; p < 0,001$), Ce ($F(1,76) = 17,3; p < 0,001$) und PVN ($F(1,75) = 71,7; p < 0,001$), wobei Tiere, die dem OF-Test ausgesetzt waren, höhere Dichten an c-Fos+ Zellen zeigten als verhaltensnaive Mäuse (Abb. 16 C und F). Außerdem konnte eine spezifische Aktivierung des La ($F(1,76) = 6,5; p = 0,013$) beobachtet werden. In verhaltensnaiven MS Tieren war die c-Fos+ Zelldichte verringert im Vergleich zu verhaltensnaiven, nichtgestressten Kontrolltieren ($p = 0,008$). Die Exposition gegenüber dem OF-Test steigerte die Dichte an c-Fos+ Zellen in diesen Tieren ($p = 0,001$), während sich die c-Fos+ Zelldichte in nichtgestressten Kontrolltieren nicht verändert zeigte. Im VLPAG zeigte sich die Dichte an c-Fos+ Zellen in Abhängigkeit von einer 3-fach Interaktion zwischen Genotyp, MS und OF-Test im Erwachsenenalter beeinflusst ($F(2,72) = 3,2; p = 0,049$) (Abb. 17 C). Die Testung im OF erhöhte die Dichte an c-Fos+ Zellen nur in Tph2 +/- Tieren der Kontroll- ($p < 0,001$) und MS-Gruppe ($p = 0,004$), sowie in Tph2 -/- Tieren der Kontrollgruppe ($p = 0,002$) im Vergleich zu den entsprechenden verhaltensnaiven Tieren, jedoch nicht in gestressten Tph2 -/- oder wildtypischen Tieren der gestressten oder ungestressten Gruppe. Eine im DPLAG gefundene 3-fach Interaktion ($F(2,72) = 4,3; p = 0,018$) zeigte hingegen keine signifikanten Effekte in den nachfolgenden Post hoc Vergleichen.



D



E



F

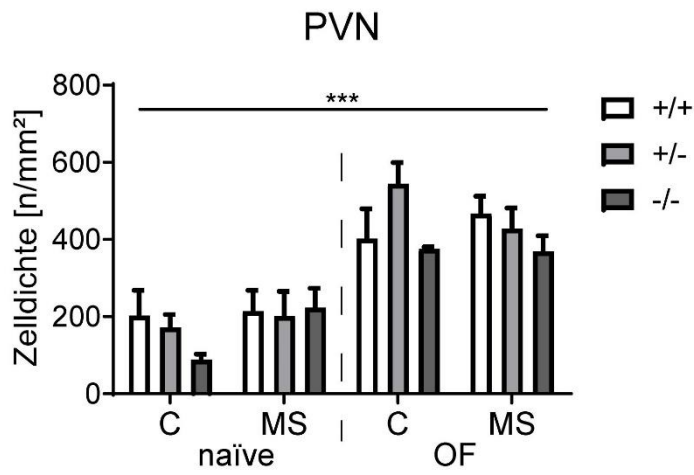
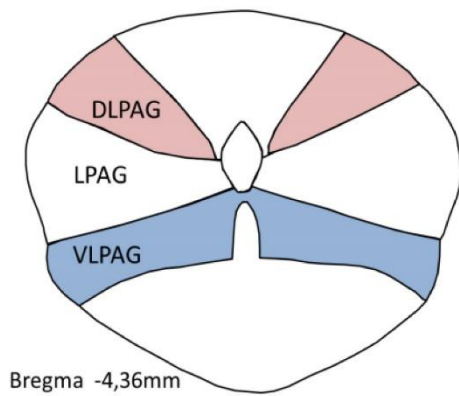


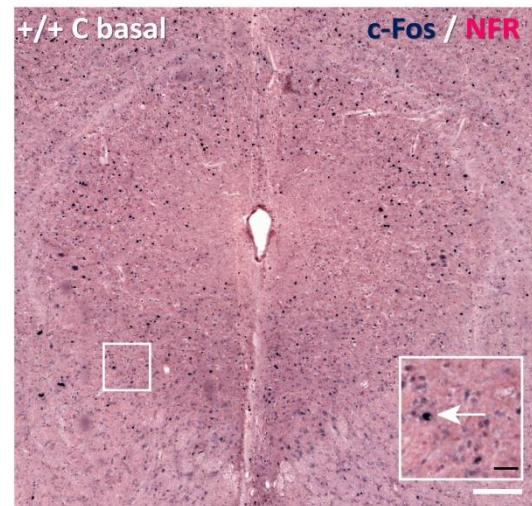
Abb. 16: Neuronale Aktivierung in Amygdala und PVN nach OF-Testung anhand der Dichte von c-Fos+ Zellen

(A) und (D) Anatomische Schemazeichnungen, die die Unterkerne von Amygdala (A) und den PVN (D) darstellen. (B) und (E) Repräsentative histologische Schnitte, die c-Fos-Immunhistochemie mit Nuclear Fast Red (NFR) Gegenfärbung in der Amygdala (Bregma -1,5 mm) (B) und dem PVN (Bregma - 0,8 mm) (E) zeigen. Weißer Größenbalken = 250 μ m. Einsätze zeigen höhere Vergrößerung, Pfeile zeigen auf c-Fos+ Neurone (schwarzer Größenbalken = 50 μ m). (C) OF Exposition führt zu einer generellen Aktivierung der basolateralen (BL) und zentralen (Ce) Amygdala, in der der lateralen Amygdala (La) zeigt sich eine neuronale Aktivierung in Abhängigkeit von der Exposition gegenüber MS ($p < 0,020$). (F) Die OF Exposition erhöht die generelle neuronale Aktivierung im PVN ($p < 0,001$), während MS und Tph2 keinen Effekt auf die OF-abhängige neuronale Aktivierung zeigen. Säulen zeigen Gruppenmittelwerte \pm Standardfehler ($n = 4-9$ /Gruppe). ** $p < 0,010$ und *** $p < 0,001$ (Post hoc: t-test, Bonferroni).

A



B



C

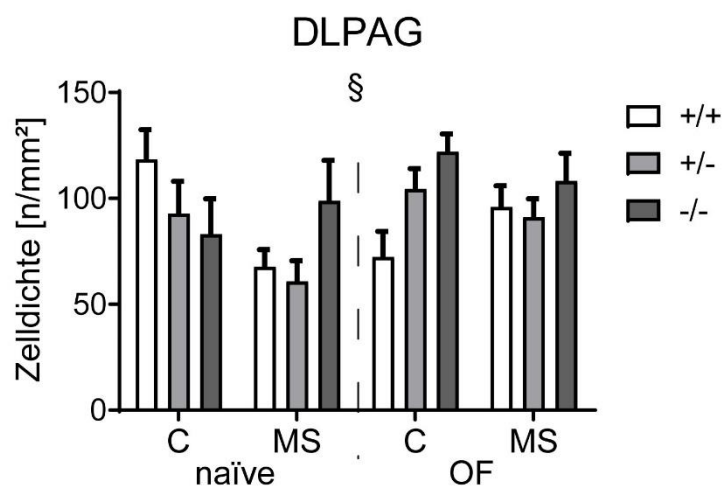
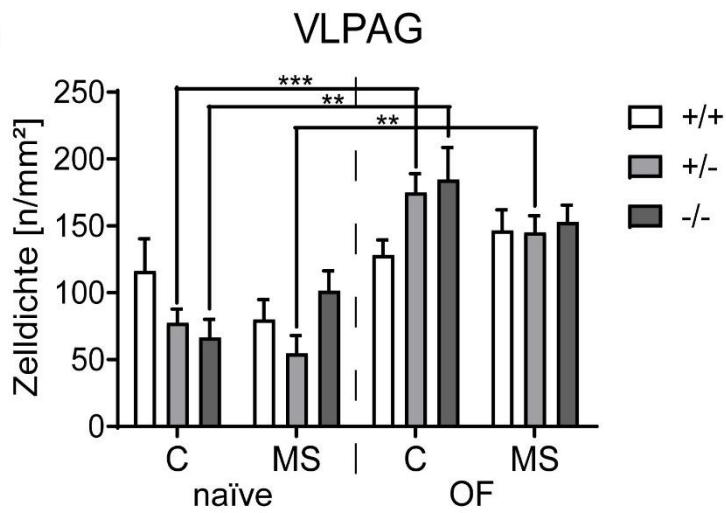


Abb. 17: **Neuronale Aktivierung in ventrolateralem (VLPAG) und dorsolateralem (DLPAG) Periaquäduktalen Höhlengrau nach OF-Testung anhand der Dichte von c-Fos+ Zellen.** (A) Anatomische Schemazeichnung des Periaquäduktalen Höhlengraus. (B) Repräsentativer histologischer Schnitt, der c-Fos-Immunhistochemie mit Nuclear Fast Red (NFR) Gegenfärbung im PAG zeigt (Bregma -4,4 mm). Weißer Größenbalken = 250 μm . Einsätze zeigen höhere Vergrößerung, Pfeile zeigen auf c-Fos+ Neurone (schwarzer Größenbalken = 50 μm). (C) OF-Exposition führt zu einer Genotyp x Umwelt x Test-abhängigen neuronalen Aktivierung in DLPAG und VLPAG ($p < 0,050$). Säulen zeigen Gruppenmittelwerte \pm Standardfehler ($n = 4\text{--}9/\text{Gruppe}$). ** $p < 0,010$ und *** $p < 0,001$ (Post hoc: t -test, Bonferroni), § 3-fach Genotyp x Umwelt x Test-Interaktion, $p = 0,018$ (3-way ANOVA).

6 Diskussion

6.1 Interpretation der Ergebnisse

Das Ziel dieser Studie war es, die Effekte des Zusammenwirkens von funktionellen Defiziten des serotonergen Systems und frühen negativen Lebenserfahrungen auf Angstverhalten zu untersuchen. Im Rahmen dieser Studie konnten einige Unterschiede im Verhalten zwischen den Tph2-Genotypen in Abhängigkeit von der Exposition gegenüber postnatalem Stress beobachtet werden. Darüber hinaus konnten verschiedene testspezifische und Tph2-Genotyp- bzw. MS-abhängige neuronale Aktivierungsmuster in wichtigen Regionen des Angst-Netzwerks mithilfe der immunhistochemischen Darstellung des „Immediate early“ Gens c-Fos identifiziert werden.

Wie im einführenden theoretischen Teil erörtert, brachten Studien, die die Effekte einer konstitutiven 5-HT-Depletion auf Angstverhalten untersuchten, teilweise widersprüchliche und inkonsistente Ergebnisse hervor (Mosienko et al., 2015), wobei die Datenlage insgesamt am ehesten auf eine Abnahme von angeborenem Angstverhalten sowie eine gesteigerte Expression von Furchtverhalten hinweist (Mosienko et al., 2012; Waider et al., 2017). Partiiell 5-HT-defiziente Tiere, wie beispielsweise Tiere mit einem heterozygoten monoallelischen Tph2-Knockout, zeigten zumeist kein signifikant verändertes Angstverhalten im Vergleich zu wildtypischen Tieren (Mosienko et al., 2014). Auch für MS, das in dieser Studie verwendete ELS-Paradigma, konnten in der Vergangenheit Auswirkungen auf Angstverhalten gezeigt werden (Wigger & Neumann, 1999; Kalinichev et al., 2002), wobei sich auch hier teilweise widersprüchliche Ergebnisse ergaben (Millstein & Holmes, 2007; Savignac et al., 2011). Auf einige Faktoren, die für diese widersprüchlichen Ergebnisse verantwortlich sein könnten, wie das verwendete Stressparadigma, die Dauer der Stressexposition, die Frequenz der Stressapplikation, den Zeitpunkt der Stressexposition innerhalb der Entwicklung, die Intensität und Valenz des Stressors, Unterschiede im genetischen Hintergrund sowie geschlechts- und speziesspezifische Unterschiede, ist im einleitenden theoretischen Teil eingegangen worden. Ein weiterer wichtiger Faktor, der die Effekte von MS modulieren kann, stellt das mütterliche Verhalten sowie dessen Interaktion mit MS (Own & Patel, 2013) dar, welches durch genetische Faktoren und Lebensereignisse (Meaney, 2001) beeinflusst werden kann. Wie im Abschnitt 1.4. erläutert, spielen geschlechtsspezifische Unterschiede an verschiedenen Stellschrauben eine für Stressregulation und Angstverhalten wichtige Rolle und beeinflussen die Auswirkungen von ELS auf die Jungtiere. So konnte u.a. gezeigt werden, dass die pränatale Exposition gegenüber dem Glucocorticoid Dexamethason in weiblichen, jedoch nicht in männlichen Mäusen, zu einer verringerten Tph2 Expression, einhergehend mit gesteigertem Angstverhalten im Erwachsenenalter, führt (Hiroi et al., 2016). Das bedeutet, dass das Geschlecht

einen vermittelnden Faktor für die Wechselwirkung zwischen der frühen Exposition gegenüber Stresshormonen bzw. Stress und der Entwicklung des serotonergen Systems darstellt, was einen bedeutsamen Mechanismus für die Pathogenese von Angsterkrankungen bei Frauen darstellen kann. Neben der Vermittlung geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Entwicklung des serotonergen Systems, können Geschlechtshormone auch direkte regulatorische Wirkungen auf die Funktion des serotonergen Systems vermitteln. So führt beispielsweise eine systemische Östrogenverabreichung über ER β vermittelt zu einer gesteigerten Tph2 Expression in bestimmten Subregionen der DR, was zudem mit einer verringerten Präsentation von Angstverhalten einhergeht (Donner & Handa, 2009; Hiroi et al., 2006; Hiroi & Neumaier, 2006; Hiroi 2016). Diese Tph2-abhängige anxiolytische Wirkung von Östrogenen könnte erklären, warum in unserer Studie Angstverhalten in stressnaiven Mäusen nur bei kompletter Tph2-Defizienz gefunden werden konnte. Im Einklang hiermit konnte eine vorherige Arbeit aus unserer Gruppe zeigen, dass Tph2 $-/-$ Weibchen, im Gegensatz zu Tph2 $-/-$ Männchen, gesteigertes Angstverhalten im Sinne einer verstärkten lokomotorischen Inhibition in einer neuen Umgebung aufweisen, womöglich, da durch den Mangel an 5-HT die 5-HT vermittelte anxiolytische Wirkung von Östrogenen weniger zum Tragen kommt (Gutknecht et al., 2015). Diese Hypothese steht allerdings im Gegensatz zu anderen Studien, in denen die Aktivierung der kaudalen DR mit gesteigertem Angstverhalten in Zusammenhang gebracht und anhand derer ein anxiogener Effekt von 5-HT postuliert wurde (Paul & Lowry, 2013). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte das Vorhandensein weiterer modulierender Faktoren, wie beispielsweise eine gleichzeitige Ausschüttung verschiedener Neurotransmitter aus den aktivierten 5-HT Neuronen der DR, darstellen, worauf später näher eingegangen werden wird.

Darüber hinaus weisen die Ergebnisse unserer Studie darauf hin, dass die Effekte der Tph2-Genotypen und die Auswirkungen von MS auf Angstverhalten und neuronale Aktivierungsmuster von der Stressintensität des Verhaltenskontexts abhängig sind, da sich unterschiedliche, teilweise sogar gegensätzliche Effekte, bei Exposition gegenüber dem stärker aversiven, da keine Rückzugsmöglichkeiten bietenden OF-Test im Vergleich zum DLB-Test zeigten.

Im DLB-Test zeigten Tph2 $-/-$ Tiere im Vergleich zu Tph2 $+/+$ und Tph2 $+/-$ Mäusen eine verringerte explorative Aktivität im hellen, aversiven Kompartiment, gemessen an der Rearingfrequenz in diesem Bereich, wobei dieser Effekt interessanterweise nur in Tieren der Kontrollgruppe beobachtet werden konnte. MS konnte die negativen Auswirkungen von Tph2-Defizienz auf exploratives Verhalten aufheben und das Erkundungsverhalten auf das Niveau der anderen Genotypen angleichen. Wie im Methodenteil erörtert, wurde die Verhaltensanalyse über die 10-minütige Testdauer zum einen separat in 2 Intervallen à 5 Minuten und zum anderen über die Gesamttestdauer durchgeführt, um durch die Neuartigkeit des Kontexts bedingte Effekte zu Beginn der Testperiode zu identifizieren.

Wenn man die beiden Intervalle für diesen Verhaltensparameter separat analysiert, zeigt sich ein allgemeiner Effekt von MS während der ersten 5 Minuten, wobei MS die explorative Aktivität von wildtypischen und Tph2 -/- Mäusen steigert. Während dieser Effekt in Tph2 +/+ Mäuse in der Analyse der Gesamttestdauer verschwindet, bleibt er in Tph2 -/- Tieren bestehen, was auf durch 5-HT-Defizienz bedingte veränderte Verhaltensweisen bei Exposition gegenüber eines neuartigen, aversiven Verhaltenskontexts hinweist.

Die explorative Aktivität im dunklen, nicht-aversiven Kompartiment, gemessen an der Frequenz des Aufstellens auf die Hinterbeine in diesem Bereich, zeigte sich während des ersten Intervalls sowie über die Gesamttestdauer unbeeinflusst. Jedoch konnte während des zweiten Testintervalls ein MS-Effekt beobachtet werden, der zu einem Anstieg der explorativen Aktivität im dunklen Kompartiment sowohl in hetero- als auch in homozygot Tph2-defizienten Mäusen führte.

Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass MS zum einen das explorative Verhalten 5-HT-defizienter Tiere in einem neuartigen, anxiogenen Kontext, gemessen an der explorativen Aktivität im hellen Kompartiment während des 1. Intervalls, beeinflussen kann, und dass MS zum anderen darüber hinaus auch in 5-HT-defizienten Tieren die von der unmittelbaren Neuheit eines Reizes unabhängige explorative Aktivität in einem weniger anxiogenen Kontext, ermittelt durch die explorative Aktivität im dunklen Kompartiment während des 2. Intervalls, verändern kann.

Zusätzlich zur explorativen Aktivität scheint MS in 5-HT-defizienten Mäusen das Grundniveau ängstlichen Verhaltens zu modifizieren. Der DLB-Test stellt, wie im einführenden theoretischen Teil erläutert, einen ethologischen Verhaltenstest dar, der konfliktbezogenes Angstverhalten evoziert. Dadurch, dass Mäuse in diesem Testparadigma einerseits die Möglichkeit haben, ein neues, aversives, helles Kompartiment zu erkunden, sich andererseits jedoch jederzeit in das sichere, dunkle Kompartiment zurückziehen können, also im Gegensatz zum OF-Test Zeit im hellen Kompartiment verbringen *können*, jedoch nicht *müssen*, kann die Zeit, die in den jeweiligen Kompartimenten verbracht wird, als Maß für das basale Sicherheits- vs. Erkundungsbedürfnis einer Maus gewertet werden. Hierbei ist wiederum die Analyse der Verhaltensparameter in zwei Intervallen sinnvoll, da das Verhalten zu Beginn des Tests durch initiale, durch die Neuartigkeit des Kontexts bedingte Verhaltensweisen überlagert sein kann, während das zweite Intervall die natürliche Präferenz einer Maus für die jeweiligen Kompartimente nach initialer Adaptation besser widerspiegelt. Hierbei zeigte sich, dass die Exposition gegenüber MS die Zeitdauer, die Mäuse während des 2. Intervalls im hellen Kompartiment verbringen, beeinflusst, wobei MS die im hellen Kompartiment verbrachte Zeit verlängert. In homozygot Tph2-defizienten Mäusen hebt MS die im Vergleich zu den anderen Genotypen reduzierte Zeit, die Tph2-/- Mäuse im hellen Kompartiment verbringen, auf ein anderen Genotypen vergleichbares Niveau an. MS scheint also in 5-HT-defizienten Mäusen sowohl die

Bewertung von neuartigen Kontexten und die explorative Aktivität, als auch das natürliche Grundniveau an Ängstlichkeit zu beeinflussen.

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass homo- und heterozygot Tph2-defiziente Tiere, die MS unterzogen wurden, während ihres ersten Besuchs im hellen Kompartiment dort mehr Zeit verbrachten als ihre wildtypischen Artgenossen. Bei den Tieren der Kontrollgruppe, welche kein MS erfahren hatten, zeigte sich dieser Parameter nur bei homozygot Tph2-defizienten Tieren verlängert.

Die Latenzzeit, bis die Tiere das helle Kompartiment erstmals betraten, unterschied sich überraschenderweise nicht signifikant zwischen den Gruppen. Auch die initiale lokomotorische Latenz, gemessen an der Zeit, bis ein Tier zum ersten Mal die Position aller vier Pfoten verändert hat, zeigte sich nicht unterschiedlich zwischen den Gruppen, was angesichts der Tatsache, dass der Test im dunklen, nicht-aversiven Kompartiment begann, interessant ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass MS in Tph2 -/- Tieren sowohl einen Effekt auf die explorative Aktivität, als auch die Bewertung neuartiger Verhaltenskontexte sowie das Grundniveau an Ängstlichkeit zeigt, während in wildtypischen Tieren v.a. die Bewertung neuer Umgebungen und in Tph2 +/- Mäusen die Aktivität durch MS beeinflusst wurden.

Im OF-Test konnten, im Gegensatz zum DLB-Test, Unterschiede in der initialen lokomotorischen Latenz zwischen den Gruppen beobachtet werden; dieser Verhaltensparameter zeigte sich in Tph2 -/- Mäusen der MS-Gruppe signifikant verlängert. Ein solcher Effekt konnte im DLB-Test nicht gesehen werden, wobei die Mäuse hierbei initial in das dunkle, weniger aversive Kompartiment gesetzt wurden. Dieses Ergebnis unterstützt weiter die Hypothese einer veränderten initialen Bewertung einer neuartigen Umwelt nach MS-Exposition, im Sinne einer erhöhten Einschätzung des Bedrohungsniveaus vor allem in aversiven Kontexten, wobei sich dieser Effekt bevorzugt in Tph2-defizienten Tieren manifestierte.

Ebenfalls für eine gestörte initiale Bewertung von neuen Umweltkontexten spricht die Tatsache, dass Tph2-/- Tiere, die MS erfahren hatten, während des ersten Testintervalls, in das noch Effekte der initialen Verhaltensinhibition einfließen, eine reduzierte explorative Aktivität aufwiesen, wohingegen dieser Effekt im 2. Testintervall nicht mehr beobachtet werden kann.

Diese Ergebnisse weisen im Gegensatz zu den im DLB-Test gewonnenen Daten darauf hin, dass in einem unentrinnbaren und eindeutig aversiven Kontext wie dem OF-Test, die Kombination aus MS und 5-HT-Defizienz die initiale Bewertung einer neuen Umwelt als potentiell bedrohlich aggraviert, was mit verstärkter Verhaltensinhibition einhergeht, während in dem weniger eindeutig aversiven und mehr auf konfliktärer Angst basierendem DLB-Test die Exposition gegenüber MS die durch 5-HT-Defizienz bedingte Verhaltensinhibition auf ein normales Niveau zurückbringen bzw. angleichen konnte.

Ein Mangel an gehirnspezifischem 5-HT führte im OF-Test zu keinen Verhaltensänderungen in Tieren der Kontrollgruppe, welche keine MS-Exposition erfahren hatten. Im Gegensatz dazu wiesen 5-HT-defiziente Tph2 +/- und Tph2 -/- Mäuse nach MS-Exposition während der zweiten Hälfte der Testperiode panikartiges Fluchtverhalten auf, wobei der Effekt in Tph2 +/- Tieren, wo 0 von 9 Tieren aus der Kontrollgruppe, jedoch 4 von 9 Tieren aus der Stressgruppe panikartige Sprünge zeigten, am ausgeprägtesten zu sein schien. Wenn weiter zwischen „zielgerichteten Sprüngen“ und „Paniksprüngen“ differenziert wurde, konnte festgestellt werden, dass der Anteil an Tieren, die „Paniksprünge“ zeigten, höher war als der Anteil der Tiere, die „zielgerichtete Sprünge“ zeigten. Ferner traten bei 100% der Tiere, die zielgerichtete Sprünge gezeigt hatten, im Verlauf auch „Paniksprünge“ auf, was darauf hinweisen könnte, dass zielgerichtete Sprünge, auch wenn sie in anderen Kontexten, wie später bei den Ergebnissen des DLB-Tests diskutiert, eine durchaus normale Verhaltensstrategie darstellen können, im aversiven Kontext nicht zielführend oder sogar maladaptiv sein könnten. Interessanterweise zeigte sich der stärkste Effekt von MS auf 5-HT-defiziente Tiere in den heterozygoten Tieren. Eine Studie unserer Gruppe konnte zeigen, dass homozygot Tph2-defiziente Mäuse eine Reduktion GABAerger Neurone in BL und La aufweisen, wohingegen die Anzahl GABAerger Neurone in der Amygdala heterozygoter Tph2-defizienter Mäuse vermehrt war (Waider et al., 2012). Im Einklang mit der Deakin-Graeff Hypothese wird angenommen, dass bei Exposition gegenüber einem Angstreiz eine Aktivierung des Ce vermittelt über CRH+ Projektionen in der DRVL/VLPAG, zu einer Aktivierung serotonerger Neurone in dieser Region führt (Peyron et al., 1998; Rizvi et al., 1991; Paul et al., 2014), welche wiederum in den DPAG projizieren und dort Panikverhalten inhibieren. Es wäre möglich, dass die vermehrte Anzahl GABAerger Neurone im BL von Tph2 +/- Tieren, zu einer verminderten Aktivierung des Ce durch den BL führen könnte, was eine verringerte Aktivierung der serotonergen Neurone der DRVL/VLPAG durch den Ce zur Folge haben könnte. Wenn die serotonergen Neurone der DRVL/VLPAG, die aufgrund des heterozygoten Tph2-Mangels ohnehin bereits weniger 5-HT produzieren, weniger aktiv wären, könnte dies zu einer verringerten Wirksamkeit des anti-panischen serotonergen DRVL/VLPAG -> DPAG-Pathways führen, wodurch panikartiges Verhalten weniger wirksam begrenzt werden könnte. Da Tph2 +/- Tiere der Kontrollgruppe im OF-Test kein Sprungverhalten zeigten, scheint es, dass die serotonerge Inhibierung des DPAGs durch die DRVL/VLPAG trotz reduzierter 5-HT-Synthesekapazität in Tph2 +/- Tieren, die kein ELS erlebt haben, noch ausreichend ist. Die Exposition gegenüber MS scheint diese Kompensation hingegen nicht mehr möglich zu machen, was gesteigertes panikartiges Verhalten begünstigen könnte. Auf mögliche Mechanismen hierfür wird im Verlauf näher eingegangen.

Auch im DLB-Test konnte Sprungverhalten beobachtet werden, wobei im hellen, aversiven Kompartiment v.a. Tph2-/- Mäuse, die postnatal MS unterzogen waren, sprangen. Wenn zwischen „zielgerichteten Sprüngen“ und „Paniksprüngen“ im dunklen vs. hellen Kompartiment unterschieden

wurde, konnten verschiedene interessante Beobachtungen gemacht werden: im dunklen, „sicheren“ Kompartiment traten „zielgerichtete Sprünge“ in einem gewissen Ausmaß über die meisten Gruppen hinweg auf, und ihr Auftreten war in weniger als der Hälfte der Fälle von „Paniksprüngen“ im weiteren Verlauf des Tests gefolgt, wobei 75% derjenigen Tiere, die nach zielgerichteten Sprünge auch „Paniksprünge“ vollführten, Tph2 -/- Mäuse waren. Im aversiven, hellen Kompartiment traten „zielgerichtete Sprünge“ deutlich seltener auf und wenn sie auftraten, waren sie, vergleichbar mit den Daten aus dem OF-Test, in 100% der Fälle von „Paniksprüngen“ im weiteren Verlauf des Tests gefolgt. Ein großer Anteil von 75% der Tph2 -/- Mäuse, die MS-Exposition erfahren hatten, vollführte mindestens einen „Paniksprung“. Trotz der kleinen Gruppengröße könnten diese Ergebnisse Folgendes nahelegen: (1) „zielgerichtete Sprünge“ könnten im dunklen Kompartiment einen aktiven Bewältigungsversuch in einer Situation darstellen, die als neu, jedoch nicht als akut aversiv und unmittelbar bedrohlich wahrgenommen wird, wofür auch sprechen könnte, dass dieses Verhalten über fast alle Gruppen hinweg in einem gewissen Ausmaß auftrat und meist nicht, in wildtypischen Mäusen sogar nie, von „Paniksprüngen“ gefolgt war. (2) Im hellen, aversiven Kompartiment traten „zielgerichtete Sprünge“ seltener als im dunklen Kompartiment auf, und wenn sie auftraten, waren sie, ähnlich wie im OF, immer auch von „Paniksprüngen“ gefolgt. Dies suggeriert, dass das aversive, hell ausgeleuchtete Kompartiment der DLB, vergleichbar mit dem OF, eher unkoordinierte panikartige Sätze als koordinierte, aufwärts gerichtete Sprünge mit dem Ziel, der Arena zu entkommen, befördert. Dieser Effekt scheint besonders ausgeprägt in Tph2 -/- Mäusen zu sein, die gegenüber frühem Stress exponiert waren, was auf eine Gen x Umwelt-Interaktion hinweisen könnte. Tph2 +/- Mäuse der MS-Gruppe, welche im OF den größten Anteil an Tieren mit Sprungverhalten darstellten, zeigten im hellen Kompartiment der DLB interessanterweise kein Sprungverhalten. Nachdem die DLB einen anderen und insgesamt weniger aversiven Reiz darstellt als das OF, insofern das helle Kompartiment der DLB zwar vergleichbar hell wie das OF ist, jedoch gleichzeitig auch die ständige Rückzugsmöglichkeit in das dunkle Kompartiment beinhaltet, kann man für Tph2 +/- MS-Mäuse annehmen, dass panikartiges Verhalten durch eine Kombination von partieller 5-HT-Defizienz und ELS bedingt wird, allerdings nur in einem unentrinnbaren und stark aversiven Kontext. In einem uneindeutigen oder weniger aversiven Kontext scheint panikartiges Verhalten trotz partieller 5-HT-Defizienz und der Exposition gegenüber frühem Stress durch das panikinhibierende System ausreichend begrenzt zu werden.

Insgesamt wird Sprungverhalten im Kontext von unbekanntem, potentiell bedrohlichen Umweltbedingungen als Fluchtverhalten gewertet (Carvalho-Netto et al., 2006; Carvalho-Netto et al., 2007). Wenn Nagetiere mit Reizen oder Umgebungen, die ein Gefahrenpotential mit sich bringen könnten, konfrontiert sind, werden meist konservierte Verhaltensstrategien aktiviert, die das Ziel verfolgen, das Überleben des Individuums zu sichern (Fanselow, 1994). Welche Strategie hierbei in welcher Situation angewandt wird, ist abhängig von dem eingeschätzten Ausmaß der Bedrohung

(Deakin & Graeff, 1991) sowie begleitenden Umwelt- und individuenabhängigen Faktoren (Carvalho-Netto et al., 2006). Eine andere Hypothese nimmt an, dass es verschiedene Verhaltensstrategien und Verhaltensstile im Umgang mit bedrohlichen Situationen gibt und jeder Organismus ein individuelles Spektrum an Copingstrategien besitzt. In potentiell gefährlichen Situationen wird eine Verhaltensweise aus dem einem Individuum eigenen Repertoire an Copingstrategien angewandt, sodass die gezeigte Verhaltensantwort primär von den individuellen Bewältigungsstilen eines Tieres bestimmt wird (Koolhaas et al., 1999; Koolhaas et al., 2007). Sowohl für die Hypothese einer primär situations- und stressorabhängigen, als auch für die Hypothese einer primär individuumabhängigen Auswahl der angewandten Copingstrategie kann der regulatorische Effekt von 5-HT auf die Verhaltensantwort eine wichtige Rolle spielen. Wie im einführenden theoretischen Teil erläutert, stehen das serotonerge System und die Stressachse in einem engen Verhältnis gegenseitiger Regulation. Die Bedeutung dieser Interaktion wird durch die Beobachtung, dass 5-HT-defiziente Tiere im Rahmen dieser Studie dysreguliertes Fluchtverhalten im Sinne von panikartigen Sprüngen zeigen, und dies durch die Exposition gegenüber frühem Stress zusätzlich aggraviert werden kann, weiter unterstrichen. Es scheint, dass die Trennung vom Muttertier in frühen postnatalen Stadien das Verhaltensrepertoire in Abhängigkeit vom Tph2-Genotyp hin zu proaktiveren, mehr fluchtorientierten Verhaltensstrategien verschieben kann. Damit im Einklang konnten Studien zeigen, dass ELS die Vulnerabilität gegenüber panikauslösenden Substanzen wie CO₂ erhöht, wobei vor allem weibliche Individuen betroffen sind (Dumont et al., 2011; Genest et al., 2004), was ebenfalls auf einen panikbegünstigenden Effekt von ELS hinweist. Hierbei gilt es zu bedenken, dass Verhaltensstrategien per se nicht adaptiv oder maladaptiv sind, sondern dass die Angepasstheit eines Verhaltens an die Anforderungen einer spezifischen Situation im Sinne der „Match-Mismatch-Hypothese“ von dem Kontext, in dem der jeweilige Copingstil gezeigt wird, abhängig ist (Nederhof & Schmidt, 2012). Verhaltensweisen, die in einem Kontext maladaptiv sind, können in einem anderen Kontext dazu beitragen, das Überleben des Individuums zu sichern. So könnten zielgerichtete Sprünge im dunklen Kompartiment der DLB, die über nahezu alle Gruppen hinweg auftraten und meistens nicht von Paniksprüngen gefolgt waren, durchaus ein adaptives Verhalten im Sinne eines Versuchs, der Arena durch einen gezielten Sprung zu entkommen, darstellen, wobei sich die Tiere nach Misslingen dieser Strategie anderen, potentiell besser angepassten Copingstrategien, zuwandten. Im Gegensatz hierzu mündete das vorherige Durchführen zielgerichteter Sprünge im hellen Kompartiment der DLB sowie im OF in dieser Studie in 100% der Fälle in überschießendes, panikartiges Sprungverhalten, weshalb es in diesem Kontext ein maladaptive Verhaltensweisen begünstigendes Verhalten darzustellen scheint.

Gemäß der Deakin-Graeff Hypothese kommen 5-HT verschiedene Rollen in der Modulation des Verhaltens von Individuen angesichts aversiver Reize zu, wobei, wie im einführenden theoretischen Teil erläutert, ein panikinhibierendes, ein angstförderndes und ein antidepressives System

unterschieden werden können (Deakin & Graeff, 1991). Das Auftreten von panikartigen Sprüngen bei 5-HT-defizienten Tieren ist im Einklang mit einer verminderten Aktivität des anti-panischen serotonergen Systems in der DRVL/VLPAG zu sehen. Die Tatsache, dass die Exposition gegenüber MS zu einer Aggravation panikartiger Verhaltensweisen in 5-HT-defizienten Tieren führt, erscheint zunächst im Gegensatz zu Studien zu stehen, die nach MS-Exposition in Ratten gesteigerte 5-HT-Synthesekapazitäten in der DRVL, dem Ausgangspunkt des anti-panischen Systems, zeigen konnten (Gardner et al., 2009a), wodurch eine verbesserte serotonerge Inhibition des DLPAG zu erwarten wäre. Allerdings ist davon auszugehen, dass der konstitutive 5-HT-Mangel in den hier verwendeten Tph2-defizienten Mäusen zu kompensatorischen Anpassungsmechanismen führt. So ist beispielsweise bekannt, dass die Expression von 5-HTRs in Tph2-defizienten Mäusen verändert ist. Die anti-panischen Effekte von 5-HT im DLPAG werden über 5-HT_{1A}R und 5-HT_{2A}R vermittelt (Pobbe, 2011; Pobbe & Zangrossi, 2005), weswegen eine mögliche Hypothese wäre, dass veränderte Expressionsmuster von 5-HT_{1A}R und 5-HT_{2A}R im DLPAG in partiell 5-HT-defizienten Mäusen für die Abschwächung der panikinhibierenden Wirkung von 5-HT in dieser Region verantwortlich sein könnten. Ferner ist bekannt, dass stressbedingt erhöhte Corticosteronspiegel über eine transkriptionelle Repression des 5-HT_{1A}R-Promotors zu einer Herunterregulation von 5-HT_{1A}R führen können (Farisse et al., 2000; Fernandes et al., 1997), was ebenfalls ein Mechanismus sein könnte, wie Stress vor dem Hintergrund einer 5-HT-Defizienz eine verringerte serotonerge Inhibition von Panikverhalten in heterozygot Tph2-defizienten Tieren begünstigen könnte. Ein anderer möglicher Mechanismus könnte eine gesteigerte CRH-Expression im Hypothalamus infolge von MS (Nishi et al., 2014) und eine CRH-vermittelte Wirkung auf das PAG (Berrino, 1996) sein.

Das Ergebnis unserer Studie, dass ein 5-HT Mangel zum Auftreten von gesteigertem Angstverhalten im Sinne einer gesteigerten Verhaltensinhibition führt, scheint im Gegensatz zu dem angstfördernden Effekt von 5-HT, den die Deakin-Graeff-Hypothese postuliert, zu stehen. Hier könnten weitere Faktoren, wie die gemeinsame Ausschüttung verschiedener Neurotransmitter, sowie die Tatsache, dass ein konstitutiver und kein akuter 5-HT-Mangel vorliegt, der mit kompensatorischen Anpassungsmechanismen einhergehen kann, von Bedeutung sein. So konnte gezeigt werden, dass der konstitutive Mangel an 5-HT zu einer Veränderung in der Aktivität anderer Neurotransmittersysteme, wie beispielsweise des noradrenergen Systems führt (Gutknecht et al., 2012) und eine Veränderung in der Expression von für Angstverhalten wichtigen Genen verursacht (Mosienko et al., 2014; Mosienko et al., 2015). Ferner wurde diese Studie, im Vergleich zum Großteil der Studien, die die Auswirkungen von MS-Exposition auf Angstverhalten untersuchen, an weiblichen Tieren durchgeführt. Es ist bekannt, dass eine systemische Östrogenverabreichung zu einer gesteigerten Tph2-Expression in bestimmten Subregionen der DR führt, und dies mit einem verringerten Auftreten von Angstverhalten einhergeht (Donner & Handa, 2009; Hiroi et al., 2006; Hiroi & Neumaier, 2009; Hiroi 2016). Eine vorherige Arbeit

aus unserer Gruppe konnte ebenfalls zeigen, das Tph2 $-/-$ Weibchen, im Gegensatz zu Tph2 $-/-$ Männchen, eine gesteigerte lokomotorische Inhibition bei Exposition gegenüber einer unbekanntem Umgebung aufwies, vermutlich da durch den 5-HT-Mangel die durch 5-HT vermittelte anxiolytische Wirkung von Östrogenen weniger stark zum Tragen kommt (Gutknecht et al., 2015). Diese Tph2-abhängige anxiolytische Wirkung von Östrogenen könnte erklären, warum nur weibliche Tiere mit kompletter Tph2-Inaktivierung, jedoch nicht heterozygot Tph2-defiziente Tiere in dieser Studie Angstverhalten zeigten.

Ebenfalls zunächst überraschend erscheint die Beobachtung, dass MS in 5-HT-defizienten Tieren zu einer Absenkung des gesteigerten Angstverhaltens auf normale Niveaus führt, da in den meisten Studien eine angstfördernde Wirkung von MS festgestellt wurde. Allerdings gilt es auch hier zwischen Studien an männlichen und weiblichen Modellorganismen zu unterscheiden. Die Datenlage für Studien an weiblichen Modellorganismen ist insgesamt spärlich und teilweise inkonsistent, allerdings gibt es Hinweise für eine anxiolytische Wirkung von MS auf weibliche Ratten (McIntosh et al., 1999) und Mäuse (Romeo et al., 2003). Interessanterweise zeigten sich die anxiolytischen Effekte von MS in weiblichen Mäusen in der Studie von Romeo et al. (Romeo et al., 2003) nur, wenn die Mäuse in der postovulatorischen Phase getestet wurden, während derer auch die Tiere in der hier vorliegenden Studie getestet wurden. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass ELS in weiblichen Mäusen zu einer verminderten GR-Expression, v.a. im Ce führt, und dass diese Mäuse ein verringertes Angstniveau zeigen (Arnett et al., 2015).

Die Tatsache, dass MS nur in Mäusen mit kompletter 5-HT-Defizienz Angstverhalten reduziert, könnte u.a. durch eine MS-bedingte Veränderung der GABAergen Aktivität im BL bedingt sein. Es ist bekannt, dass Tph2 $-/-$ Mäuse eine verringerte Anzahl GABAerger Neurone im BL aufweisen (Waider et al., 2012) und dass MS zu einer Veränderung in den Verhältnissen GABAerger IN-Subpopulationen im BL führen kann, wobei ausgewählte Subpopulationen in erhöhter Dichte auftreten (Seidel et al., 2008). Die Daten unserer immunhistochemischen Untersuchung geben keinen Hinweis auf derartige Veränderungen im BL, wobei einschränkend gesagt werden muss, dass Unterschiede in der neuronalen Aktivität, welche die Gesamtzahl aller aktivierten Neurone nicht verändern, in der durchgeführten c-Fos immunhistochemischen Färbung nicht abgebildet werden können, weswegen nicht ausgeschlossen ist, dass MS-Exposition zu einer Aktivierung unterschiedlicher neuronaler Subpopulationen im Vergleich zur Kontrollkondition führt. In Zusammenschau mit den immunhistochemischen Daten werden spezifische Veränderungen im PVN als mitursächlich für den Effekt von MS auf Angstverhalten in 5-HT-defizienten Tieren in dieser Studie angenommen, worauf bei der Diskussion der immunhistochemischen Daten näher eingegangen wird.

Zusammenfassend weisen die Verhaltensdaten dieser Studie darauf hin, dass MS-Exposition in weiblichen 5-HT-defizienten Tieren einerseits eine Aggravierung von panikartigem Verhalten, andererseits aber eine Abmilderung von ängstlichen Verhaltensweisen verursacht, sie suggerieren außerdem einen proaktive Verhaltensantworten fördernden Effekt von MS, v.a. vor dem Hintergrund einer 5-HT-Defizienz. Diese vermehrten proaktiven Verhaltensantworten können nach der Match-Mismatch-Hypothese in dem einen Kontext adaptiv (beispielsweise in Situationen, die konfliktäre Angst hervorrufen, wie dem DLB-Test), und in dem anderen Kontext maladaptiv (beispielsweise in stark aversiven, unentrinnbaren Situationen, wie dem OF-Test) sein.

Im nächsten Schritt wurden mittels c-Fos-Immunhistochemie die neurobiologischen Korrelate der beobachteten Verhaltensweisen untersucht. Eine vorherige Arbeit aus unserer Gruppe konnte zeigen, dass panikartige Verhaltensweisen und gesteigerte Furchtantworten in Tph2-defizienten Tieren mit einer Dysfunktion des Amygdala-DR-Netzwerks assoziiert waren (Waider et al., 2017). In dieser Studie fanden wir, dass die Exposition gegenüber dem DLB- sowie dem OF-Test zu einer neuronalen Aktivierung aller Subnuclei der Amygdala führt.

Die neuronale Aktivierung des La unterschied sich testspezifisch, wobei ein allgemeiner Anstieg der neuronalen Aktivität nach Exposition gegenüber dem DLB-Test, sowie eine MS-abhängige Aktivitätssteigerung nach Testung im OF beobachtet werden konnten. Es scheint, dass ein MS-abhängiger, modulatorischer Input zu einer gesteigerten Aktivierung des La unter stark aversiven Bedingungen führt und an der Vermittlung von Panikverhalten beteiligt ist, wohingegen für angstbezogene Verhaltensweisen, die einen weniger starken und unmittelbaren Stressreiz darstellen, diese Form der gesteigerten neuronalen Aktivierung des La nicht erforderlich zu sein scheint. Für eine besondere Rolle des La im Zusammenhang mit Verhaltensantworten in stark aversiven Umgebungen könnte auch sprechen, dass die neuronale Aktivierung des La während des DLB-Tests mit der Rearingfrequenz sowohl im aversiven, hellen, als auch im dunklen Kompartiment korreliert war, wohingegen die Aktivierung von Ce und BL nur mit der Rearingfrequenz im wenig aversiven dunklen Kompartiment korreliert war. Interessanterweise korrelierte die BL-Aktivierung v.a. mit der Rearingfrequenz im dunklen Kompartiment im ersten Intervall und die Ce-Aktivierung v.a. mit der Rearingfrequenz im dunklen Kompartiment im zweiten Intervall. Obwohl für die c-Fos-Aktivierung keine derart genaue zeitliche Auflösung angenommen werden kann, steht diese Beobachtung im Einklang mit einer Rolle des BL v.a. in der Bewertung neuer und potentiell bedrohlicher Reize, sowie einer Rolle des Ce v.a. in der Kontrolle der Ausführung angstbezogener Verhaltensweisen.

Im BL zeigte sich nach Testung im OF eine generelle neuronale Aktivierung über alle Gruppen hinweg, wohingegen die neuronale Aktivierung nach DLB-Exposition genotypspezifisch erfolgte und nur in Tph2+/- Tieren auftrat. Dieses Ergebnis könnte auf das Vorliegen kompensatorischer Mechanismen in

Tph2 +/- Tieren (Waider et al., 2017) innerhalb dieser Region, welcher eine wichtige Rolle in der Regulation von angstbezogenen Verhaltensantworten zukommt (Hale et al., 2008b; Waider et al., 2017), hinweisen, und eine mögliche Erklärung für die Abwesenheit von Angstverhalten in Tieren dieses Genotyps im DLB-Test im Vergleich zu homozygot Tph2-defizienten Tieren darstellen.

In stressvollen Situationen, die zu einer Aktivierung der HHN-Achse führen und mit einer CRH-Ausschüttung einhergehen, kommt CRH ein die Aktivierung des BL begünstigender Effekt zu (Paul et al., 2014), was die verhältnismäßig höhere Aktivierung des BL über alle Genotypen und Konditionen hinweg angesichts des sehr aversiven OF-Tests im Vergleich zum weniger direkt und weniger eindeutig aversiven DLB-Test erklären könnte. Ähnlich wie im La stellen glutamaterge PNs, wie im einführenden theoretischen Teil erläutert, den größten Teil der Neurone im BL dar und projizieren u.a. in den Ce, wo sie an der Vermittlung von Angstverhalten beteiligt sind (Millhouse & DeOlmos, 1983).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen in BL und La zeigte sich eine Aktivierung des Ce sowohl nach dem OF- als auch nach dem DLB-Test, jeweils unabhängig von Genotyp oder Kondition. Dieser Befund ist zunächst überraschend und steht auf den ersten Blick im Gegensatz zu den in der Testung beobachteten Verhaltensweisen, könnte allerdings durch kompensatorische Mechanismen innerhalb von BL und La erklärt werden. Es ist bekannt, dass serotonerge Neurone aus verschiedenen Subnuclei der Raphekerne über eine Vielzahl an 5-HT-Rezeptoren unterschiedliche Neurone des BL innervieren können (Asan et al., 2013), wodurch es wahrscheinlich erscheint, dass MS und Tph2-Genotyp in Abhängigkeit vom Subtyp der serotonergen Neurone, die den La bzw. BL innervieren, unterschiedliche Wirkungen innerhalb dieser Regionen vermitteln. Dafür spricht u.a. der Befund, dass die Verhaltenstestung männlicher erwachsener Ratten im OF zu einer gesteigerten Aktivierung einer Subpopulation von 5-HT Neuronen in der DR, die zum BL projizieren, führt (Hale et al., 2008a). Eine Aktivierung dieser Subpopulation von serotonergen Neuronen durch anxiogene Substrate war nicht nur mit der Präsentation von angstbezogenen Verhaltensweisen (Abrams, 2005; Hale et al., 2010), sondern auch mit der Aktivierung einer Unterpopulation GABAerger Neurone im BL korreliert (Hale et al., 2010), was einen möglichen Mechanismus für eine 5-HT abhängige Modulation von Angstverhalten durch eine Beeinflussung der neuronalen Aktivität im BL darstellen könnte.

Zusammenfassend weist die veränderte La-Aktivität in Tieren der MS-Gruppe nach Testung im OF auf eine Rolle des La als Bestandteil eines Schaltkreises hin, welcher panikbezogene Verhaltensweisen in Abhängigkeit vom Erleben früherer Stresserfahrungen, reguliert. Im Gegensatz hierzu scheint die Amygdalaaktivierung infolge der Exposition gegenüber dem DLB-Test unabhängig von den angstbezogenen Verhaltensweisen, die in Tph2-/- Tieren der Kontrollgruppe beobachtet werden konnten, zu sein. Relativ neue Ergebnisse postulieren einen alternativen Regulationsmechanismus angstbezogener Amygdalenschaltkreise über einen Co-Release des Neurotransmitters Glutamat aus 5-

HT-Terminalen (Sengupta et al., 2017). Die Wirkung serotonerger Neurone auf die basale Amygdala kann, abhängig von Zelltyp und Stimulationsfrequenz, über 5-HT oder Glutamat vermittelt werden (Sengupta et al., 2017), was bedeuten könnte, dass glutamatvermittelten Effekten serotonerger Neurone auf die Amygdala in Abwesenheit von 5-HT eine wichtige Bedeutung in der Regulation emotionalen Verhaltens zukommen könnte. Dies könnte zu den fehlenden Unterschieden im Aktivierungsmuster der Amygdala infolge 5-HT-Defizienz beitragen.

Die neuronale Aktivierung des PVN scheint für den DLB-Test genotypabhängig, und somit durch das Vorhandensein von 5-HT beeinflusst zu sein. Nach OF-Exposition konnte hingegen weder ein Genotyp- noch ein MS-Effekt auf die testinduzierte Aktivierung des PVN gefunden werden. Dies könnte auf eine komplexere Natur des während des weniger eindeutig aversiven DLB-Tests erfahrenen Stresses hinweisen, welcher die Integration zusätzlicher Einflüsse aus Gehirnregionen wie dem Ce und der DR im PVN erforderlich machen könnte (Herman & Cullinan, 1997; Herman et al., 2005; van de Kar, 1997). Hierzu passend konnten serotonerge Synapsen auf CRH-produzierenden Zellen im PVN identifiziert werden (Liposits et al., 1987), ferner führte eine systemische Verabreichung des SSRIs Fluoxetin zu einem signifikanten Anstieg des CRH-Spiegels im hypophysären portalen Plasma (Gibbs & Vale, 1983), was auf eine Rolle von 5-HT in der Modulation der Aktivität CRH-produzierender Neurone im PVN hinweist. Die Testbedingungen im OF könnten hingegen einen unconditionierten Stressor darstellen und die Sekretion von CRH im PVN direkt, anstatt 5-HT vermittelt, stimulieren (Herman & Cullinan, 1997). Im Rahmen von weniger eindeutig aversiven und stärker konfliktbasierten Stressparadigmen könnte 5-HT also wichtig sein, um die CRH-Ausschüttung aus Neuronen des PVN zu modulieren. Ein konstitutiver 5-HT-Mangel könnte so, über eine Beeinflussung der Reaktivität des PVN im Sinne der hier beobachteten fehlenden Aktivierung dieser Region nach Testexposition in komplett 5-HT-defizienten Tieren, für den beobachteten ängstlichen Verhaltensphänotyp der *Tph2*^{-/-} Tiere, im Vergleich zu den *Tph2*^{+/+} und *Tph2*^{+/-} Tieren, im DLB-Test mitverantwortlich sein. Eine andere Erklärung für die verringerte PVN-Aktivität in *Tph2*^{-/-} Tieren bei gleichzeitig verstärkter Präsentation von Angstverhalten könnte eine reduzierte oxytocinerge Aktivität im PVN bei diesem Genotyp sein. Neben den parvozellulären CRH-produzierenden Neuronen gibt es auch magnozellanäre oxytocinerge Neurone im PVN, welche stressdämpfende und anxiolytische Effekte vermitteln (Bowen, 2011; Jurek et al., 2015; Smith et al. 2016). Das oxytocinerge System wird bei Exposition gegenüber stressauslösenden bzw. angstinduzierenden Reizen aktiviert (Onaka & Yagi, 1993; Jezova et al., 1995) und es gibt Hinweise, dass 5-HT die Oxytocinausschüttung modulieren kann (Marazziti et al., 2012). Der Mangel an Serotonin könnte somit durch eine ungenügende Aktivierung des angstdämpfenden oxytocinergen Systems das verstärkte Auftreten ängstlicher Verhaltensweisen in *Tph2*^{-/-} Tieren befördern.

Eine Gehirnregion, die eine besondere Rolle in der Regulation von panikassoziertem Fluchtverhalten zukommt, ist das VLPAG (Paul et al., 2014), welches einen wichtigen Bestandteil des anti-panischen Systems darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass serotonerge Neurone des VLPAG zum DLPAG projizieren und dort panikassoziertes Fluchtverhalten inhibieren. Dieser anti-panische Effekt soll über eine direkte und indirekte inhibitorische Aktivität von 5-HT, zum einen via inhibitorischer 5-HT₁ARs auf glutamatergen Neuronen, zum anderen über exzitatorische 5-HT₂ARs auf GABAergen INs im DLPAG, vermittelt sein (Pobbe, 2011; Pobbe & Zangrossi, 2005).

In dieser Studie konnten in homo- und heterozygot Tph2-defizienten Mäusen, welche MS erfahren hatten, panikassozierte Verhaltensweisen beobachtet werden, welche mit der Abwesenheit bzw. einer Verringerung der serotonergen Innervation des DLPAG aus dem VLPAG zusammenhängen könnten. In Tph2^{-/-} und Tph2^{+/-} Mäusen der Kontrollgruppe konnte eine verstärkte Aktivierung des VLPAG nach OF-Exposition festgestellt werden; dies könnte durch einen durch den konstitutiven 5-HT-Mangel bedingten Entwicklungseffekt auf neuronale Subpopulationen innerhalb angstbezogener Schaltkreise, welche möglicherweise ein Switchen zwischen aktiven und passiven Furchtreaktionen vermitteln, bedingt sein (Tovote et al., 2016). Eine testabhängige Aktivierung des VLPAG konnte in Tph2^{-/-} Mäusen, die MS unterzogen worden waren, hingegen nicht beobachtet werden, was auf einen Einfluss von MS auf für Copingverhalten relevante Mechanismen im VLPAG von komplett 5-HT-defizienten Mäusen hinweisen könnte und für die gesteigerte initiale lokomotorische Latenz in Tph2^{-/-} MS Mäusen mitverantwortlich sein könnte. Es konnte gezeigt werden, dass das VLPAG, sowie Teile der DRVL, die das anti-panische System darstellen, Input von CRH+ Projektionen aus dem Ce erhalten (Paul et al., 2014), was einen möglichen Weg, über den eine MS-abhängige Aktivierung dieser Struktur bei Exposition gegenüber aversiven Reizen erfolgt, darstellen könnte.

Abschließend weist diese Studie darauf hin, dass das Auftreten panikartiger Verhaltensweisen in Weibchen stark mit einer synergistischen Interaktion zwischen 5-HT-Defizienz im Gehirn und Stress während früher Entwicklungsphasen assoziiert ist. MS scheint hierbei möglicherweise über eine veränderte Wahrnehmung der Aversivität des entsprechenden Verhaltenskontexts zu wirken, während eine Interaktion zwischen MS und 5-HT-Defizienz die Reaktivität des VLPAG verändert und hierüber womöglich Einfluss auf panikartige Verhaltensweisen nimmt.

Weiterhin zeigt diese Studie, dass sich angstartige Verhaltensweisen signifikant durch einen Mangel an 5-HT beeinflusst zeigen. Dieser Effekt könnte durch eine verringerte Aktivität des PVN in komplett 5-HT-defizienten Tph2^{-/-} Tieren im Vergleich zu partiell 5-HT-defizienten Tph2^{+/-} und Tph2^{+/+} Tieren bedingt sein.

Darüber hinaus wurden alternative Wege postuliert, die in Abwesenheit von 5-HT die Effekte einer lebenslangen 5-HT-Defizienz sowie die Wirkungen von mütterlichem Trennungstress kompensieren

und die bei Exposition gegenüber akuten aversiven Ereignissen gehirnregionenspezifisch interagieren könnten.

Um tiefere Einblicke in die Funktionsweise dieser Regulationsmechanismen zu erhalten, wäre allerdings eine weitere Charakterisierung der neuronalen Identität der aktivierten Nervenzellen von Nöten.

6.2 Limitationen der Studie

Bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Studie sind einige Einschränkungen zu machen.

Zum einen spielt nicht nur der genetische Hintergrund der Jungtiere, sondern auch der genetische Hintergrund der Muttertiere, welche in dieser Studie eine monoallelische genetische Inaktivierung von Tph2 aufwiesen und somit heterozygot Tph2-defizient waren, eine Rolle in der Vermittlung der Effekte von MS-Exposition auf das Verhalten der Jungtiere. Für diesen Genotypen konnte in vorherigen Studien unserer Gruppe eine gestörte Stressreaktivität gezeigt werden (Gutknecht et al., 2015). Es ist bekannt, dass das mütterliche Verhalten vom genetischen Hintergrund der Muttertiere (Alenina et al., 2009; Angoa-Pérez et al., 2014), sowie Erfahrungen, welche die Mutter gemacht hat (Meaney, 2001) beeinflusst wird. Die Trennung von den Jungtieren führt zu einer stressinduzierten Corticosteronerhöhung in den Muttertieren (Levine et al., 1993), was im Zusammenspiel mit der beschriebenen genetischen Vulnerabilität durch die partielle 5-HT-Defizienz zu verändertem mütterlichen Verhalten führen und somit einen moderierenden Beitrag zu den beobachteten Verhaltenseffekten in den Jungtieren leisten könnte. Der Genotyp der Jungtiere ist ebenfalls ein wichtiger Faktor, der die Vulnerabilität gegenüber den Effekten von Stress moduliert (van den Hove et al., 2011; Sachs et al., 2015), somit könnte eine Interaktion zwischen dem mütterlichen Genotyp, dem mütterlichen Verhalten sowie dem Genotyp der Nachkommen z.B. für den unerwarteten Mangel an durch MS-Exposition induziertem Angstverhalten in wildtypischen Tieren mitverantwortlich sein.

In dieser Studie wird angenommen, dass Tph2 +/- Mäuse teilweise und Tph2 -/- Mäuse nahezu komplett 5-HT-defizient sind. Einschränkend muss angesichts der Tatsache, dass mütterliches 5-HT während der Schwangerschaft über die Plazenta in den fetalen Organismus übertreten kann (Bonnin et al., 2011), und die Muttertiere als Tph2 +/- Mäuse nur partiell 5-HT-defizient sind, angenommen werden, dass Tph2 -/- Jungtiere während der Schwangerschaft den Wirkungen von 5-HT dennoch in gewissem Ausmaß ausgesetzt sind. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Blut-Hirn-Schranke vor P12 unreif ist, was es für von Tph1 peripher synthetisiertes 5-HT möglich machen könnte, bis zu diesem Zeitpunkt zu einem gewissen Grad die Blut-Hirn-Schranke zu passieren (Ribatti et al., 2006). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass homozygot Tph2-defiziente Mäuse während der

Entwicklung sowie in der frühen postnatalen Phase nicht doch in gewissem Umfang serotonergen Wirkungen ausgesetzt sind.

In der ersten Kohorte zeigte sich in testnaiven MS-exponierten Mäusen interessanterweise eine geringere neuronale Aktivierung im La als in testnaiven Tieren der Kontrollgruppe. Da dieser Effekt in den testnaiven Tieren der MS-Gruppe der zweiten Kohorte jedoch nicht gefunden werden konnte, muss davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei nicht um einen allein durch die Wirkungen von MS bedingten Effekt, sondern um eine Interaktion zwischen MS und anderen, nicht eindeutig definierbaren Umweltbedingungen handelt.

Rearingverhalten, also das Aufstellen auf die Hinterbeine, wird im OF-Test klassischerweise als ein Aktivitätsparameter gewertet. Eine Publikation von 2018 von Sturman et al. hat Rearingverhalten im OF näher untersucht und zwischen unterstütztem Rearing, bei dem sich die Maus in unmittelbarer Nähe zur Wand der Arena aufstellt und mit den Vorderpfoten an der Wand abstützt, sowie nicht-unterstütztem Rearing, bei dem sich die Tiere auf offener Fläche auf die Hinterbeine stellen, wobei die Vorderpfoten frei in der Luft gehalten werden, unterschieden (Sturman et al., 2018). Während unterstütztes Rearing gegen die Wand primär Aktivität widerspiegelt, zeigt sich nicht-unterstütztes Rearing bei Stressexposition reduziert, wodurch das verringerte Auftreten von nicht-unterstütztem Rearing einen neuen Parameter für die Evaluation von Angstverhalten darstellen könnte. Da die Publikation von Sturman et al. (Sturman et al., 2018) erst nach Publikation der Daten dieser Studie (Auth, Weidner et al., 2018) erschienen ist, ging die Unterscheidung zwischen diesen beiden Varianten von Rearingverhalten nicht in diese Arbeit ein.

6.3 Perspektiven

Der nächste sinnvolle Schritt wäre nun die Charakterisierung der infolge der Verhaltenstests aktivierten Neurone in den jeweiligen Gehirnregionen mithilfe immunhistochemischer Doppelfärbungen gegen c-Fos sowie ausgewählte zelltypspezifische Marker, um Informationen über die neuronale Identität der durch die Verhaltenstests aktivierten Nervenzellen zu erhalten.

Besonders interessant wäre hierbei die Charakterisierung der aktivierten Neurone im PVN, da sich innerhalb des PVN zwei für Angstverhalten und Entwicklungsstress relevante Neuronenpopulationen befinden, welche gegensätzliche Auswirkungen auf Physiologie und Verhalten im Kontext von Stressexposition bzw. Angst vermitteln.

Die parvozellulären Neurone des PVN stellen die erste Station in der Aktivierung der HHN-Achse dar und werden durch noradrenerge Afferenzen aus dem LC sowie Afferenzen aus dem Nucleus tractus

solitarii, der ventrolateralen Medulla und limbischen Strukturen wie dem BNST aktiviert (Qin et al., 2018). Infolge von Stressreizen sezernieren die parvozellulären Neurone CRH in die Eminentia mediana, welches zu einer Ausschüttung von ACTH in der Adenohypophyse und schließlich zur Sekretion von Glucocorticoiden in der Nebennierenrinde führt, mit den im einführenden theoretischen Teil ausführlich erläuterten Konsequenzen für Physiologie und Verhalten (Swanson & Sawchenko, 1983). Darüber hinaus erhalten die parvozellulären Neurone des PVN auch aktivierende serotonerge Afferenzen aus den Raphekernen (Rossi et al., 2010; Sawchenko et al., 1983), was besonders interessant vor dem Hintergrund der kompletten oder partiellen 5-HT-Defizienz ist.

Die magnozellanen Neurone des PVN projizieren in den Hypophysenhinterlappen und sezernieren dort die Hormone Oxytocin und Arginin-Vasopressin (AVP) (Swanson & Sawchenko, 1983). Dem Hormon Oxytocin wird eine Rolle in der Prozessierung v.a. positiver emotionaler Inhalte, sowie eine prosoziale Wirkung auf Verhalten (di Simplicio et al., 2009; Bartz et al., 2011) und eine anxiolytische Wirkung zugeschrieben (Bowen et al., 2011). Ferner reguliert Oxytocin die Aktivität der HHN-Achse, in dem es u.a. im PVN durch Inhibierung der CRH-Expression und Aktivierung inhibitorischer GABAerger Neurone hemmend auf die Stressachsenaktivität wirkt (Landgraf & Neumann, 2004; Jurek et al., 2015; Smith et al., 2016), womit das oxytocinerge System ein interessantes Neurotransmittersystem in der Untersuchung von mit Stress im Zusammenhang stehenden Verhaltensweisen darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass anxiogene und stressinduzierende Reize zu einer Aktivierung des oxytocinergen Systems führen, was sich in einer gesteigerten elektrophysiologischen Aktivität der oxytocinergen Neurone, einer vermehrten Oxytocin-Genexpression im PVN und einer erhöhten Oxytocinausschüttung intrazerebral sowie in der Peripherie, widerspiegelt (Gibbs, 1984; Onaka & Yagi, 1993; Jezova et al., 1995). Es scheint, dass für die Entfaltung der protektiven, stressdämpfenden Wirkungen von Oxytocin auf die Stressachsenaktivität eine Coaktivierung von HHN-Achse und oxytocinergem System zu Beginn der Stressantwort erforderlich ist. Die Wirkung des oxytocinergen Systems in der Begrenzung der Stressantwort scheint mehr über eine Limitierung der Aktivitätsdauer sowie eine schnellere Erholung der HHN-Achse, als eine Verringerung der Reaktivität der HHN-Achse an sich, vermittelt zu sein (Engert et al., 2016).

Ein weiterer Aspekt, der das oxytocinerge System im Rahmen unserer Studie untersuchenswert macht, ist die Tatsache, dass Oxytocin für Angstverhalten relevante Gehirnstrukturen, wie beispielsweise den Ce als wichtigste Outputstruktur der Amygdala, innerviert, und dort furchtdämpfende Wirkungen, (Knobloch et al., 2012) vermutlich über die Aktivierung eines inhibitorischen GABAergen Netzwerkes, vermittelt (Huber et al., 2005). Darüber hinaus wirkt Oxytocin nicht nur lokal in der Amygdala, sondern reduziert auch die funktionelle Konnektivität zwischen der Amygdala und dem Hirnstamm (Kirsch, 2015). Zusätzlich interessant in Hinblick auf die vorliegende Studie ist die Tatsache, dass Oxytocin in

der Amygdala mit den Wirkungen des serotonergen Systems interagiert, und diese Interaktion an der Vermittlung anxiolytischer Effekte von 5-HT innerhalb dieser Struktur beteiligt ist (Mottolese et al., 2014). Ähnlich wie 5-HT kann Oxytocin allerdings unter bestimmten Umständen auch anxiogene Wirkungen entfalten (Steinman et al., 2016). Oxytocinrezeptoren werden in den Raphekernen stark exprimiert (Yoshida et al., 2009) und 5-HT könnte wiederum zu einer Aktivierung der magnozellularen Neurone im PVN führen (Marazziti et al., 2012), was bedeutet, dass auch 5-HT modulierende Wirkungen auf das oxytocinerge System und die Oxytocinausschüttung zukommen könnte. Darüber hinaus konnte ein vermittelnder Effekt von Oxytocin in der Wirkweise von SSRIs postuliert (Emiliano et al., 2007) und dazu passend gezeigt werden, dass die akute Verabreichung mancher SSRIs zu deutlichen Anstiegen des Plasmaoxytocinspiegels führt (Uvnas-Moberg et al., 1999; Lee et al., 2003). Dies weist auf eine potentiell wichtige Rolle des oxytocinergen Systems in der Vermittlung der antidepressiven Effekte von SSRIs hin.

Neben der für unsere Studie interessanten Interaktion des oxytocinergen mit dem serotonergen System besteht auch eine Verbindung zwischen ELS und dem oxytocinergen System; so konnte gezeigt werden, dass ELS mit verringerten Oxytocinkonzentrationen im Liquor erwachsener Frauen (Heim et al., 2009b) sowie im Liquor von Primaten (Winslow et al., 2003) assoziiert ist. Im Primatenmodell ging dieser ELS-bedingt verringerte Oxytocin-Liquorspiegel mit ausgeprägten Defiziten im Sozialverhalten einher (Winslow et al., 2003). Das oxytocinerge System der Jungtiere kann neben frühem Stress aber auch durch das mütterliche Pflegeverhalten modifiziert werden, wodurch soziale Verhaltensweisen über eine epigenetische Prägung des oxytocinergen Systems der Jungtiere transgenerational weitergegeben werden können (Champagne, 2008).

Zuletzt wäre eine Untersuchung der neuronalen Aktivierung oxytocinerner Neurone im Rahmen dieser Studie auch dahingehend sehr interessant, da bekannt ist, dass Östrogene über eine Aktivierung des magnozellularen oxytocinergen Systems im PVN Angstverhalten modulieren und sich diese Studie mit der Auswirkung der Gen x Umwelt-Interaktion von 5-HT-Defizienz und ELS auf Angstverhalten speziell in weiblichen Organismen befasst. Es ist bekannt, dass Östradiol, vermutlich ER β vermittelt, (Hrabovszky et al., 2004) Plasmaoxytocinspiegel erhöhen kann (Amico et al., 1981) und Oxytocin wiederum zu einer Abschwächung von angsthäufigen Verhaltensweisen sowie einer Abdämpfung der stressinduzierten HPA-Achsen-Aktivität führt (Mak et al., 2012; Sabihi et al., 2014; Windle et al., 1997).

7 Literaturverzeichnis

- Aan het Rot M., Mathew S.J., Charney D.S. (2009). *Neurobiological mechanisms in major depressive disorder*. CMAJ. 180(3): 305-13.
- Abrams J.K., Johnson P.L., Hay-Schmidt A., Mikkelsen J.D., Shekhar A., Lowry C.A. (2005). *Serotonergic systems associated with arousal and vigilance behaviors following administration of anxiogenic drugs*. Neuroscience. 133(4):983–997.
- Adolphs R., Tranel D. (2000). *Emotion recognition and the human amygdala*. In: Aggleton J.P. (editor). *The Amygdala*. New York: Oxford University Press; pp. 587–630.
- Agís-Balboa R.C., Pinna G., Zhubi A., Maloku E., Costa E., Guidotti A. (2006). *Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 103(39):14602–14607.
- Agorastos A., Pervanidou P., Chrousos G.P., Kolaitis G. (2018). *Early life stress and trauma: developmental neuroendocrine aspects of prolonged stress system dysregulation*. Hormones (Athens). 17(4):507-520.
- Aisa B., Tordera R., Lasheras B., Del Río J., Ramírez M.J. (2007). *Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats*. Psychoneuroendocrinology. 32(3):256–266.
- Aisa B., Tordera R., Lasheras B., Del Río J., Ramírez M. J. (2008). *Effects of maternal separation on hypothalamic–pituitary–adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats*. Neuroscience. 154(4):1218–1226.
- Akimova E., Lanzenberger R., Kasper S. (2009). *The serotonin-1A receptor in anxiety disorders*. Biol Psychiatry. 66(7):627–35.
- Albert P.R., Lemonde S. (2004). *5-HT_{1A} receptors, gene repression, and depression: guilt by association*. Neuroscientist. 10(6):575–93.
- Alenina N., Kikic D., Todiras M., Mosienko V., Qadri F., Plehm R., Boyé P., Vilianovitch L., Sohr R., Tenner K., Hörtnagl H., Bader M. (2009). *Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106(25):10332–10337.
- Alexander N., Kuepper Y., Schmitz A., Osinsky R., Kozyra E., Hennig J. (2009). *Gene-environment interactions predict cortisol responses after acute stress: implications for the etiology of depression*. Psychoneuroendocrinology. 34(9):1294-303.
- Alfarez D.N., De Simoni A., Velzing E.H., Bracey E., Joëls M., Edwards F.A., Krugers H.J. (2009). *Corticosterone reduces dendritic complexity in developing hippocampal CA1 neurons*. Hippocampus. 19(9): 828–836.
- Amat J., Matus-Amat P., Watkins L.R., Maier S.F. (1998). *Escapable and inescapable stress differentially alter extracellular levels of 5-HT in the basolateral amygdala of the rat*. Brain Res. 812(1-2):113–120.
- Amat J., Tamblyn J.P., Paul E.D., Bland S.T., Amat P., Foster A.C., Watkins L.R., Maier S.F. (2004). *Microinjection of urocortin 2 into the dorsal raphe nucleus activates serotonergic neurons and increases extracellular serotonin in the basolateral amygdala*. Neuroscience. 129(3):509–519.
- Amateau S.K., Alt J.J., Stamps C.L., McCarthy M.M. (2004). *Brain estradiol content in newborn rats: Sex differences, regional heterogeneity, and possible de novo synthesis by the female telencephalon*. Endocrinology. 145(6):2906–2917.
- American Psychiatric Association (2013). *Anxiety Disorders*. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. DSM Library. American Psychiatric Association.
- Amico J.A., Seif S.M., Robinson A.G. (1981). *Oxytocin in human plasma: Correlation with neurophysin and stimulation with estrogen*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 52(5): 988–993.
- An X., Bandler R., Ongur D., Price J.L. (1998). *Prefrontal cortical projections to longitudinal columns in the midbrain periaqueductal gray in macaque monkeys*. J Comp Neurol. 401(4):455–479.
- Anda R.F., Felitti V.J., Douglas Bremner J., Walker J.D., Whitfield C., Perry B.D., Dube S.R., Giles W.H. (2006). *The enduring effects of abuse and related adverse experiences in childhood. A convergence of evidence from neurobiology and epidemiology*. Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 256(3):174–186.
- Andersen S.L., Teicher M.H. (2004). *Delayed effects of early stress on hippocampal development*. Neuropsychopharmacology. 29(11), 1988–1993.

- Andersen S.L., Tomada A., Vincow E.S., Valente E., Polcari A., Teicher, M.H. (2008). *Preliminary evidence for sensitive periods in the effect of childhood sexual abuse on regional brain development*. J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci. 20(3), 292–301.
- Andrade T.G.C.S., Silva A.M., Silva C.L. (1999). *Effect of electrolytic lesion of the median raphe nucleus on behavioral and physiological measures of stress*. Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam. 49(4):279–289.
- Andrade T.G.C.S., Graeff F.G. (2001). *Effect of electrolytic and neurotoxic lesions of the median raphe nucleus on anxiety and stress*. Pharmacol Biochem Behav. 70(1):1–14.
- Andrade T.G., Zangrossi H. Jr, Graeff F.G. (2013). *The median raphe nucleus in anxiety revisited*. J Psychopharmacol. 27(12):1107-15.
- Andrews N., Hogg S., Gonzalez L.E., File S.E. (1994). *5-HT_{1A} receptors in the median raphe nucleus and dorsal hippocampus may mediate anxiolytic and anxiogenic behaviours respectively*. Eur J Pharmacol. 264(3):259–64.
- Angoa-Pérez M., Kane M.J., Sykes C.E., Perrine S.A., Church M.W., Kuhn D.M. (2014). *Brain serotonin determines maternal behavior and offspring survival*. Gen. Brain Behav. 13(7):1–37.
- Ansell E.B., Rando K., Tuit K., Guarnaccia J., Sinha R. (2012). *Cumulative adversity and smaller gray matter volume in medial prefrontal, anterior cingulate, and insula regions*. Biol. Psychiatry. 72(1):57-64.
- Ansorge M.S., Morelli E., Gingrich J.A. (2008). *Inhibition of serotonin but not norepinephrine transport during development produces delayed, persistent perturbations of emotional behaviors in mice*. J Neurosci. 28(1):199–207.
- Araneda R., Andrade R. (1991). *5-Hydroxytryptamine₂ and 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex*. Neuroscience. 40(2): 399-412.
- Arnett M.G., Pan M.S., Doak W., Cyr P.E., Muglia L.M., Muglia L.J. (2015). *The role of glucocorticoid receptor-dependent activity in the amygdala central nucleus and reversibility of early-life stress programmed behavior*. Transl. Psychiatry 5(4):e542.
- Arnsten A.F. (2009). *Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function*. Nat. Rev. Neurosci. 10(6):410–422.
- Arp J.M., Ter Horst J.P., Loi M., den Blaauwen J., Bangert E., Fernández G., Joels M., Oitzl M.S., Krugers H.J. (2016). *Blocking glucocorticoid receptors at adolescent age prevents enhanced freezing between repeated cue-exposures after conditioned fear in adult mice raised under chronic early life stress*. Neurobiol. Learn. Mem. 133:30–38.
- Asami T., Yamasue H., Hayano F., Nakamura M., Uehara K., Otsuka T., Roppongi T., Nishashi N., Inoue T., Hirayasu Y. (2009). *Sexually dimorphic gray matter volume reduction in patients with panic disorder*. Psychiatry Res. 173(2):128–134.
- Asan E., Steinke M., Lesch K.-P. (2013). *Serotonergic innervation of the amygdala: targets, receptors, and implications for stress and anxiety*. Histochem. Cell Biol. 139(6):785–813.
- Atkinson H.C., Waddell B.J. (1997). *Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle*. Endocrinology 138(9):3842–3848.
- Attenburrow M.J., Mitter P.R., Whale R., Terao T., Cowen P.J. (2001). *Low-dose citalopram as a 5-HT neuroendocrine probe*. Psychopharmacology (Berl). 155(3):323-326.
- Auth C.S., Weidner M.T., Popp S., Strekalova T., Schmitt-Böhrer A.G., van den Hove D., Lesch K.P., Waider J. (2018). *Differential anxiety-related behaviours and brain activation in Tph2-deficient female mice exposed to adverse early environment*. Eur Neuropsychopharmacol. 28(11):1270-1283.
- Averill L.A., Averill C.L., Kelmendi B., Abdal-lah C.G., Southwick S.M. (2018). *Stress Response Modulation Underlying the Psychobiology of Resilience*. Curr Psychiatry Rep. 20(4):27.
- Avishai-Eliner S., Yi S.-J., Newth C.J.L., Baram T.Z. (1995). *Effects of maternal and sibling deprivation on basal and stress induced hypothalamic-pituitary-adrenal components in the infant rat*. Neurosci. Lett. 192(1):49–52.
- Avishai-Eliner S., Gilles E.E., Eghbal-Ahmadi M., Bar-El Y., Baram T.Z. (2001). *Altered regulation of gene and protein expression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis components in an immature rat model of chronic stress*. J. Neuroendocrinol. 13(9):799–807.

- Azmitia E.C., Segal M. (1978). *An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat*. *J Comp Neurol*, 179(3):641-667.
- Babb J.A., Masini C.V., Day H.E., Campeau S. (2013). *Sex differences in activated corticotropin-releasing factor neurons within stress related neurocircuitry and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis hormones following restraint in rats*. *Neuroscience* 234:40-52.
- Bagot R.C., van Hasselt F.N., Champagne D.L., Meaney M.J., Krugers H.J., Joëls M. (2009). *Maternal care determines rapid effects of stress mediators on synaptic plasticity in adult rat hippocampal dentate gyrus*. *Neurobiol. Learn. Mem.* 92(3):292-300.
- Bale T.L., Baram T.Z., Brown A.S., Goldstein J.M., Insel T.R., McCarthy M.M., Nemeroff C.B., Reyes T.M., Simerly R.B., Susser E.S., Nestler E.J. (2010). *Early life programming and neurodevelopmental disorders*. *Biol Psychiatry* 68(4): 314-319.
- Bale T.L., Neill Epperson C. (2015). *Sex differences and stress across the lifespan*. *Nat. Neurosci.* 18(10):1413-1420.
- Bandler R., Shipley M.T. (1994). *Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression?* *Trends Neurosci* 17(9):379-389.
- Bandler R., Keay K.A., Floyd N., Price J. (2000). *Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. Passive emotional coping*. *Brain Res Bull* 53(1):95-104.
- Bangasser D.A., Reyes B.A., Piel D., Garachh V., Zhang X.Y., Plona Z.M., Van Bockstaele E.J., Beck S.G., Valentino R.J. (2013). *Increased vulnerability of the brain norepinephrine system of females to corticotropin-releasing factor overexpression*. *Mol. Psychiatr.* 18:166-173.
- Banks S.J., Eddy K.T., Angstadt M., Nathan P.J., Phan K.L. (2007). *Amygdala-frontal connectivity during emotion regulation*. *Soc. Cogn. Affect Neurosci.* 2(4):303-312.
- Baram T.Z., Davis E.P., Obenaus A., Sandman C.A., Small S.L., Solodkin A., Stern H. (2012). *Fragmentation and unpredictability of early-life experience in mental disorders*. *Am J Psychiatry* 169(9):907-915.
- Barnes N.M., Sharp T. (1999). *A review of central 5-HT receptors and their function*. *Neuropharmacology.* 38(8):1083-152.
- Bartolomucci A., Carola V., Pascucci T., Puglisi-Allegra S., Cabib S., Lesch K. P., Parmigiani S., Palanza P., Gross C. (2010). *Increased vulnerability to psychosocial stress in heterozygous serotonin transporter knockout mice*. *Dis. Model. Mech.* 3:459-470.
- Barton D.A., Esler M.D., Dawood T., Lambert E.A., Haikerwal D., Brenchley C., Socratous F., Hastings J., Guo L., Wiesner G., Kaye D.M., Bayles R., Schlaich M.P., Lambert G.W. (2008). *Elevated brain serotonin turnover in patients with depression: effect of genotype and therapy*. *Archives of General Psychiatry.* 65(1):38-46.
- Bartosz B., Joanna W., Grzegorz H. (2011). *Imipramine counteracts corticosterone-induced enhancement of glutamatergic transmission and impairment of long-term potentiation in the rat frontal cortex*. *Pharmacol. Rep.* 63(6):1404-1412.
- Bartz J.A., Zaki J., Bolger N., Ochsner K.N. (2011). *Social effects of oxytocin in humans: context and person matter*. *Trends Cogn Sci.* 15(7):301-309.
- Baulieu E.E., Robel P. (1990). *Neurosteroids: a new brain function?* *J Steroid Biochem Mol Biol.* 37(3):395-403.
- Bauman M.D., Amaral D.G. (2005). *The distribution of serotonergic fibers in the macaque monkey amygdala: an immunohistochemical study using antisera to 5-hydroxytryptamine*. *Neuroscience.* 136(1):193-203.
- Bayer S.A., Altman J., Russo R.J., Zhang X. (1993). *Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat*. *Neurotoxicology.* 14(1):83-144.
- Bechara A., Tranel D., Damasio H., Adolphs R., Rockland C., Damasio A.R. (1995). *Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans*. *Science.* 269(5227):1115-1118.
- Beckett S., Marsden C.A. (1997). *The effect of central and systemic injection of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OHDPAT and the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 on periaqueductal grey-induced defence behaviour*. *J Psychopharmacol.* 11(1):35-40.

- Bekker M.H.J, van Mens-Verhulst J. (2007). *Anxiety disorders: sex differences in prevalence, degree, and background, but gender-neutral treatment*. *Gender Med.* 4, Suppl B:178-193.
- Belelli D., Lambert J.J. (2005). *Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor*. *Nat Rev Neurosci.*6(7): 565–575.
- Belelli D., Harrison N.L., Maguire J., Macdonald R.L., Walker M.C., Cope D.W. (2009). *Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function*. *J Neurosci* 29(41):12757–12763.
- Belnoue L., Grosjean N., Ladevèze E., Abrous D.N., Koehl M. (2013). *Prenatal stress inhibits hippocampal neurogenesis but spares olfactory bulb neurogenesis*. *PLoS ONE* 8(8):e72972.
- Bengel D., Murphy D.L., Andrews A.M., Wichems C.H., Feltner D., Heils A., Mössner R., Westphal H., Lesch K.-P. (1998). *Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice*. *Mol Pharmacol.* 53(4):649-55.
- Berdel B., Morys J., Maciejewska B. (1997). *Neuronal changes in the basolateral complex during development of the amygdala of the rat*. *Int. J. Dev. Neurosci.* 15(6):755–765.
- van den Bergh B.R.H., Marcoen A. (2004). *High antenatal maternal anxiety is related to ADHD symptoms, externalizing problems, and anxiety in 8- and 9-year-olds*. *Child Development.* 75(4):1085–1097.
- Bernal S.A., Morgan M.M., Craft R.M. (2007). *PAG mu opioid receptor activation underlies sex differences in morphine antinociception*. *Behav Brain Res.* 177(1):126–133.
- Bevilacqua L., Carli V., Sarchiapone M., George D.K., Goldman D., Roy A., Enoch M.A. (2012). *Interaction between FKBP5 and childhood trauma and risk of aggressive behavior*. *Arch Gen Psychiatry.* 69(1):62–70.
- Binder E.B., Bradley R.G., Liu W., Epstein M.P., Deveau T.C., Mercer K.B., Tang Y., Gillespie C.F., Heim C.M., Nemeroff C.B., Schwartz A.C., Cubells J.F., Ressler K.J. (2008). *Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of posttraumatic stress disorder symptoms in adults*. *JAMA.* 299(11):1291–1305.
- Binder E.B. (2009). *The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders*. *Psychoneuroendocrinology.* 34, Suppl 1:S186-95.
- Bingham B.C., Sheela Rani C.S., Frazer A., Strong R., Morilak D.A. (2013). *Exogenous prenatal corticosterone exposure mimics the effects of prenatal stress on adult brain stress response systems and fear extinction behavior*. *Psychoneuroendocrinology.* 38(11):2746–2757.
- Björnström L., Sjöberg M. (2005). *Mechanisms of estrogen receptor signaling: Convergence of genomic and nongenomic actions on target genes*. *Molecular Endocrinology.* 19(4):833–842.
- Blakeley P.M., Capron L.E., Jensen A.B., O'Donnell K.J., Glover V. (2013). *Maternal prenatal symptoms of depression and down regulation of placental monoamine oxidase A expression*. *Journal of Psychosomatic Research.* 75(4):341–345.
- Blakely R.D., De Felice L.J., Hartzell H.C. (1994). *Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters*. *J. Exp. Biol.* 196:263–281.
- Bocchio M., Fucsina G., Oikonomidis L., McHugh S.B., Bannerman D.M., Sharp T., Capogna M. (2015). *Increased serotonin transporter expression reduces fear and recruitment of parvalbumin interneurons of the amygdala*. *Neuropsychopharmacology* 40(13):3015–3026.
- Bockmühl Y., Patchev A.V., Madejska A., Hoffmann A., Sousa J.C., Sousa N., Holsboer F., Almeida O.F., Spengler D. (2015). *Methylation at the CpG island shore region upregulates Nr3c1 promoter activity after early-life stress*. *Epigenetics.* 10(3):247-257.
- van Bodegom M., Homberg J.R., Henckens M.J.A.G. (2017). *Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Early Life Stress Exposure*. *Front Cell Neurosci.* 11:87.
- Bogdan R., Williamson D.E., Hariri A.R. (2012). *Mineralocorticoid receptor Iso/Val (rs5522) genotype moderates the association between previous childhood emotional neglect and amygdala reactivity*. *Am J Psychiatry.* 169(5):515–522.
- Bombardi C. (2011). *Distribution of 5-HT2A receptor immunoreactivity in the rat amygdaloid complex and colocalization with gamma-aminobutyric acid*. *Brain Res.* 1370:112–128.

- Bondar N.P., Lepeshko A.A., Reshetnikov V.V. (2018). *Effects of early-life stress on social and anxiety-like behaviors in adult mice: sex-specific effects*. Behav Neurol. 1-13.
- Bondy C.A., Whitnall M.H., Brady L.S., Gainer H. (1989). *Coexisting peptides in hypothalamic neuroendocrine systems: some functional implications*. Cell Mol Neurobiol. 9(4):427–446.
- Bonn M., Schmitt A., Lesch K.-P., Van Bockstaele E.J., Asan E. (2013). *Serotonergic innervation and serotonin receptor expression of NPY-producing neurons in the rat lateral and basolateral amygdaloid nuclei*. BrainStruct. Funct. 218(2):421–435.
- Bonnin A., Goeden N., Chen K., Wilson M.L., King J., Shih J.C., Blakely R.D., Deneris E.S., Levitt P. (2011). *A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain*. Nature. 21;472(7343):347-350.
- Booij L., Richard T., Szyf M., Benkelfat C. (2015). *Genetic and early environmental influences on the serotonin system: consequences for brain development and risk for psychopathology*. J. Psychiat. Neurosci. 40(1):5–18.
- Bourin M., Hascoët M. (2003). *The mouse light/dark box test*. Eur J Pharmacol. 463(1-3):55-65.
- Bourke C.H., Neigh G.N. (2011). *Behavioral effects of chronic adolescent stress are sustained and sexually dimorphic*. Horm Behav. 60(1):112–120.
- Bouwknicht J.A., Hijzen T.H., van der Gugten J., Maes R.A., Hen R., Olivier B. (2001). *Absence of 5-HT(1B) receptors is associated with impaired impulse control in male 5-HT(1B) knockout mice*. Biol Psychiatry. 49(7):557–568.
- Bowen M.T., Carson D.S., Spiro A., Arnold J.C., McGregor I.S. (2011). *Adolescent oxytocin exposure causes persistent reductions in anxiety and alcohol consumption and enhances sociability in rats*. PLoS One. 6(11):e27237.
- Bravo J.A., Dinan T.G., Cryan J.F. (2011). *Alterations in the central CRF system of two different rat models of comorbid depression and functional gastrointestinal disorders*. Int. J. Neuropsychopharmacol. 14:666–683.
- Bredy T.W., Humpartzoomian R.A., Cain D.P., Meaney M.J. (2003). *Partial reversal of the effect of maternal care on cognitive function through environmental enrichment*. Neuroscience. 118(2):571–576.
- Brocke B., Armbruster D., Muller J., Hensch T., Jacob C.P., Lesch K.-P., Kirschbaum C., Strobel A. (2006). *Serotonin transporter gene variation impacts innate fear processing: acoustic startle response and emotional startle*. Mol. Psychiatry. 11(12):1106–1112.
- Brown P., Molliver M.E. (2000). *Dual serotonin (5-HT) projections to the nucleus accumbens core and shell: relation of the 5-HT transporter to amphetamine-induced neurotoxicity*. J Neurosci. 20(5):1952–1963.
- Bruce J., Fisher P.A., Pears K.C., Levine S. (2009). *Morning cortisol levels in preschool-aged foster children: differential effects of maltreatment type*. Dev. Psychobiol. 51(1):14–23.
- Brunson K.L., Avishai-Eliner S., Hatalski C.G., Baram T.Z. (2001). *Neurobiology of the stress response early in life: evolution of a concept and the role of corticotropin releasing hormone*. Mol. Psychiatry 6(6):647–656.
- Brunson K.L., Kramár E., Lin B., Chen Y., Colgin L.L., Yanagihara T.K., Lynch G., Baram T.Z. (2005). *Mechanisms of late-onset cognitive decline after early-life stress*. J. Neurosci. 25(41):9328–9338.
- Brunton P.J., Russell J.A. (2010). *Prenatal social stress in the rat programmes neuroendocrine and behavioural responses to stress in the adult offspring: sex-specific effects*. J. Neuroendocrinol. 22(4) :258–271.
- Brunton P.J., Donadio M.V., Russell J.A. (2011). *Sex differences in prenatally programmed anxiety behaviour in rats: differential corticotropin releasing hormone receptor mRNA expression in the amygdaloid complex*. Stress 14(6): 634–643.
- Burke A.R., McCormick C.M., Pellis S.M., Lukkes J.L. (2017). *Impact of adolescent social experiences on behavior and neural circuits implicated in mental illnesses*. Neurosci. Biobehav. Rev. 76:280–300.
- Burke C.W., Roulet F. (1970). *Increased exposure of tissues to cortisol in late pregnancy*. Br Med J. 1(5697):657–659.
- Burt V.K., Stein K. (2002). *Epidemiology of depression throughout the female life cycle*. J. Clin. Psychiatry. 63, Suppl.7:9–15.

- Bymaster F.P., Zhang W., Carter P.A., Shaw J., Chernet E., Phebus L., Wong D.T., Perry K.W. (2002). *Fluoxetine, but not other selective serotonin uptake inhibitors, increases norepinephrine and dopamine extracellular levels in prefrontal cortex*. *Psychopharmacology (Berl)*. 160(4):353-361.
- Calabrese E.J., Bachmann K.A., Bailer A.J., Bolger P.M., Borak J., Cai L., Cedergreen N., Cherian M.G., Chiueh C.C., Clarkson T.W., Cook R.R., Diamond D.M., Doolittle D.J., Dorato M.A., Duke S.O., Feinendegen L., Gardner D.E., Hart R.W., Hastings K.L., Hayes A.W., Hoffmann G.R., Ives J.A., Jaworowski Z., Johnson T.E., Jonas W.B., Kaminski N.E., Keller J.G., Klaunig J.E., Knudsen T.B., Kozumbo W.J., Lettieri T., Liu S.Z., Maisseu A., Maynard K.I., Masoro E.J., McClellan R.O., Mehendale H.M., Mothersill C., Newlin D.B., Nigg H.N., Oehme F.W., Phalen R.F., Philbert M.A., Rattan S.I., Riviere J.E., Rodricks J., Sapolsky R.M., Scott B.R., Seymour C., Sinclair D.A., Smith-Sonneborn J., Snow E.T., Spear L., Stevenson D.E., Thomas Y., Tubiana M., Williams G.M., Mattson M.P. (2007). *Biological stress response terminology: integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework*. *Toxicol Appl Pharmacol*. 222(1):122-128.
- Callaghan B.L., Richardson R. (2011). *Maternal separation results in early emergence of adult-like fear and extinction learning in infant rats*. *Behav. Neurosci*. 125(1):20-28.
- Callaghan B.L., Richardson R. (2012). *The effect of adverse rearing environments on persistent memories in young rats: removing the brakes on infant fear memories*. *Transl. Psychiatry* 2(7): e138.
- Cameron O.G., Kuttesch D., McPhee K., Curtis G.C. (1988). *Menstrual fluctuation in the symptoms of panic anxiety*. *Journal of Affective Disorders*. 15(2):169-174.
- Campbell B.M., Merchant K.M. (2003). *Serotonin 2C receptors within the basolateral amygdala induce acute fear-like responses in an open-field environment*. *Brain Res*. 993(1-2):1-9.
- Campos A.C., Fogaça M.V., Aguiar D.C., Guimarães F.S. (2013). *Animal models of anxiety disorders and stress*. *Braz J Psychiatry*. 35, Suppl 2:S101-111.
- Canovas S., Ross P.J. (2016). *Epigenetics in preimplantation mammalian development*. *Theriogenology*. 86(1):69-79.
- Carlson M., Earls F. (1997). *Psychological and neuroendocrinological sequelae of early social deprivation in institutionalized children in Romania*. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 807:419-428.
- Carola V., Frazzetto G., Pascucci T., Audero E., Puglisi-Allegra S., Cabib S., Lesch K.-P., Gross C. (2008). *Identifying molecular substrates in a mouse model of the serotonin transporter × environment risk factor for anxiety and depression*. *Biol. Psychiatry*. 63(9):840-846.
- Carrive P. (1993). *The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization*. *Behav Brain Res* 58(1-2):27-47.
- Carvalho-Netto E.F., Markham C., Blanchard D.C., Nunes-de-Souza R.L., Blanchard R.J. (2006). *Physical environment modulates the behavioral responses induced by chemical stimulation of dorsal periaqueductal gray in mice*. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 85(1):140-147.
- Carvalho-Netto E.F., Litvin Y., Nunes-de-Souza R.L., Blanchard D.C., Blanchard R.J. (2007). *Effects of intra-PAG infusion of ovine CRF on defensive behaviors in Swiss-Webster mice*. *Behav. Brain Res*. 176(2):222-229.
- Caspi A., McClay J., Moffitt T.E., Mill J., Martin J., Craig I.W., Taylor A., Poulton R. (2002). *Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children*. *Science*. 297(5582):851-854.
- Caspi A., Sugden K., Moffitt T.E., Taylor A., Craig I.W., Harrington H., McClay J., Mill J., Martin J., Braithwaite A., Poulton R. (2003). *Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene*. *Science*. 301(5631):386-389.
- Champagne F.A., Francis D.D., Mar A., Meaney M.J. (2003). *Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development*. *Physiol Behav*. 79(3):359-371.
- Champagne F.A. (2008). *Epigenetic mechanisms and the transgenerational effects of maternal care*. *Front Neuroendocrinol*. 29(3):386-397.
- Champagne D.L., Bagot R.C., van Hasselt F., Ramakers G., Meaney M.J., de Kloet E.R., Joëls M., Krugers H. (2008). *Maternal care and hippocampal plasticity: evidence for experience-dependent structural plasticity, altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress*. *J. Neurosci*. 28(23):6037-6045.

- Champagne F.A. (2012). *Interplay between social experiences and the genome: epigenetic consequences for behavior*. *Adv Genet.* 77:33–57.
- Chapman D.P., Whitfield C.L., Felitti V.J., Dube S.R., Edwards V.J., Anda R.F. (2004). *Adverse childhood experiences and the risk of depressive disorders in adulthood*. *J. Affect. Disord.* 82(2):217–225.
- Choleris E., Thomas A.W., Kavaliers M., Prato F.S. (2001). *A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field*. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25(3):235–260.
- Choy K.H., de Visser Y., Nichols N.R., van den Buuse M. (2008). *Combined neonatal stress and young-adult glucocorticoid stimulation in rats reduce BDNF expression in hippocampus: effects on learning and memory*. *Hippocampus.* 18(7):655–667.
- Christianson J.P., Ragole T., Amat J., Greenwood B.N., Strong P.V., Paul E.D., Fleshner M., Watkins L.R., Maier S.F. (2010). *5-Hydroxytryptamine 2C receptors in the basolateral amygdala are involved in the expression of anxiety after uncontrollable traumatic stress*. *Biol Psychiatry.* 67(4):339–345.
- Chung S., Son G.H., Park S.H., Park E., Lee K.H., Geum D., Kim K. (2005). *Differential adaptive responses to chronic stress of maternally stressed male mice offspring*. *Endocrinology.* 146(7):3202–3210.
- Ciocchi S., Herry C., Grenier F., Wolff S.B., Letzkus J.J., Vlachos I., Ehrlich I., Sprengel R., Deisseroth K., Stadler M.B., Müller C., Lüthi A. (2010). *Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits*. *Nature.* 468(7321):277–282.
- Clark M.S., Sexton T.J., McClain M., Root D., Kohen R., Neumaier J.F. (2002). *Overexpression of 5-HT1B receptor in dorsal raphe nucleus using Herpes Simplex Virus gene transfer increases anxiety behavior after inescapable stress*. *J Neurosci.* 22(11):4550–4562.
- Clark M.S., Vincow E.S., Sexton T.J., Neumaier J.F. (2004). *Increased expression of 5-HT1B receptor in dorsal raphe nucleus decreases fear-potentiated startle in a stress dependent manner*. *Brain Res.* 1007(1-2):86–97.
- Cole R.D., Kawasumi Y., Parikh V., Bangasser D.A. (2016). *Corticotropin releasing factor impairs sustained attention in male and female rats*. *Behav Brain Res.* 296:30–34.
- Commons K.G., Connolley K.R., Valentino R.J. (2003). *A neurochemically distinct dorsal raphe-limbic circuit with a potential role in affective disorders*. *Neuropsychopharmacology.* 28:206–215.
- Concas A., Mostallino M.C., Porcu P., Follesa P., Barbaccia M.L., Trabucchi M., Purdy R.H., Grisenti P., Biggio G. (1998). *Role of brain allopregnanolone in the plasticity of gamma-aminobutyric acid type A receptor in rat brain during pregnancy and after delivery*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(22):13284–13289.
- Conrad C.D., McLaughlin K.J., Harman J.S., Foltz C., Wiczorek L., Lightner E., Wright R.L. (2007). *Chronic Glucocorticoids Increase Hippocampal Vulnerability to Neurotoxicity under Conditions That Produce CA3 Dendritic Retraction But Fail to Impair Spatial Recognition Memory*. *J Neurosci.* 27(31): 8278–8285.
- Corbier P., Edwards D.A., Roffi J. (1992). *The neonatal testosterone surge: a comparative study*. *Arch Int Physiol Biochim Biophys.* 100:127–31.
- Cornea-Hebert V., Riad M., Wu C., Singh S.K., Descarries L. (1999). *Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT2A receptor in the central nervous system of adult rat*. *J Comp Neurol.* 409(2):187–209.
- Corradetti R., Ballerini L., Pugliese A.M., Pepeu G. (1992). *Serotonin blocks the long-term potentiation induced by primed burst stimulation in the CA1 region of rat hippocampal slices*. *Neuroscience.* 46(3):511–518.
- Costall B., Naylor R.J. (1997). *The influence of 5-HT2 and 5-HT4 receptor antagonists to modify drug induced disinhibitory effects in the mouse light/dark test*. *Br. J. Pharmacol.* 122(6):1105–1108.
- Cowan C.S., Callaghan B.L., Richardson R. (2013). *Acute early-life stress results in premature emergence of adult-like fear retention and extinction relapse in infant rats*. *Behav. Neurosci.* 127(5):703–711.
- Cowan C.S., Callaghan B.L., Kan J.M., Richardson R. (2016). *The lasting impact of early life adversity on individuals and their descendants: potential mechanisms and hope for intervention*. *Genes Brain Behav.* 15(1):155–168.
- Crane J.D., Palanivel R., Mottillo E.P., Bujak A.L., Wang H., Ford R.J., Collins A., Blümer R.M., Fullerton M.D., Yabut J.M., Kim J.J., Ghia J.E., Hamza S.M., Morrison K.M., Schertzer J.D., Dyck J.R., Khan W.I., Steinberg G.R. (2015). *Inhibiting peripheral*

- serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis*. *Nat Med*. 21(2):166–172.
- Crawley J.N., Goodwin F.K. (1980). *Preliminary report of a simple animal behaviour for the anxiolytic effects of benzodiazepines*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13(2):167–170.
- Dahlstroem A., Fuxe K. (1964). *Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons*. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 232:231–255.
- Danese A., McEwen B.S. (2012). *Adverse childhood experiences, allostasis, allostatic load, and age-related disease*. *Physiol Behav.* 106(1):29–39.
- Daskalakis N.P., Bagot R.C., Parker K.J., Vinkers C.H., de Kloet E.R. (2013). *The three-hit concept of vulnerability and resilience: toward understanding adaptation to early-life adversity outcome*. *Psychoneuroendocrinology*. 38(9):1858–1873.
- Davis D.A., Luecken L.J., Zautra A.J. (2005). *Are reports of childhood abuse related to the experience of chronic pain in adulthood? A meta-analytic review of the literature*. *Clin J Pain*. 21(5):398–405.
- Davis M., Walker D.L., Miles L., Grillon C. (2010). *Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety*. *Neuropsychopharmacology*. 35(1):105–135.
- Davis E.P., Sandman C.A. (2012). *Prenatal psychobiological predictors of anxiety risk in preadolescent children*. *Psychoneuroendocrinology*. 37(8):1224–1233.
- Dawson L.A., Nguyen H.Q. (2000). *The role of 5-HT(1A) and 5-HT(1B/1D) receptors on the modulation of acute fluoxetine-induced changes in extracellular 5-HT: the mechanism of action of (+/-) pindolol*. *Neuropharmacology*. 39(6):1044–1052.
- Deakin J.F.W., Graeff F.G. (1991). *5-HT and mechanisms of defence*. *Journal of Psychopharmacology*. 5(4):305–315.
- Dent G.W., Okimoto D.K., Smith M.A., Levine S. (2000). *Stress induced alterations in corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the paraventricular nucleus during ontogeny*. *Neuroendocrinology*. 71(6):333–342.
- DeSantis S.M., Baker N.L., Back S.E., Spratt E., Ciolino J.D., Moran-Santa Maria M., Dipankar B., Brady K.T. (2011). *Gender differences in the effect of early life trauma on hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning*. *Depress. Anxiety*. 28(5):383–392.
- Diorio D., Viau V., Meaney M.J. (1993). *The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress*. *J. Neurosci.* 13(9):3839–3847.
- van der Doelen R.H., Kozicz T., Homborg J.R. (2013). *Adaptive fitness; early life adversity improves adult stress coping in heterozygous serotonin transporter knockout rats*. *Mol. Psychiatry*. 18(12):1244–1245.
- Doherty T.S., Roth T.L. (2016). *Insight from animal models of environmentally driven epigenetic changes in the developing and adult brain*. *Dev Psychopathol.* 28:1229–1243.
- Donner N., Handa R.J. (2009). *Estrogen receptor beta regulates the expression of tryptophan-hydroxylase 2 mRNA within serotonergic neurons of the rat dorsal raphe nuclei*. *Neuroscience*. 163(2):705–718.
- Donner N.C., Lowry C.A. (2013). *Sex differences in anxiety and emotional behavior*. *Pflugers Arch.* 465(5):601–626.
- Drevets W.C., Frank E., Price J.C., Kupfer D.J., Holt D., Greer P.J., Huang Y., Gautier C., Mathis C. (1999). *PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression*. *Biological Psychiatry*. 46(10):1375–1387.
- Duchesne A., Dufresne M.M., Sullivan R.M. (2009). *Sex differences in corticolimbic dopamine and serotonin systems in the rat and the effect of postnatal handling*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 33(2):251–261.
- Dumont F.S., Biancardi V., Kinkead R. (2011). *Hypercapnic ventilatory response of anesthetized female rats subjected to neonatal maternal separation: insight into the origins of panic attacks?* *Resp. Physiol. Neurobiol.* 175(2):288–295.
- Durant C., Christmas D., Nutt D. (2010). *The pharmacology of anxiety*. *Curr Top Behav Neurosci.* 2:303–330.
- Elliott N.D., Richardson R. (2019). *The effects of early life stress on context fear generalization in adult rats*. *Behav Neurosci.* 133(1):50–58.

- Emiliano A.B., Cruz T., Pannoni V., Fudge J.L. (2007). *The interface of oxytocin-labeled cells and serotonin transporter-containing fibers in the primate hypothalamus: a substrate for SSRIs therapeutic effects?* *Neuropsychopharmacology*. 32(5): 977–988.
- Engert V., Koester A.M., Riepenhausen A., Singer T. (2016). *Boosting recovery rather than buffering reactivity: Higher stress-induced oxytocin secretion is associated with increased cortisol reactivity and faster vagal recovery after acute psychosocial stress*. *Psychoneuroendocrinology*. 74:111-120.
- Esler M., Lambert E., Alvarenga M., Socratous F., Richards J., Barton D., Pier C., Brenchley C., Dawood T., Hastings J., Guo L., Haikerwal D., Kaye D., Jennings G., Kalff V., Kelly M., Wiesner G., Lambert G. (2007). *Increased brain serotonin turnover in panic disorder patients in the absence of a panic attack: reduction by a selective serotonin reuptake inhibitor*. *Stress*. 10(3):295–304.
- Everson-Rose S.A., Mendes de Leon C.F., Bienias J.L., Wilson R.S., Evans D.A. (2003). *Early life conditions and cognitive functioning in later life*. *Am J Epidemiol*. 158(11):1083–1089.
- Fadok J.P., Krabbe S., Markovic M., Courtin J., Xu C., Massi L., Botta P., Bylund K., Müller C., Kovacevic A., Tovote P., Lüthi A. (2017). *A competitive inhibitory circuit for selection of active and passive fear responses*. *Nature*. 542(7639):96-100.
- Fan J.-M., Wang X., Hao K., Yuan Y., Chen X.-Q., Du J.-Z. (2013). *Upregulation of PVN CRHR1 by gestational intermittent hypoxia selectively triggers a male-specific anxiogenic effect in rat offspring*. *Horm. Behav*. 63(1):25–31.
- Fanselow M.S. (1994). *Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear*. *Psych. Bull. Rev.* 1(4):429–438.
- Faravelli C., Lo Sauro C., Godini L., Lelli L., Benni L., Pietrini F., Lazzaretti L., Talamba G.A., Fioravanti G., Ricca V. (2012). *Childhood stressful events, HPA axis and anxiety disorders*. *World J. Psychiatry*. 2(1):13–25.
- Farisse J., Héry F., Barden N., Héry M., Boulenguez P. (2000). *Central 5-HT(1) and 5-HT(2) binding sites in transgenic mice with reduced glucocorticoid receptor number*. *Brain Res*. 862(1-2):145-53.
- Feinstein J.S., Adolphs R., Damasio A., Tranel D. (2011). *The human amygdala and the induction and experience of fear*. *Curr Biol*. 21(1):34–38.
- Feinstein J.S., Buzza C., Hurlemann R., Follmer R.L., Dahdaleh N.S., Coryell W.H., Welsh M.J., Tranel D., Wemmie J.A. (2013). *Fear and panic in humans with bilateral amygdala damage*. *Nat Neurosci*. 16(3):270-272.
- Feldman S., Conforti N., Itzik A., Weidenfeld J. (1994). *Differential effect of amygdaloid lesions on CRF-41, ACTH and corticosterone responses following neural stimuli*. *Brain Res*. 658(1-2):21–26.
- Feldman R., Granat A., Pariente C., Kanety H., Kuint J., Gilboa-Schechtman E. (2009). *Maternal depression and anxiety across the postpartum year and infant social engagement, fear regulation, and stress reactivity*. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*. 48(9):919–927.
- Felitti V.J., Anda R.F., Nordenberg D., Williamson D.F., Spitz A.M., Edwards V., Koss M.P., Marks J.S. (1998). *Relationship of childhood abuse and household dysfunction to many of the leading causes of death in adults. The Adverse Childhood Experiences (ACE) Study*. *Am J Prev Med*. 14(4):245-258.
- Fergusson D.M., Horwood L.J., Lynskey M.T. (1996). *Childhood sexual abuse and psychiatric disorder in young adulthood: II. Psychiatric outcomes of childhood sexual abuse*. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*. 35(10):1365–1374.
- Fergusson D.M., Boden J.M., Horwood L.J., Miller A., Kennedy M.A. (2012). *Moderating role of the MAOA genotype in antisocial behaviour*. *Br J Psychiatry*. 200(2):116-123.
- Fernandes C., McKittrick C.R., File S.E., McEwen B.S. (1997). *Decreased 5-HT1A and increased 5-HT2A receptor binding after chronic corticosterone associated with a behavioural indication of depression but not anxiety*. *Psychoneuroendocrinology*. 22(7):477-91.
- Figueiredo H.F., Dolgas C.M., Herman J.P. (2002). *Stress activation of cortex and hippocampus is modulated by sex and stage of estrus*. *Endocrinology*. 143(7):2534–2540.
- File S.E., Gonzalez L.E., Andrews N. (1996). *Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT1A receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests*. *J Neurosci*. 16(15):4810–4815.

- Finn D.P., Jhaveri M.D., Beckett S.R., Roe C.H., Kendall D.A., Marsden C.A., Chapman V. (2003). *Effects of direct periaqueductal grey administration of a cannabinoid receptor agonist on nociceptive and aversive responses in rats*. *Neuropharmacology*. 45(5):594-604.
- Forster G.L., Feng N., Watt M.J., Korzan W.J., Mouw N.J., Summers C.H., Renner K.J. (2006). *Corticotropin-releasing factor in the dorsal raphe elicits temporally distinct serotonergic responses in the limbic system in relation to fear behavior*. *Neuroscience* 141(2):1047–1055.
- Fox E., Zoukou K., Ridgewell A., Garner K. (2011). *The serotonin transporter gene alters sensitivity to attention bias modification: Evidence for a plasticity gene*. *Biol. Psychiatry*. 70(11):1049–1054.
- Fox J., Lowry C. (2013). *Corticotropin-releasing factor-related peptides, serotonergic systems, and emotional behavior*. *Front. Neurosci.* 7:169.
- Francis D., Diorio J., Liu D., Meaney M.J. (1999). *Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat*. *Science*. 286(5442):1155-1158.
- Franklin K.B.J., Paxinos G. (2008). *The Mouse Brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, 3. Auflage.
- Frankola K.A., Flora A.L., Torres A.K., Grissom E.M., Overstreet S., Dohanich G.P. (2010). *Effects of early rearing conditions on cognitive performance in prepubescent male and female rats*. *Neurobiol Learn Mem*. 94(1):91-99.
- Fries E., Hesse J., Hellhammer J., Hellhammer D.H. (2005). *A new view on hypocortisolism*. *Psychoneuroendocrinology* 30(10):1010–1016.
- Frodl T., O'Keane V. (2013). *How does the brain deal with cumulative stress? A review with focus on developmental stress, HPA axis function and hippocampal structure in humans*. *Neurobiol Dis*. 52:24–37.
- Fujioka T., Sakata Y., Yamaguchi K., Shibasaki T., Kato H., Nakamura S. (1999). *The effects of pre-natal stress on the development of hypothalamic paraventricular neurons in fetal rats*. *Neuroscience*. 92(3):1079–1088.
- Fuxe K., Dahlstrom A., Hoistad M., Marcellino D., Jansson A., Rivera A., Diaz-Cabiale Z., Jacobsen K., Tinner-Staines B., Hagman B., Leo G., Staines W., Guidolin D., Kehr J., Genedani S., Belluardo N., Agnati L.F. (2007). *From the Golgi-Cajal mapping to the transmitter-based characterization of the neuronal networks leading to two modes of brain communication: wiring and volume transmission*. *Brain Res Rev*. 55(1):17–54.
- Gallucci W.T., Baum A., Laue L., Rabin D.S., Chrousos G.P., Gold P.W., Kling M.A. (1993). *Sex differences in sensitivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis*. *Health Psychol*. 12(5):420–425.
- Gardier A.M., Malagie I., Trillat A.C., Jacquot C., Artigas F. (1996). *Role of 5-HT_{1A} autoreceptors in the mechanism of action of serotonergic antidepressant drugs: recent findings from in vivo microdialysis studies*. *Fundam Clin Pharmacol*. 10(1):16–27.
- Gardner K.L., Hale M.W., Oldfield S., Lightman S.L., Plotsky P.M., Lowry C.A. (2009a). *Adverse experience during early life and adulthood interact to elevate Tph2 mRNA expression in serotonergic neurons within the dorsal raphe nucleus*. *Neuroscience*. 163(4):991–1001.
- Gardner K.L., Hale M.W., Lightman S.L., Plotsky P.M., Lowry C.A. (2009b). *Adverse early life experience and social stress during adulthood interact to increase serotonin transporter mRNA expression*. *Brain Res*. 1305:47–63.
- Gartside S.E., Johnson D.A., Leitch M.M., Troakes C., Ingram C.D. (2003). *Early life adversity programs changes in central 5-HT neuronal function in adulthood*. *Eur. J. Neurosci*. 17(11):2401–2408.
- Gaspar P., Cases O., Maroteaux L. (2003). *The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics*. *Nat Rev Neurosci*. 4(12):1002–1012.
- Gehlert D.R., Shekhar A., Morin S.M., Hipskind P.A., Zink C., Gackenhaimer S.L., Shaw J., Fitz S.D., Sajdyk T.J. (2005). *Stress and central Urocortin increase anxiety-like behavior in the social interaction test via the CRF1 receptor*. *Eur. J. Pharmacol*. 509(2-3):145–153.
- Genest S.-E., Gulemetova R., Laforest S., Drolet G., Kinkead R. (2004). *Neonatal maternal separation and sex-specific plasticity of the hypoxic ventilatory response in awake rat*. *J. Physiol*. 554(Pt2):543–557.

- Geoffroy M.-C., Pinto Pereira S., Li L., Power C. (2016). *Child neglect and maltreatment and childhood-to-adulthood cognition and mental health in a prospective birth cohort*. J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry 55(1):33–40.e3.
- Gershon M.D., Tack J. (2007). *The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders*. Gastroenterology. 132(1):397–414.
- Ghaemmaghami P., Dainese S.M., La Marca R., Zimmermann R., Ehlert U. (2014). *The association between the acute psychobiological stress response in second trimester pregnant women, amniotic fluid glucocorticoids, and neonatal birth outcome*. Dev Psychobiol. 56(4):734–747.
- Gibbs D.M., Vale W. (1983). *Effect of the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine on corticotropin, releasing factor and vasopressin secretion into hypophysial portal blood*. Brain Res. 280(1):176–179.
- Gibbs D.M. (1984). *Dissociation of oxytocin, vasopressin and corticotropin secretion during different types of stress*. Life Sci. 35(5):487–491.
- Gibson E.L., Barnfield A.M., Curzon G. (1994). *Evidence that mCPP-induced anxiety in the plus-maze is mediated by postsynaptic 5-HT_{2C} receptors but not by sympathomimetic effects*. Neuropharmacology. 33(3-4):457–465.
- Giedd J.N., Snell J.W., Lange N., Rajapakse J.C., Casey B.J., Kozuch P.L., Vaituzis A.C., Vauss Y.C., Hamburger S.D., Kaysen D., Rapoport J.L. (1996). *Quantitative magnetic resonance imaging of human brain development: ages 4–18*. Cereb. Cortex. 6(4):551–560.
- Girardi C.E., Zanta N.C., Suchecki D. (2014). *Neonatal stress-induced affective changes in adolescent Wistar rats: early signs of schizophrenia-like behavior*. Front Behav Neurosci. 8:319.
- Gluckman P.D., Hanson M.A., Beedle A.S. (2007). *Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective*. Am. J. Hum. Biol. 19(1):1–19.
- Goel N., Workman J.L., Lee T.T., Innala L., Viau V. (2014). *Sex differences in the HPA axis*. Compr. Physiol. 4(3):1121–1155.
- Goodfellow N.M., Benekareddy M., Vaidya V.A., Lambe E.K. (2009). *Layer II/III of the prefrontal cortex: Inhibition by the serotonin 5-HT_{1A} receptor in development and stress*. J Neurosci. 29(32):10094–10103.
- Goodyer I.M., Park R.J., Herbert J. (2001). *Psychosocial and endocrine features of chronic first-episode major depression in 8-16 year olds*. Biol. Psychiatry. 50(5):351–357.
- Gore F., Schwartz E.C., Brangers B.C., Aladi S., Stujenske J.M., Likhnik E., Russo M.J., Gordon J.A., Salzman C.D., Axel R. (2015). *Neural representations of unconditioned stimuli in basolateral amygdala mediate innate and learned responses*. Cell. 162(1):134–145.
- Gottfries C.G., Roos B.E., Winblad B. (1974). *Determination of 5-hydroxytryptamine, 5-hydroxyindoleacetic acid and homovanillic acid in brain tissue from an autopsy material*. Acta Psychiatr. Scand. 50(5):496–507.
- Gouveia A. Jr, dos Santos U.D., Felisbino F.E., de Afonseca T.L., Antunes G., Morato S. (2004). *Influence of the estrous cycle on the behavior of rats in the elevated T-maze*. Behav Process. 67(2):167–171.
- Graeff F.G., Silveira Filho G. (1978). *Behavioral inhibition induced by electrical stimulation of the median raphe nucleus of the rat*. Physiol Behav. 21(4):477–484.
- Graeff F.G., Guimarães F.S., De Andrade T.G., Deakin J.F. (1996). *Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression*. Pharmacol Biochem Behav. 54(1):129–141.
- Graeff F.G. (2017). *Translational approach to the pathophysiology of panic disorder: Focus on serotonin and endogenous opioids*. Neurosci Biobehav Rev. 76(Pt A):48–55.
- Grahn R.E., Will M.J., Hammack S.E., Maswood S., McQueen M.B., Watkins L.R., Maier S.F. (1999). *Activation of serotonin-immunoreactive cells in the dorsal raphe nucleus in rats exposed to an uncontrollable stressor*. Brain Res. 826(1):35–43.
- Gray T.S. (1993). *Amygdaloid CRF pathways. Role in autonomic, neuroendocrine, and behavioral responses to stress*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 697:53–60.

- Green M.K., Rani C.S.S., Joshi A., Soto-Pina A.E., Martinez P.A., Frazer A., Strong R., Morilak D.A. (2011). *Prenatal stress induces long term stress vulnerability, compromising stress response systems in the brain and impairing extinction of conditioned fear after adult stress*. *Neuroscience*. 192:438–451.
- Greenberg B.D., Tolliver T.J., Huang S.J., Li Q., Bengel D., Murphy D.L. (1999). *Genetic variation in the serotonin transporter promoter region affects serotonin uptake in human blood platelets*. *Am. J. Med. Genet.* 88(1):83–87.
- Greenwood B.N., Strong P.V., Loughridge A.B., Day H.E., Clark P.J., Mika A., Hellwinkel J.E., Spence K.G., Fleshner M. (2012). *5-HT_{2C} receptors in the basolateral amygdala and dorsal striatum are a novel target for the anxiolytic and antidepressant effects of exercise*. *PLoS ONE* 7(9):e46118.
- Griebel G. (1996). *Variability in the effects of 5-HT-related compounds in experimental models of anxiety: evidence for multiple mechanisms of 5-HT in anxiety or never ending story?* *Pol J Pharmacol.* 48(2):129-136.
- Griffiths J., Lovick T. (2005a). *Withdrawal from progesterone increases expression of alpha4, beta1, and delta GABA(A) receptor subunits in neurons in the periaqueductal gray matter in female Wistar rats*. *J Comp Neurol.* 486(1):89–97.
- Griffiths J.L., Lovick T.A. (2005b). *GABAergic neurones in the rat periaqueductal grey matter express alpha4, beta1 and delta GABA receptor subunits: plasticity of expression during the estrous cycle*. *Neuroscience*. 136(2):457–466.
- Groeneweg F.L., Karst H., de Kloet E.R., Joëls M. (2011). *Rapid nongenomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response*. *J. Endocrinol.* 209(2):153–167.
- Gross C., Zhuang X., Stark K., Ramboz S., Oosting R., Kirby L., Santarelli L., Beck S., Hen R. (2002). *Serotonin 1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult*. *Nature*. 416(6879):396–400.
- Guajardo H.M., Snyder K., Ho A., Valentino R.J. (2017). *Sex differences in μ -opioid receptor regulation of the rat locus coeruleus and their cognitive consequences*. *Neuropsychopharmacology*. 42(6):1295–1304.
- Guest P.C., Salim K., Skynner H.A., George S.E., Bresnick J.N., McAllister G. (2000). *Identification and characterization of a truncated variant of the 5-hydroxytryptamine(2A) receptor produced by alternative splicing*. *Brain Res.* 876:238–244.
- Gunn B.G., Cunningham L., Cooper M.A., Corteen N.L., Seifi M., Swinny J.D., Lambert J.J., Belelli D. (2013). *Dysfunctional astrocytic and synaptic regulation of hypothalamic glutamatergic transmission in a mouse model of early-life adversity: relevance to neurosteroids and programming of the stress response*. *J. Neurosci.* 33(50):19534–19554.
- Gunnar M.R., Donzella B. (2002). *Social regulation of the cortisol levels in early human development*. *Psychoneuroendocrinology*. 27(1-2):199–220.
- Gunnar M.R., Cheatham C.L. (2003). *Brain and behavior interface: stress and the developing brain*. *Infant Ment Health J.* 24(3):195-211.
- Gutknecht L., Waider J., Kraft S., Kriegebaum C., Holtmann B., Reif A., Schmitt A., Lesch K.-P. (2008). *Deficiency of brain 5-HT synthesis but serotonergic neuron formation in Tph2 knockout mice*. *J. Neural Transm.* 115(8):1127–1132.
- Gutknecht L., Araragi N., Merker S., Waider J., Sommerlandt F.M., Mlinar B., Baccini G., Mayer U., Proft F., Hamon M., Schmitt A.G., Corradetti R., Lanfumey L., Lesch K.-P. (2012). *Impacts of brain serotonin deficiency following Tph2 inactivation on development and raphe neuron serotonergic specification*. *PLoS One*. 7(8):e43157.
- Gutknecht L., Popp S., Waider J., Sommerlandt F.M.J., Göppner C., Post A., Reif A., van den Hove D., Strelakova T., Schmitt A., Colaço M.B., Sommer C., Palme R., Lesch K.-P. (2015). *Interaction of brain 5-HT synthesis deficiency, chronic stress and sex differentially impact emotional behavior in Tph2 knockout mice*. *Psychopharmacology*. 232(14):2429–2441.
- Hale M.W., Bouwknecht J.A., Spiga F., Shekhar A., Lowry C.A. (2006). *Exposure to high- and low-light conditions in an open-field test of anxiety increases c-Fos expression in specific subdivisions of the rat basolateral amygdaloid complex*. *Brain Res. Bull.* 71(1-3):174–182.
- Hale M.W., Hay-Schmidt A., Mikkelsen J.D., Poulsen B., Bouwknecht J.A., Evans A.K., Stamper C.E., Shekhar A., Lowry C.A. (2008a). *Exposure to an open-field arena increases c-Fos expression in a subpopulation of neurons in the dorsal raphe nucleus, including neurons projecting to the basolateral amygdaloid complex*. *Neuroscience*. 157(4):733–748.
- Hale M.W., Hay-Schmidt A., Mikkelsen J.D., Poulsen B., Shekhar A., Lowry C.A. (2008b). *Exposure to an open-field arena increases c-Fos expression in a distributed anxiety-related system projecting to the basolateral amygdaloid complex*. *Neuroscience*. 155(3):659–672.

- Hale M.W., Johnson P.L., Westerman A.M., Abrams J.K., Shekhar A., Lowry C.A. (2010). *Multiple anxiogenic drugs recruit a parvalbumin-containing subpopulation of GABAergic interneurons in the basolateral amygdala*. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.* 34(7):1285–1293.
- Hall C.S. (1934). *Emotional behavior in the rat: defecation and urination as measures of individual differences in emotionality*. *J. Comp. Psychol.* 18(3):385–403.
- Hall H., Lundkvist C., Halldin C., Farde L., Pike V.W., McCarron J.A., Fletcher A., Cliffe I.A., Barf T., Wikstrom H., Sedvall G. (1997). *Autoradiographic localization of 5-HT_{1A} receptors in the postmortem human brain using [³H]WAY-100635 and [¹¹C]way100635*. *Brain Res* 745(1-2):96–108.
- Halldorsdottir T., Binder E.B. (2017). *Gene × environment interactions: from molecular mechanisms to behavior*. *Annu Rev Psychol.* 68:215–241.
- Hammack S.E., Richey K.J., Schmid M.J., LoPresti M.L., Watkins L.R., Maier S.F. (2002). *The role of corticotropin releasing hormone in the dorsal raphe nucleus in mediating the behavioral consequences of uncontrollable stress*. *J Neurosci.* 22(3):1020–1026.
- Hammack S.E., Schmid M.J., LoPresti M.L., Der-Avakian A., Pellymounter M.A., Foster A.C., Maier S.F. (2003). *Corticotropin releasing hormone type 2 receptors in the dorsal raphe nucleus mediate the behavioral consequences of uncontrollable stress*. *J. Neurosci.* 23(3):1019–1025.
- Handley S.L., Mithani S. (1984). *Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 327(1):1–5.
- Handley S.L., McBlane J.W. (1993). *Serotonin mechanisms in animal models of anxiety*. *Braz J Med Biol Res.* 26(1):1–13.
- Hanson J.L., Albert D., Iselin A.M., Carré J.M., Dodge K.A., Hariri A.R. (2016). *Cumulative stress in childhood is associated with blunted reward-related brain activity in adulthood*. *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.* 11(3):405–412.
- Hariri A.R., Mattay V.S., Tessitore A., Kolachana B., Fera F., Goldman D., Egan M.F., Weinberger D.R. (2002). *Serotonin transporter genetic variation and the response of the human amygdala*. *Science.* 297(5580):400–403.
- Hatalski C.G., Guirguis C., Baram T.Z. (1998). *Corticotropin releasing factor mRNA expression in the hypothalamic paraventricular nucleus and the central nucleus of the amygdala is modulated by repeated acute stress in the immature rat*. *Journal of Neuroendocrinology.* 10(9):663–669.
- Hawthorne A.L., Wylie C.J., Landmesser L.T., Deneris E.S., Silver J. (2010). *Serotonergic neurons migrate radially through the neuroepithelium by dynamin-mediated somal translocation*. *J. Neurosci.* 30(2):420–430.
- Heim C., Newport D.J., Heit S., Graham Y.P., Wilcox M., Bonsall R., Miller A.H., Nemeroff C.B. (2000). *Pituitary–adrenal and autonomic responses to stress in women after sexual and physical abuse in childhood*. *JAMA.* 284(5):592–597.
- Heim C., Nemeroff C.B. (2001). *The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies*. *Biol. Psychiat.* 49(12):1023–1039.
- Heim C., Bradley B., Mletzko T.C., Deveau T.C., Musselman D.L., Nemeroff C.B., Ressler K.J., Binder E.B. (2009a). *Effect of childhood trauma on adult depression and neuroendocrine function: sex-specific moderation by CRH receptor 1 gene*. *Front Behav Neurosci.* 3:41.
- Heim C., Young L.J., Newport D.J., Mletzko T., Miller A.H., Nemeroff C.B. (2009b). *Lower CSF oxytocin concentrations in women with a history of childhood abuse*. *Mol Psychiatry.* 14(10):954–958.
- Heim C., Binder E.B. (2012). *Current research trends in early life stress and depression: review of human studies on sensitive periods, gene–environment interactions, and epigenetics*. *Exp Neurol.* 233(1):102–11.
- Heinrichs S.C., Lapsansky J., Lovenberg T.W., De Souza E.B., Chalmers D.T. (1997). *Corticotropin releasing factor CRF1, but not CRF2, receptors mediate anxiogenic-like behavior*. *Regul. Pept.* 71(1):15–21.
- Heisler L.K., Chu H.M., Brennan T.J., Danao J.A., Bajwa P., Parsons L.H., Tecott L.H. (1998). *Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(25):15049–15054.

- Heisler L.K., Zhou L., Bajwa P., Hsu J., Tecott L.H. (2007). *Serotonin 5-HT_{2C} receptors regulate anxiety-like behavior*. *Genes Brain Behav.* 6(5):491-496.
- Henckens M.J., Deussing J.M., Chen A. (2016). *Region-specific roles of the corticotropin-releasing factor-urocortin system in stress*. *Nat. Rev. Neurosci.* 17(10) :636–651.
- Henry C., Kabbaj M., Simon H., Moal M., Maccari S. (1994). *Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats*. *J. Neuroendocrinol.* 6(3):341–345.
- Herman J.P., Cullinan W.E. (1997). *Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis*. *Trends Neurosci.* 20(2):78-84.
- Herman J.P., Ostrander M.M., Mueller N.K., Figueiredo H. (2005). *Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis*. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.* 29(8):1201–1213.
- Hiroi R., McDevitt R.A., Neumaier J.F. (2006). *Estrogen selectively increases tryptophan hydroxylase-2 mRNA expression in distinct subregions of rat midbrain raphe nucleus: association between gene expression and anxiety behavior in the open field*. *Biol Psychiatry* 60(3):288–295.
- Hiroi R., Neumaier J.F. (2006). *Differential effects of ovarian steroids on anxiety versus fear as measured by open field test and fear-potentiated startle*. *Behav Brain Res.* 166(1):93-100.
- Hiroi R., Neumaier J.F. (2009). *Estrogen decreases 5-HT_{1B} autoreceptor mRNA in selective subregion of rat dorsal raphe nucleus: inverse association between gene expression and anxiety behavior in the open field*. *Neuroscience.* 158(2):456–464.
- Hiroi R., McDevitt R.A., Morcos P.A., Clark M.S., Neumaier J.F. (2011). *Over-expression or knockdown of rat tryptophan hydroxylase-2 has opposing effects on anxiety behavior in an estrogen-dependent manner*. *Neuroscience.* 176:120–131.
- Hiroi R., Carbone D.L., Zuloaga D.G., Bimonte-Nelson H.A., Handa R.J. (2016). *Sex-dependent programming effects of prenatal glucocorticoid treatment on the developing serotonin system and stress-related behaviors in adulthood*. *Neuroscience.* 320:43–56.
- Hjorth S., Sharp T. (1991). *Effect of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on the release of 5-HT in dorsal and median raphe-innervated rat brain regions as measured by in vivo microdialysis*. *Life Sci.* 48(18):1779–1786.
- Hochberg Z., Feil R., Constancia M., Fraga M., Junien C., Carel J.C. (2011). *Child health, developmental plasticity, and epigenetic programming*. *EndocrRev.* 32(2):159–224.
- Hodel A.S., Hunt R.H., Cowell R.A., Van Den Heuvel S.E., Gunnar M.R., Thomas K.M. (2015). *Duration of early adversity and structural brain development in post-institutionalized adolescents*. *Neuroimage.* 105:112–119.
- Hogg S., Andrews N., File S.E. (1994). *Contrasting behavioural effects of 8-OH DPAT in the dorsal raphe nucleus and ventral hippocampus*. *Neuropharmacology.* 33(3–4):343–348.
- Holloway T., Moreno J.L., Umali A., Rayannavar V., Hodes G.E., Russo S.J., González-Maeso J. (2013). *Prenatal stress induces schizophrenia-like alterations of serotonin 2A and metabotropic glutamate 2 receptors in the adult offspring: role of maternal immune system*. *J. Neurosci.* 33(3):1088–1098.
- Holmes A., Yang R.J., Lesch K.-P., Crawley J.N., Murphy D.L. (2003). *Mice lacking the serotonin transporter exhibit 5-HT_{1A} receptor-mediated abnormalities in tests for anxiety-like behaviour*. *Neuropsychopharmacology.* 28(12):2077-2088.
- Holz N.E., Buchmann A.F., Boecker R., Blomeyer D., Baumeister S., Wolf I., Rietschel M., Witt S.H., Plichta M.M., Meyer-Lindenberg A., Banaschewski T., Brandeis D., Laucht M. (2015). *Role of FKBP5 in emotion processing: results on amygdala activity, connectivity and volume*. *Brain Struct Funct.* 220(3):1355–1368.
- Homberg J.R., Olivier J.D., Smits B.M., Mul J.D., Mudde J., Verheul M., Nieuwenhuizen O.F., Cools A.R., Ronken E., Cremers T., Schoffelmeer A.N., Ellenbroek B.A., Cuppen E. (2007). *Characterization of the serotonin transporter knockout rat: a selective change in the functioning of the serotonergic system*. *Neuroscience.* 146(4):1662–1676.
- Hopkins D.A., Holstege G. (1978). *Amygdaloid projections to the mesencephalon, pons and medulla oblongata in the cat*. *Exp Brain Res.* 32(4):529-547.
- Hornung J.P. (2003). *The human raphe nuclei and the serotonergic system*. *J Chem Neuroanat.* 26(4):331–343.

- Hosobuchi Y., Adams J.E., Linchitz R. (1977). *Pain relief by electrical stimulation of the central gray matter in humans and its reversal by naloxone*. *Science*. 197(4299):183–186.
- Hostinar C.E., Gunnar M.R. (2013). *The developmental effects of early life stress: an overview of current theoretical frameworks*. *Curr Dir Psychol Sci*. 22(5):400–406.
- van den Hove D., Jakob S.B., Schraut K.-G., Kenis G., Schmitt A.G., Kneitz S., Scholz C.J., Wiescholleck V., Ortega G., Prickaerts J., Steinbusch H., Lesch K.P. (2011). *Differential effects of prenatal stress in 5-HTT deficient mice: towards molecular mechanisms of gene × environment interactions*. *PLoS ONE*. 6(8):e22715.
- Hoyer D., Martin G. (1997). *5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome*. *Neuropharmacology*. 36(4-5):419–428.
- Hrabovszky E., Kalló I., Steinhäuser A., Merchenthaler I., Coen C.W., Petersen S.L., Liposits Z. (2004). *Estrogen receptor-beta in oxytocin and vasopressin neurons of the rat and human hypothalamus: Immunocytochemical and in situ hybridization studies*. *The Journal of Comparative Neurology*. 473(3):315–333.
- Hu P., Liu J., Yasrebi A., Gotthardt J.D., Bello N.T., Pang Z.P., Roepke T.A. (2016). *G q protein-coupled membrane initiated estrogen signaling rapidly excites corticotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus in female mice*. *Endocrinology*. 157(9):3604–3620.
- Huang P., Chandra V., Rastinejad F. (2010). *Structural overview of the nuclear receptor superfamily: Insights into physiology and therapeutics*. *Annual Review of Physiology*. 72:247–272.
- Huber D., Veinante P., Stoop R. (2005). *Vasopressin and oxytocin excite distinct neuronal populations in the central amygdala*. *Science*. 308(5719):245–248.
- Hughes Z.A., Liu F., Platt B.J., Dwyer J.M., Pulicicchio C.M., Zhang G., Schechter L.E., Rosenzweig-Lipson S., Day M. (2008). *WAY-200070, a selective agonist of estrogen receptor beta as a potential novel anxiolytic/antidepressant agent*. *Neuropharmacology*. 54(7):1136–1142.
- Hyman S.M., Garcia M., Sinha R. (2006). *Gender specific associations between types of childhood maltreatment and the onset, escalation and severity of substance use in cocaine dependent adults*. *Am. J. Drug Alcohol Abuse*. 32(4):655–664.
- Imai H., Steindler D.A., Kitai S.T. (1986). *The organization of divergent axonal projections from the mid-brain raphe nuclei in the rat*. *J. Comp. Neurol*. 243(3):363–380.
- Imaizumi M., Onodera K. (1993). *The behavioural and biochemical effects of thioperamide, a histamine H3-receptor antagonist, in a light/dark test measuring anxiety in mice*. *Life Sci*. 53(22):1675–1683.
- Imwalle D.B., Gustafsson J.-Å., Rissman E.F. (2005). *Lack of functional estrogen receptor β influences anxiety behavior and serotonin content in female mice*. *Physiology & Behavior*. 84(1):157–163.
- Ishimura K., Takeuchi Y., Fujiwara K., Tominaga M., Yoshioka H., Sawada T. (1988). *Quantitative analysis of the distribution of serotonin-immunoreactive cell bodies in the mouse brain*. *Neurosci. Lett*. 91(3):265–270.
- Ivy A.S., Brunson K.L., Sandman C., Baram T.Z. (2008). *Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: a clinically relevant model for early-life stress*. *Neuroscience*. 154(3):1132–1142.
- Ivy A.S., Rex C.S., Chen Y., Dubé C., Maras P.M., Grigoriadis D.E., Gall C.M., Lynch G., Baram T.Z. (2010). *Hippocampal dysfunction and cognitive impairments provoked by chronic early life stress involve excessive activation of CRH receptors*. *J Neurosci*. 30(39):13005–13015.
- Jacob C.A., Cabral A.H., Almeida L.P., Magierek V., Ramos P.L., Zanoveli J.M., Landeira-Fernandez J., Zangrossi H., Nogueira R.L. (2002). *Chronic imipramine enhances 5-HT(1A) and 5-HT(2) receptors-mediated inhibition of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray*. *Pharmacol Biochem Behav*. 72(4):761–766.
- Jacobs B.L., Azmitia E.C. (1992). *Structure and function of the brain serotonin system*. *Physiol Rev*. 72(1):165–229.
- Jacome L.F., Gautreaux C., Inagaki T., Mohan G., Alves S., Lubbers L.S., Luine V. (2010). *Estradiol and ER β agonists enhance recognition memory, and DPN, an ER β agonist, alters brain monoamines*. *Neurobiology of Learning and Memory*. 94(4):488–498.

- Jennings K.A., Loder M.K., Sheward W.J., Pei Q., Deacon R.M.J., Benson M.A., Olverman H.J., Hastie N.D., Harmar A.J., Shen S., Sharp T. (2006). *Increased expression of the 5-HT transporter confers a low-anxiety phenotype linked to decreased 5-HT transmission*. J. Neurosci. 26(35):8955–8964.
- Jennings K.A., Sheward W.J., Harmar A.J., Sharp T. (2008). *Evidence that genetic variation in 5-HT transporter expression is linked to changes in 5-HT_{2A} receptor function*. Neuropharmacology. 54(5):776–783.
- Jensen Pena C., Monk C., Champagne F.A. (2012). *Epigenetic effects of prenatal stress on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-2 in the placenta and fetal brain*. PLoS One. 7(6):e39791.
- Jezova D., Skultetyova I., Tokarev D., Bakos P., Vigas M. (1995). *Vasopressin and oxytocin in stress*. Ann N Y Acad Sci. 771: 192-203.
- Jiang S., Xin R., Lin S., Qian Y., Tang G., Wang D., Wu X. (2001). *Linkage studies between attention-deficit hyperactivity disorder and the monoamine oxidase genes*. American Journal of Medical Genetics. 105(8):783–788.
- Joëls M. (2008). *Functional actions of corticosteroids in the hippocampus*. Eur. J. Pharmacol. 583(2-3):312–321.
- Joëls M., Sarabdjitsingh R.A., Karst H. (2012). *Unraveling the time domains of corticosteroid hormone influences on brain activity: rapid, slow, and chronic modes*. Pharmacol Rev. 64(4):901-938.
- Joëls M., Karst H., Sarabdjitsingh R.A. (2018). *The stressed brain of humans and rodents*. Acta Physiol (Oxf). 223(2):e13066.
- Johnson E.O., Kamilaris T.C., Carter C.S., Calogero A.E., Gold P.W., Chrousos G.P. (1996). *The biobehavioral consequences of psychogenic stress in a small, social primate (Callithrix jacchus jacchus)*. Biol Psychol. 40(5):317–337.
- Johnson P.L., Lightman S.L., Lowry C.A. (2004). *A functional subset of serotonergic neurons in the rat ventrolateral periaqueductal gray implicated in the inhibition of sympathoexcitation and panic*. Ann N Y Acad Sci. 1018:58–64.
- Johnson P.L., Hollis J.H., Moratalla R., Lightman S.L., Lowry C.A. (2005). *Acute hypercarbic gas exposure reveals functionally distinct subpopulations of serotonergic neurons in rats*. J Psychopharmacol. 19(4):327–341.
- Johnson P.L., Truitt W.A., Fitz S.D., Lowry C.A., Shekhar A. (2007). *Neural Pathways Underlying Lactate-Induced Panic*. Neuropsychopharmacology. 33:2093–2107.
- Johnson P.L., Lowry C.A., Truitt W., Shekhar A. (2008). *Disruption of GABAergic tone in the dorsomedial hypothalamus attenuates responses in a subset of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus following lactate-induced panic*. J Psychopharmacol. 22(6):642–645.
- Johnson F.K., Delpech J.C., Thompson G.J., Wei L., Hao J., Herman P., Hyder F., Kaffman A. (2018). *Amygdala hyperconnectivity in a mouse model of unpredictable early life stress*. Transl Psychiatry. 8(1):49.
- Jones T., Moller M.D. (2011). *Implications of hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning in posttraumatic stress disorder*. J Am Psychiatr Nurses Assoc. 17(6):393–403.
- Jovanovic H., Lundberg J., Karlsson P., Cerin A., Saijo T., Varrone A., Halldin C., Nordström A.L. (2008). *Sex differences in the serotonin 1A receptor and serotonin transporter binding in the human brain measured by PET*. Neuroimage. 39(3):1408–1419.
- Jovanovic T., Blanding N.Q., Norrholm S.D., Duncan E., Bradley B., Ressler K.J. (2009). *Childhood abuse is associated with increased startle reactivity in adulthood*. Depress. Anxiety. 26(11):1018–1026.
- Jurek B., Slattery D.A., Hiraoka Y., Liu Y., Nishimori K., Aguilera G., Neumann I.D., van den Burg E.H. (2015). *Oxytocin Regulates Stress-Induced Crf Gene Transcription through CREB-Regulated Transcription Coactivator 3*. J Neurosci. 35(35):12248-12260.
- Kaffman A., Meaney M.J. (2007). *Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: clinical and research implications of molecular insights*. J. Child Psychol. Psychiatry. 48(3-4):224–244.
- Kalinichev M., Easterling K.W., Plotsky P.M., Holtzman S.G. (2002). *Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats*. Pharmacol Biochem Behav. 73(1):131–140.

- Kalueff A.V., Keisala T., Minasyan A., Kuuslahti M., Tuohimaa P. (2006). *Temporal stability of novelty exploration in mice exposed to different open field tests*. *Behav. Process.* 72(1):104–112.
- Kaplan G.A., Turrell G., Lynch J.W., Everson S.A., Helkala E.L., Salonen J.T. (2001). *Childhood socioeconomic position and cognitive function in adulthood*. *Int J Epidemiol.* 30(2):256–263.
- van de Kar L.D. (1997). *5-HT receptors involved in the regulation of hormone secretion*. In: Baumgarten H.G., Goethert M. (Editors.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, 129. Springer, Berlin, pp. 537–562.
- Kastenberger I., Schwarzer C. (2014). *GP1R (GPR30) knockout mice display reduced anxiety and altered stress response in a sex and paradigm dependent manner*. *Hormones and Behavior.* 66(4): 628–636.
- Kästner N., Richter S.H., Lesch K.-P., Schreiber R.S., Kaiser S., Sachser N. (2015). *Benefits of a "vulnerability gene"? A study in serotonin transporter knockout mice*. *Behav. Brain Res.* 283:116–120.
- Kawahara H., Yoshida M., Yokoo H., Nishi M., Tanaka M. (1993). *Psychological stress increases serotonin release in the rat amygdala and prefrontal cortex assessed by in vivo microdialysis*. *Neurosci Lett.* 162(1-2):81-84.
- Keating D.J., Spencer N.J. (2010). *Release of 5-hydroxytryptamine from the mucosa is not required for the generation or propagation of colonic migrating motor complexes*. *Gastroenterology.* 138(2):659–670.
- Keay K.A., Bandler R. (2001). *Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress*. *Neurosci Biobehav Rev* 25(7-8):669–678.
- Kellner M., Wiedemann K. (1998). *Nonresponse of adrenocorticotrophic hormone in first-ever lactate-induced panic attacks in healthy volunteers*. *Arch Gen Psychiatry.* 55(1):85–86.
- Kerman I.A., Shabrang C., Taylor L., Akil H., Watson S.J. (2006). *Relationship of presympathetic-premotor neurons to the serotonergic transmitter system in the rat brainstem*. *J Comp Neurol.* 499(6):882–896.
- Kessler R.C., Greenberg P.E. (2002). *The economic burden of anxiety and stress disorders*. In: Mitchell, C., Reter, R., Carr, P. (Editors.), *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. Lippicott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 981-992.
- Kessler R.C., Berglund P., Demler O., Jin R., Koretz D., Merikangas K.R., Rush A.J., Walters E.E., Wang P.S. (2003a). *The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R)*. *JAMA.* 289(23):3095-3105.
- Kessler R.C. (2003b). *Epidemiology of women and depression*. *J. Affect. Disord.* 74(1):5–13.
- Kiank C., Mundt A., Schuett C. (2009). *Mild postnatal separation stress reduces repeated stress-induced immunosuppression in adult BALB/c mice*. *Neuro Endocrinol. Lett.* 30(6):761–768.
- Kikusui T., Mori Y. (2009). *Behavioural and neurochemical consequences of early weaning in rodents*. *J Neuroendocrinol.* 21(4):427–431.
- Kim J.J., Diamond D.M. (2002). *The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories*. *Nat Rev Neurosci* 3(6):453–462.
- King B., Nicholson R., Smith R. (2001). *Placental Corticotrophin-releasing Hormone, local effects and fetomaternal endocrinology*. *Stress.* 4(4):219–233.
- Kirby L.G., Rice K.C., Valentino R.J. (2000). *Effects of corticotropin-releasing factor on neuronal activity in the serotonergic dorsal raphe nucleus*. *Neuropsychopharmacology.* 22(2):148–162.
- Kirby L.G., Freeman-Daniels E., Lemos J.C., Nunan J.D., Lamy C., Akanwa A., Beck S.G. (2008). *Corticotropin-releasing factor increases GABA synaptic activity and induces inward current in 5-hydroxytryptamine dorsal raphe neurons*. *J Neurosci.* 28(48):12927–12937.
- Kirsch P. (2015). *Oxytocin in the socioemotional brain: implications for psychiatric disorders*. *Dialogues Clin Neurosci.* 17(4):463-476.
- Kishi T., Tsumori T., Yokota S., Yasui Y. (2006). *Topographical projection from the hippocampal formation to the amygdala: a combined anterograde and retrograde tracing study in the rat*. *J. Comp. Neurol.* 496(3):349–368.

- Klengel T., Mehta D., Anacker C., Rex-Haffner M., Pruessner J.C., Pariante C.M., Pace T.W., Mercer K.B., Mayberg H.S., Bradley B., Nemeroff C.B., Holsboer F., Heim C.M., Ressler K.J., Rein T., Binder E.B. (2013). *Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions*. *Nat Neurosci.* 16(1):33–41.
- Klink R., Robichaud M., Debonnel G. (2002). *Gender and gonadal status modulation of dorsal raphe nucleus serotonergic neurons. Part I: effects of gender and pregnancy*. *Neuropharmacology.* 43(7):1119–1128.
- de Kloet E.R., Reul J.M., Sutanto W. (1990). *Corticosteroids and the brain*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 37(3):387–394.
- de Kloet E.R., Joëls M., Holsboer F. (2005). *Stress and the brain: from adaptation to disease*. *Nat Rev Neurosci.* 6(6):463–475.
- Knobloch H.S., Charlet A., Hoffmann L.C., Eliava M., Khrulev S., Cetin A.H., Osten P., Schwarz M.K., Seeburg P.H., Stoop R., Grinevich V. (2012). *Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response*. *Neuron.* 73(3) :553–566.
- Kodama Y., Kikusui T., Takeuchi Y., Mori Y. (2008). *Effects of early weaning on anxiety and prefrontal cortical and hippocampal myelination in male and female Wistar rats*. *Dev Psychobiol.* 50(4):332–342.
- Koehl M., Darnaudéry M., Dulluc J., Van Reeth O., Moal M.L., Maccari S. (1999). *Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo–pituitary–adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender*. *J. Neurobiol.* 40(3):302–315.
- Kohler C., Steinbusch H. (1982). *Identification of serotonin and non-serotonin-containing neurons of the mid-brain raphe projecting to the entorhinal area and the hippocampal formation. A combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat brain*. *Neuroscience.* 7(4):951–975.
- 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.W., Blokhuis H.J. (1999). *Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology*. *Neurosci Biobehav Rev.* 23(7):925–935.
- Koolhaas J.M., de Boer S.F., Buwalda B., van Reenen K. (2007). *Individual variation in coping with stress: a multidimensional approach of ultimate and proximate mechanisms*. *Brain Behav. Evol.* 70(4):218–226.
- Korosi A., Baram T.Z. (2010). *Plasticity of the stress response early in life: mechanisms and significance*. *Dev Psychobiol.* 52(7):661–670.
- Kosofsky B.E., Molliver M.E. (1987). *The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei*. *Synapse.* 1(2):153–168.
- Kranz G.S., Wadsak W., Kaufmann U., Savli M., Baldinger P., Gryglewski G., Haeusler D., Spies M., Mitterhauser M., Kasper S., Lanzenberger R. (2015). *High-dose testosterone treatment increases serotonin transporter binding in transgender people*. *Biol. Psychiatry.* 78(8):525–533.
- Kraszpulski M., Dickerson P.A., Salm A.K. (2006). *Prenatal stress affects the developmental trajectory of the rat amygdala*. *Stress.* 9(2):85–95.
- Krežel W., Dupont S., Krust A., Chambon P., Chapman P.F. (2001). *Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor β -deficient mice*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(21):12278–12282.
- Kuhlman K.R., Chiang J.J., Horn S., Bower J.E. (2017). *Developmental psychoneuroendocrine and psychoneuroimmune pathways from childhood adversity to disease*. *Neurosci Biobehav Rev.* 80:166–184.
- Kundakovic M., Champagne F.A. (2015). *Early-life experience, epigenetics, and the developing brain*. *Neuropsychopharmacology.* 40(1):141–153.
- Kusserow H., Davies B., Hortnagl H., Voigt I., Stroh T., Bert B., Deng D.R., Fink H., Veh R.W., Theuring F. (2004). *Reduced anxiety-related behaviour in transgenic mice overexpressing serotonin 1A receptors*. *Brain Res Mol Brain Res.* 129(1-2):104–116.
- Ladd C.O., Huot R.L., Thrivikraman K.V., Nemeroff C.B., Plotsky P.M. (2004). *Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation*. *Biol. Psychiatry.* 55(4):367–375.

- Ladd C.O., Thirivikraman K.V., Huot R.L., Plotsky P.M. (2005). *Differential neuroendocrine responses to chronic variable stress in adult Long Evans rats exposed to handling-maternal separation as neonates*. *Psychoneuroendocrinology*. 30(6):520–533.
- Lajud N., Roque A., Cajero M., Gutiérrez-Ospina G., Torner L. (2012). *Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hypo-responsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood*. *Psychoneuroendocrinology*. 37(3):410–420.
- Landgraf R., 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(3-4):150–176.
- Laviola G., Rea M., Morley-Fletcher S., Di Carlo S., Bacosi A., De Simone R., Bertini M., Pacifici R. (2004). *Beneficial effects of enriched environment on adolescent rats from stressed pregnancies*. *Eur. J. Neurosci*. 20(6):1655–1664.
- Law A.J., Pei Q., Feldon J., Pryce C.R., Harrison P.J. (2009). *Gene expression in the anterior cingulate cortex and amygdala of adolescent marmoset monkeys following parental separations in infancy*. *Int J Neuropsychopharmacol*. 12(6):761–772.
- LeDoux J.E., Iwata J., Cicchetti P., Reis D.J. (1988). *Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear*. *J Neurosci*. 8(7): 2517-2529.
- LeDoux J.E. (2000). *Emotion circuits in the brain*. *Annu. Rev. Neurosci*. 23(1):155–184.
- Lee R., Garcia F., van de Kar L.D., Hauger R.D., Coccaro E.F. (2003). *Plasma oxytocin in response to pharmacological challenge to D-fenfluramine and placebo in healthy men*. *Psychiatry Res*. 118(2):129–136.
- Lee H.-J., Lee M.-S., Kang R.-H., Kim H., Kim S.-D., Kee B.-S., Kim Y.H., Kim Y.K., Kim J.B., Yeon B.K., Oh K.S., Oh B.H., Yoon J.S., Lee C., Jung H.Y., Chee I.S., Paik I.H. (2005). *Influence of the serotonin transporter promoter gene polymorphism on susceptibility to posttraumatic stress disorder*. *Depress. Anxiety*. 21(3):135–139.
- Lehmann J., Russig H., Feldon J., Pryce C.R. (2002). *Effect of a single maternal separation at different pup ages on the corticosterone stress response in adult and aged rats*. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 73(1):141–145.
- Lemaire V., Koehl M., Le Moal M., Abrous D.N. (2000). *Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(20):11032–11037.
- Lemondé S., Turecki G., Bakish D., Du L., Hrdina P.D., Bown C.D., Sequeira A., Kushwaha N., Morris S.J., Basak A., Ou X.M., Albert P.R. (2003). *Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide*. *Journal of Neuroscience*. 23(25):8788–8799.
- Lesch K.-P., Bengel D., Heils A., Sabol S.Z., Greenberg B.D., Petri S., Benjamin J., Müller C.R., Hamer D.H., Murphy D.L. (1996). *Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region*. *Science*. 274(5292):1527–1531.
- Lesch K.-P., Gutknecht L. (2004). *Focus on the 5-HT_{1A} receptor: emerging role of a gene regulatory variant in psychopathology and pharmacogenetics*. *Int J Neuropsychopharmacol*. 7(4):381–385.
- Lesch K.-P., Araragi N., Waider J., van den Hove D., Gutknecht L. (2012). *Targeting brain serotonin synthesis: insights into neurodevelopmental disorders with long-term outcomes related to negative emotionality, aggression and antisocial behaviour*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 367(1601):2426–2443.
- Leussis M.P., Lawson K., Stone K., Andersen S.L. (2008). *The enduring effects of an adolescent social stressor on synaptic density, part II: poststress reversal of synaptic loss in the cortex by adinazolam and MK-801*. *Synapse*. 62(3):185–192.
- Levin A.P., Doran A.R., Liebowitz M.R., Fyer A.J., Gorman J.M., Klein D.F., Paul S.M. (1987). *Pituitary adrenocortical unresponsiveness in lactate-induced panic*. *Psychiatry Res*. 21(1):23–32.
- Levine S. (1957). *Infantile experience and resistance to physiological stress*. *Science*. 126(3720):405-406.
- Levine S. (1967). *Maternal and environmental influences on the adrenocortical response to stress in weanling rats*. *Science*. 156(3772):258–260.
- Levine S., Wiener S.G., Coe C.L. (1993). *Temporal and social factors influencing behavioral and hormonal responses to separation in mother and infant squirrel monkeys*. *Psychoneuroendocrinology*. 18(4):297-306.
- Lewis M., Ramsay D.S. (1995). *Developmental change in infants' responses to stress*. *Child Dev*. 66(3):657-670.

- Li Q., Battaglia G., Van de Kar L.D. (1997). *Autoradiographic evidence for differential G-protein coupling of 5-HT_{1A} receptors in rat brain: lack of effect of repeated injections of fluoxetine*. *Brain Res.* 769(1):141-151.
- Li Q., Wichems C.H., Ma L., Van de Kar L.D., Garcia F., Murphy D.L. (2003). *Brain region-specific alterations of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors in serotonin transporter knockout mice*. *J Neurochem.* 84(6):1256-1265.
- Liao X.M., Yang X.D., Jia J., Li J.T., Xie X.M., Su Y.A., Schmidt M.V., Si T.M., Wang X.D. (2014). *Blockade of corticotropin-releasing hormone receptor 1 attenuates early-life stress induced synaptic abnormalities in the neonatal hippocampus*. *Hippocampus.* 24(5):528-540.
- Liposits Z., Phelix C., Paull W.K. (1987). *Synaptic interaction of serotonergic axons and corticotropin releasing factor (crf) synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat - a light and electron microscopic immunocytochemical study*. *Histochemistry.* 86(6):541-549.
- Lippmann M., Bress A., Nemeroff C.B., Plotsky P.M., Monteggia, L.M. (2007). *Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats*. *Eur. J. Neurosci.* 25(10):3091-3098.
- Liu D., Diorio J., Day J.C., Francis D.D., Meaney M.J. (2000). *Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats*. *Nat. Neurosci.* 3(8):799-806.
- Llorente R., Miguel-Blanco C., Aisa B., Lachize S., Borcel E., Meijer O.C., Ramirez M.J., De Kloet E.R., Viveros M.P. (2011). *Long term sex-dependent psychoneuroendocrine effects of maternal deprivation and juvenile unpredictable stress in rats*. *J. Neuroendocrinol.* 23(4):329-344.
- Lo Iacono L., Gross C. (2008). *Alpha-Ca₂₊/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to the developmental programming of anxiety in serotonin receptor 1A knock-out mice*. *J Neurosci.* 28(24):6250-6257.
- Loi M., Sarabdjitsingh R.A., Tsouli A., Trinh S., Arp M., Krugers H.J., Karst H., van den Bos R., Joëls M. (2017a). *Transient prepubertal mifepristone treatment normalizes deficits in contextual memory and neuronal activity of adult male rats exposed to maternal deprivation*. *eNeuro.* 4(5):e0253.
- Loi M., Mossink J.C., Meerhoff G.F., Den Blaauwen J.L., Lucassen P.J., Joëls M. (2017b). *Effects of early-life stress on cognitive function and hippocampal structure in female rodents*. *Neuroscience.* 342:101-119.
- Lopez-Gimenez J.F., Vilaro M.T., Palacios J.M., Mengod G. (2001). *Mapping of 5-HT_{2A} receptors and their mRNA in monkey brain: [3H] MDL100,907 autoradiography and in situ hybridization studies*. *J Comp Neurol.* 429(4):571-589.
- Lovic V., Gonzalez A., Fleming A.S. (2001). *Maternally separated rats show deficits in maternal care in adulthood*. *Dev Psychobiol.* 39(1):19-33.
- Lovick T.A. (2006). *Plasticity of GABA_A receptor subunit expression during the oestrous cycle of the rat: implications for premenstrual syndrome in women*. *Exp Physiol.* 91(4):655-660.
- Lovick T.A. (2012). *Estrous cycle and stress: influence of progesterone on the female brain*. *Braz J Med Biol Res.* 45(4):314-320.
- Lowry C.A., Hale M.W., Evans A.K., Heerkens J., Staub D.R., Gasser P.J., Shekhar A. (2008). *Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1148:86-94.
- Lucki I. (1998). *The spectrum of behaviors influenced by serotonin*. *Biol. Psychiatry.* 44(3):151-162.
- Luecken L.J., MacKinnon D.P., Jewell S.L., Crnic K.A., Gonzales N.A. (2015). *Effects of prenatal factors and temperament on infant cortisol regulation in low-income Mexican American families*. *Dev. Psychobiol.* 57(8):961-973.
- Lukas M., Bredewold R., Landgraf R., Neumann I.D., Veenema A.H. (2011). *Early life stress impairs social recognition due to a blunted response of vasopressin release within the septum of adult male rats*. *Psychoneuroendocrinology* 36(6):843-853.
- Lukkes J.L., Forster G.L., Renner K.J., Summers C.H. (2008). *Corticotropin-releasing factor 1 and 2 receptors in the dorsal raphe differentially affect serotonin release in the nucleus accumbens*. *Eur. J. Pharmacol.* 578(2-3):185-193.
- Lukkes J.L., Summers C.H., Scholl J.L., Renner K.J., Forster G.L. (2009). *Early life social isolation alters corticotropin-releasing factor responses in adult rats*. *Neuroscience.* 158(2):845-855.

- Lukkes J.L., Norman K.J., Meda S., Andersen S.L. (2016). *Sex differences in the ontogeny of CRF receptors during adolescent development in the dorsal raphe nucleus and ventral tegmental area*. *Synapse*. 70(3):125–132.
- Lupien S.J., McEwen B.S., Gunnar M.R., Heim C. (2009). *Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition*. *Nat Rev Neurosci*. 10(6):434–445.
- Lyons D.M., Parker K.J., Katz M., Schatzberg A.F. (2009). *Developmental cascades linking stress inoculation, arousal regulation, and resilience*. *Front Behav Neurosci*. 3:32.
- Lyons D.M., Parker K.J., Schatzberg A.F. (2010). *Animal models of early life stress: implications for understanding resilience*. *Dev Psychobiol*. 52(7) :616–624.
- Maccari S., Piazza P.V., Kabbaj M., Barbazanges A., Simon H., Le Moal M. (1995). *Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress*. *J. Neurosci*. 15(1Pt1):110–116.
- Machluf Y., Gutnick A., Levkowitz G. (2011). *Development of the zebrafish hypothalamus*. *Ann N Y Acad Sci*. 1220(1):93–105.
- MacMillan H.L., Fleming J.E., Streiner D.L., Lin E., Boyle M.H., Jamieson E., Duku E.K., Walsh C.A., Wong M.Y., Beardslee W.R. (2001). *Childhood abuse and lifetime psychopathology in a community sample*. *Am. J. Psychiatry*. 158(11):1878–1883.
- Maercker A., Michael T., Fehm L., Becker E.S., Margraf J. (2004). *Age of traumatization as a predictor of post-traumatic stress disorder or major depression in young women*. *Br. J. Psychiatry*. 184:482–487.
- Maguire J.L., Stell B.M., Rafizadeh M., Mody I. (2005). *Ovarian cycle linked changes in GABA(A) receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety*. *Nat Neurosci*. 8(6) :797–804.
- Mairesse J., Lesage J., Breton C., Bréant B., Hahn T., Darnaudéry M., Dickson S.L., Seckl J., Blondeau B., Vieau D., Maccari S., Viltart O. (2007). *Maternal stress alters endocrine function of the fetoplacental unit in rats*. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 292(6):1526–1533.
- Mak P., Broussard C., Vacy K., Broadbear J.H. (2012). *Modulation of anxiety behavior in the elevated plus maze using peptidic oxytocin and vasopressin receptor ligands in the rat*. *Journal of Psychopharmacology*. 26(4):532–542.
- Makino S., Gold P. W., Schulkin J. (1994). *Corticosterone effects on corticotropin-releasing hormone mRNA in the central nucleus of the amygdala and the parvocellular region of the paraventricular nucleus of the hypothalamus*. *Brain Res*. 640(1-2):105–112.
- Malter Cohen M., Jing D., Yang R.R., Tottenham N., Lee F.S., Casey B.J. (2013). *Early-life stress has persistent effects on amygdala function and development in mice and humans*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(45):18274–18278.
- Mandyam C.D., Crawford E.F., Eisch A.J., Rivier C.L., Richardson H.N. (2008). *Stress experienced in utero reduces sexual dichotomies in neurogenesis, microenvironment, and cell death in the adult rat hippocampus*. *Dev. Neurobiol*. 68(5):575–589.
- Mantyh P.W. (1983a). *Connections of midbrain periaqueductal gray in the monkey: I: ascending efferent projections*. *J Neurophysiol*. 49(3):567–581.
- Mantyh P.W. (1983b). *Connections of midbrain periaqueductal gray in the monkey: II: descending efferent projections*. *J Neurophysiol*. 49(3):582–594.
- Maras P.M., Baram, T.Z. (2012). *Sculpting the hippocampus from within: stress, spines, and CRH*. *Trends Neurosci*. 35(5) :315–324.
- Marazziti D., Baroni S., Giannaccini G., Betti L., Massimetti G., Carmassi C., Catena-Dell'Osso M. (2012). *A link between oxytocin and serotonin in humans: supporting evidence from peripheral markers*. *Eur Neuropsychopharmacol*. 22(8): 578–583.
- Marcinkiewicz C.A., Mazzone C.M., D'Agostino G., Halladay L.R., Hardaway J.A., DiBerto J.F., Navarro M., Burnham N., Cristiano C., Dorrier C.E., Tipton G.J., Ramakrishnan C., Kozicz T., Deisseroth K., Thiele T.E., McElligott Z.A., Holmes A., Heisler L.K., Kash T.L. (2016). *Serotonin engages an anxiety and fear-promoting circuit in the extended amygdala*. *Nature*. 537(7618):97-101.
- Marco E.M., Llorente R., López-Gallardo M., Mela V., Llorente-Berzal Á., Prada C., Viveros M.P. (2015). *The maternal deprivation animal model revisited*. *Neurosci Biobehav Rev*. 51:151-163.

- Marcondes F.K., Miguel K.J., Melo L.L., Spadari-Bratfisch R.C. (2001). *Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test*. *Physiol Behav.* 74(4-5):435–440.
- Martin A.M., Young R.L., Leong L., Rogers G.B., Spencer N.J., Jessup C.F., Keating D.J. (2017). *The Diverse Metabolic Roles of Peripheral Serotonin*. *Endocrinology.* 158(5):1049-1063.
- Marusak H.A., Martin K.R., Etkin A., Thomason M.E. (2015). *Childhood trauma exposure disrupts the automatic regulation of emotional processing*. *Neuropsychopharmacology.* 40(5):1250–1258.
- Masson M., Bussieres E.-L., East-Richard C., Mercier A., Cellard C. (2015). *Neuropsychological profile of children, adolescents and adults experiencing maltreatment: a meta-analysis*. *Clin. Neuropsychol.* 29(5):573–594.
- May T., Adesina I., McGillivray J., Rinehart N.J. (2019). *Sex differences in neurodevelopmental disorders*. *Curr Opin Neurol.* 32(4):622-626.
- McAllister C., Creech R., Kimball P., Muma N., Li Q. (2012). *GPR30 is necessary for estradiol-induced desensitization of 5-HT 1A receptor signaling in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus*. *Psychoneuroendocrinology.* 37(8):1248–1260.
- McCarthy M.M. (2008). *Estradiol and the developing brain*. *Physiol Rev.* 88(1):91–124.
- McCormick C.M., Smythe J.W., Sharma S., Meaney M.J. (1995). *Sex specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats*. *Dev. Brain Res.* 84(1):55–61.
- McCormick C.M., Smith C., Mathews I.Z. (2008). *Effects of chronic social stress in adolescence on anxiety and neuroendocrine response to mild stress in male and female rats*. *Behav Brain Res.* 187(2):228–238.
- McDevitt R.A., Hiroi R., Mackenzie S.M., Robin N.C., Cohn A., Kim J.J., Neumaier J.F. (2011). *Serotonin 1B Autoreceptors Originating in the Caudal Dorsal Raphe Nucleus Reduce Expression of Fear and Depression-Like Behavior*. *Biol Psychiatry.* 69(8):780–787.
- McDonald A.J. (1982). *Neurons of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei: a Golgi study in the rat*. *J. Comp. Neurol.* 212(3):293–312.
- McDonald A.J. (1989). *Coexistence of somatostatin with neuropeptide Y, but not with cholecystokinin or vasoactive intestinal peptide, in neurons of the rat amygdala*. *Brain Res.* 500(1-2):37–45.
- McDonald A.J., Mascagni F., Guo L. (1996). *Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: A Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat*. *Neuroscience.* 71(1):55–75.
- McDonald A.J., Mascagni F. (1997). *Projections of the lateral entorhinal cortex to the amygdala: a phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat*. *Neuroscience.* 77 (2):445–459.
- McDonald A.J., Mascagni F. (2007). *Neuronal localization of 5-HT type 2A receptor immunoreactivity in the rat basolateral amygdala*. *Neuroscience.* 146(1): 306–320.
- McEwen B.S. (2003). *Mood disorders and allostatic load*. *Biol. Psychiatry.* 54(3): 200–207.
- McEwen B.S., Gianaros P.J. (2011). *Stress- and allostasis-induced brain plasticity*. *Annu Rev Med* 62:431–45.
- McEwen B.S., Bowles N.P., Gray J.D., Hill M.N., Hunter R.G., Karatsoreos I.N., Nasca C. (2015). *Mechanisms of stress in the brain*. *Nat Neurosci.* 18(10):1353-1363.
- McEwen B.S., Nasca C., Gray J.D. (2016). *Stress effects on neuronal structure: hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex*. *Neuropsychopharmacology* 41(1):3–323.
- McGowan P.O., Sasaki A., D'Alessio A.C., Dymov S., Labonté B., Szyf M., Turecki G., Meaney M.J. (2009). *Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse*. *Nat Neurosci.* 12(3):342-348.
- McGowan P.O., Roth T.L. (2015). *Epigenetic pathways through which experiences become linked with biology*. *Dev Psychopathol.* 27(2):637–648.
- McIlwrick S., Rechenberg A., Matthes M., Burgstaller J., Schwarzbauer T., Chen A., Touma C. (2016). *Genetic predisposition for high stress reactivity amplifies effects of early-life adversity*. *Psychoneuroendocrinology.* 70:85-97.

- McIntosh J., Anisman H., Merali Z. (1999). *Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects*. Brain Res Dev Brain Res. 113(1-2):97–106.
- McLean A.C., Valenzuela N., Fai S., Bennett S.A.L. (2012). *Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification*. J. Visual. Exp. 67:e4389.
- McQuade R., Sharp T. (1997). *Functional mapping of dorsal and median raphe 5-hydroxytryptamine pathways in forebrain of the rat using microdialysis*. J Neurochem. 69(2):791–796.
- Meaney M.J., Aitken D.H., Bodnoff S.R., Iny L.J., Tatarewicz J.E., Sapolsky R.M. (1985). *Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor concentrations in selected brain regions*. Behav. Neurosci. 99(4):765–770.
- Meaney M.J. (2001). *Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations*. Ann. Rev. Neurosci. 24:1161–1192.
- Meller E., Goldstein M., Bohmaker K. (1990). *Receptor reserve for 5-hydroxytryptamine_{1A}-mediated inhibition of serotonin synthesis: possible relationship to anxiolytic properties of 5hydroxytryptamine_{1A} agonists*. Mol Pharmacol. 37(2) :231-237.
- de Menezes R.C., Zaretsky D.V., Fontes M.A., DiMicco J.A. (2009). *Cardiovascular and thermal responses evoked from the periaqueductal grey require neuronal activity in the hypothalamus*. J Physiol 587(Pt6):1201–1215.
- Miller R., Wankerl M., Stalder T., Kirschbaum C., Alexander N. (2013). *The serotonin transporter gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) and cortisol stress reactivity: A meta-analysis*. Mol. Psychiatry. 18(9):1018–1024.
- Millhouse O.E., DeOlmos J. (1983). *Neuronal configurations in lateral and basolateral amygdala*. Neuroscience. 10(4):1269–1300.
- Millstein R.A., Holmes A. (2007). *Effects of repeated maternal separation on anxiety and depression-related phenotypes in different mouse strains*. Neurosci Biobehav Rev. 31(1):3-17.
- Miquel M.C., Doucet E., Boni C., El Mestikawy S., Matthiessen L., Daval G., Verge D, Hamon M. (1991). *Central serotonin 1A receptors: respective distributions of encoding mRNA, receptor protein and binding sites by in situ hybridization histochemistry, radioimmunohistochemistry and autoradiographic mapping in the rat brain*. Neurochem Int. 19(4):453–465.
- Mitsushima D., Yamada K., Takase K., Funabashi T., Kimura F. (2006). *Sex differences in the basolateral amygdala: the extracellular levels of serotonin and dopamine, and their responses to restraint stress in rats*. Eur J Neurosci 24(11):3245–3254.
- Mo B., Feng N., Renner K., Forster G. (2008). *Restraint stress increases serotonin release in the central nucleus of the amygdala via activation of corticotropin-releasing factor receptors*. Brain Res Bull. 76(5):493-498.
- Mobbs D., Petrovic P., Marchant J.L., Hassabis D., Weiskopf N., Seymour B., Dolan R.J., Frith C.D. (2007). *When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans*. Science. 317(5841):1079–1083.
- Molet J., Maras P.M., Avishai-Eliner S., Baram T.Z. (2014). *Naturalistic rodent models of chronic early-life stress*. Dev Psychobiol. 56(8):1675–1688.
- Molet J., Heins K., Xhuo X., Regev L., Baram T.Z., Stern H. (2016). *Fragmentation and high entropy of neonatal experience predict adolescent emotional outcome*. Transl Psychiatry 6(1):e702.
- dalle Molle R., Portella A.K., Goldani M.Z., Kapczinski F.P., Leistner-Segal S., Salum G.A., Manfro G.G., Silveira P.P. (2012). *Associations between parenting behavior and anxiety in a rodent model and a clinical sample: relationship to peripheral BDNF levels*. Transl Psychiatry 2(11): e195.
- Molliver M.E. (1987). *Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function*. J. Clin. Psychopharmacol. 7, Suppl 6 :35–235.
- Mora S., Dussaubat N., Díaz-Véliz G. (1996). *Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats*. Psychoneuroendocrinology. 21(7):609–620.
- Moriceau S., Wilson D.A., Levine S., Sullivan R.M. (2006). *Dual circuitry for odor-shock conditioning during infancy: corticosterone switches between fear and attraction via amygdala*. J. Neurosci. 26(25):6737–6748.

- Moriceau S., Shionoya K., Jakubs K., Sullivan R.M. (2009). *Early-life stress disrupts attachment learning: the role of amygdala corticosterone, locus ceruleus corticotropin releasing hormone, and olfactory bulb norepinephrine*. J Neurosci. 29(50): 15745–15755.
- Morrison S.E., Salzman C.D. (2010). *Re-valuing the amygdala*. Curr.Opin. Neurobiol. 20(2):221–230.
- Mosienko V., Bert B., Beis D., Matthes S., Fink H., Bader M., Alenina N. (2012). Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. Transl Psychiatry. 2(5):e122.
- Mosienko V., Matthes S., Hirth N., Beis D., Flinders M., Bader M., Hansson A.C., Alenina N. (2014). *Adaptive changes in serotonin metabolism preserve normal behavior in mice with reduced tph2 activity*. Neuropharmacology. 85.:73–80.
- Mosienko V., Beis D., Pasqualetti M., Waider J., Matthes S., Qadri F., Bader M., Alenina N. (2015). *Life without brain serotonin: reevaluation of serotonin function with mice deficient in brain serotonin synthesis*. Behav. Brain Res. 277 :78–88.
- Mottotese R., Redouté J., Costes N., Le Bars D., Sirigu A. (2014). *Switching brain serotonin with oxytocin*. Proc Natl Acad Sci U S A. 111(23):8637-8642.
- Mueller B.R., Bale T.L. (2008). *Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy*. J Neurosci. 28(36):9055–9065.
- Muller J.F., Mascagni F., McDonald A.J. (2007). *Serotonin-immunoreactive axon terminals innervate pyramidal cells and interneurons in the rat basolateral amygdala*. J. Comp. Neurol. 505(3):314–335.
- Murphy B.E., Clark S.J., Donald I.R., Pinsky M., Vedady D. (1974). *Conversion of maternal cortisol to cortisone during placental transfer to the human fetus*. Am J Obstet Gynecol. 118(4):538–541.
- Mychasiuk R., Ilnytskyy S., Kovalchuk O., Kolb B., Gibb R. (2011). *Intensity matters: brain, behaviour and the epigenome of prenatally stressed rats*. Neuroscience. 180:105-110.
- Namburi P., Beyeler A., Yoroza S., Calhoon G.G., Halbert S.A., Wichmann R., Holden S.S., Mertens K.L., Anahtar M., Felix-Ortiz A.C., Wickersham I.R., Gray J.M., Tye K.M. (2015). *A circuit mechanism for differentiating positive and negative associations*. Nature. 520(7549):675–678.
- Naninck E.F., Hoeijmakers L., Kakava-Georgiadou N., Meesters A., Lazic S.E., Lucassen P.J., Korosi A. (2015). *Chronic early life stress alters developmental and adult neurogenesis and impairs cognitive function in mice*. Hippocampus. 25(3): 309–328.
- Nashold B.S. Jr, Wilson W.P., Slaughter D.G. (1969). *Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man*. J Neurosurg. 30(1):14–24.
- Nautiyal K.M., Tritschler L., Ahmari S.E., David D.J., Gardier A.M., Hen R. (2016). *A lack of serotonin 1B autoreceptors results in decreased anxiety and depression-related behaviors*. Neuropsychopharmacology. 41(12):2941–2950.
- Nederhof E., Schmidt M. V. (2012). *Mismatch or cumulative stress: toward an integrated hypothesis of programming effects*. Physiol. Behav. 106(5):691–700.
- Nelson C.A. 3rd, Zeanah C.H., Fox N.A., Marshall P.J., Smyke A.T., Guthrie D. (2007). *Cognitive recovery in socially deprived young children: the Bucharest Early Intervention Project*. Science. 318(5858):1937–1940.
- Nemeroff C.B. (2008). *Understanding the pathophysiology of postpartum depression: implications for the development of novel treatments*. Neuron. 59(2):185–186.
- Nemeroff C.B. (2016). *Paradise lost: the neurobiological and clinical consequences of child abuse and neglect*. Neuron. 89(5):892–909.
- Neumeister A., Bain E., Nugent A.C., Carson R.E., Bonne O., Luckenbaugh D.A., Eckelman W., Herscovitch P., Charney D.S., Drevets W.C. (2004). *Reduced serotonin type 1A receptor binding in panic disorder*. J Neurosci. 24(3):589–591.
- Nichols D.E., Nichols C.D. (2008). *Serotonin receptors*. Chem Rev. 108(5):1614-1641.
- Nishi M., Horii-Hayashi N., Sasagawa T. (2014). *Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents*. Front Neurosci. 8: 166.

- Nishizawa S., Benkelfat C., Young S.N., Leyton M., Mzengeza S., de Montigny C., Blier P., Diksic M. (1997). *Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human brain*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 94(10):5308–5313.
- Nist M.D. (2017). *Biological embedding: evaluation and analysis of an emerging concept for nursing scholarship*. J Adv Nurs. 73(2):349-360.
- Nolten W.E., Rueckert P.A. (1981). *Elevated free cortisol index in pregnancy: possible regulatory mechanisms*. Am J Obstet Gynecol. 139(4):492–498.
- Novick A.M., Levandowski M.L., Laumann L.E., Philip N.S., Price L.H., Tyrka A.R. (2018). *The effects of early life stress on reward processing*. J Psychiatr Res. 101:80-103.
- Oberlander T.F., Weinberg J., Papsdorf M., Grunau R., Misri S., Devlin A.M. (2008). *Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses*. Epigenetics. 3(2):97–106.
- Oberlander T.F., Gingrich J.A., Ansorge M.S. (2009). *Sustained neurobehavioral effects of exposure to SSRI antidepressants during development: molecular to clinical evidence*. Clin Pharmacol Ther. 86(6):672–677.
- O'Donnell K.J., Jensen A.B., Freeman L., Khalife N., O'Connor T.G., Glover V. (2012). *Maternal prenatal anxiety and downregulation of placental 11beta-HSD2*. Psychoneuroendocrinology. 37(6):818–826.
- van Oers H.J., de Kloet E.R., Levine S. (1997). *Persistent, but paradoxical, effects on HPA regulation of infants maternally deprived at different ages*. Stress. 1(4): 249–261.
- van Oers H.J., de Kloet E.R., Whelan T., Levine S. (1998a). *Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone*. J. Neurosci. 18(23) :10171–10179.
- van Oers H.J., de Kloet E.R., Levine S. (1998b). *Early vs. late maternal deprivation differentially alters the endocrine and hypothalamic responses to stress*. Dev. Brain Res. 111(2):245–252.
- Olivier J.D., Van Der Hart M.G., Van Swelm R.P., Dederen P.J., Homberg J.R., Cremers T., Deen P.M., Cuppen E., Cools A.R., Ellenbroek B.A. (2008). *A study in male and female 5-HT transporter knockout rats: an animal model for anxiety and depression disorders*. Neuroscience. 152(3):573-84.
- Onaivi E.S., Martin B.R. (1989). *Neuropharmacological and physiological validation of a computer-controlled two-compartment black and white box for the assessment of anxiety*. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat. 13(6):963–976.
- Onaka T., Yagi K. (1993). *Effects of novelty stress on vasopressin and oxytocin secretion by the pituitary in the rat*. J Neuroendocrinol. 5(4):365-369.
- Oomen C.A., Soeters H., Audureau N., Vermunt L., van Hasselt F.N., Manders E.M., Joëls M., Lucassen P.J., Krugers H. (2010). *Severe early life stress hampers spatial learning and neurogenesis, but improves hippocampal synaptic plasticity and emotional learning under high-stress conditions in adulthood*. J. Neurosci. 30(19):6635–6645.
- Opendak M., Gould E., Sullivan R. (2017). *Early life adversity during the infant sensitive period for attachment: Programming of behavioral neurobiology of threat processing and social behavior*. Dev. Cogn. Neurosci. 25:145–159.
- Own L.S., Patel P.D. (2013). *Maternal behavior and offspring resiliency to maternal separation in C57Bl/6 Mice*. Horm. Behav. 63(3):411–417.
- Palanza P. (2001). *Animal models of anxiety and depression: how are females different?* Neurosci. Biobehav. Rev. 25(3): 219–233.
- Palanza P., Parmigiani S. (2017). *How does sex matter? Behavior, stress and animal models of neurobehavioral disorders*. Neurosci. Biobehav. Rev. 76(PtA):134–143.
- Parent A., Descarries L., Beaudet A. (1981). *Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [3H]5-hydroxytryptamine*. Neuroscience. 6(2):115–138.
- Pariante C.M. (2006). *The glucocorticoid receptor: part of the solution or part of the problem?* J. Psychopharmacol. 20 (Suppl4):79–84.

- Pariante C.M., Lightman S.L. (2008). *The HPA axis in major depression: classical theories and new developments*. Trends Neurosci. 31(9) :464–468.
- Passani M.B., Pugliese A.M., Azzurrini M., Corradetti R. (1994). *Effects of DAU 6215, a novel 5-hydroxytryptamine₃ (5-HT₃) antagonist on electrophysiological properties of the rat hippocampus*. Br J Pharmacol. 112(2) :695-703.
- Pasqualetti M., Ori M., Castagna M., Marazziti D., Cassano G.B., Nardi I. (1999). *Distribution and cellular localization of the serotonin type 2C receptor messenger RNA in human brain*. Neuroscience. 92(2):601–611.
- Patton G., Hibbert M., Carlin J., Shao Q., Rosier M., Caust J., Bowes G. (1996). *Menarche and the onset of depression and anxiety in Victoria, Australia*. Journal of Epidemiology and Community Health. 50(6):661–666.
- Paul E.D., Lowry C.A. (2013). *Functional topography of serotonergic systems supports the Deakin/Graeff hypothesis of anxiety and affective disorders*. J. Psychopharmacol. 27(12):1090–1106.
- Paul E.D., Johnson, P.L., Shekhar, A., Lowry, C.A. (2014). *The Deakin/Graeff hypothesis: focus on serotonergic inhibition of panic*. Neurosci. Biobehav. Rev. 46.(Pt3):379-396.
- Pecins-Thompson M., Bethea C.L. (1999). *Ovarian steroid regulation of serotonin-1A autoreceptor messenger RNA expression in the dorsal raphe of rhesus macaques*. Neuroscience. 89(1):267–277.
- Pellow S., File S.E. (1986). *Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat*. Pharmacol Biochem Behav. 24(3):525-529.
- Pernar L., Curtis A.L., Vale W.W., Rivier J.E., Valentino R.J. (2004). *Selective activation of corticotropin-releasing factor-2 receptors on neurochemically identified neurons in the rat dorsal raphe nucleus reveals dual actions*. J Neurosci. 24(6):1305–1311.
- Perroud N., Paoloni-Giacobino A., Prada P., Olié E., Salzmann A., Nicastro R., Guillaume S., Mouthon D., Stouder C., Dieben K., Huguelet P., Courtet P., Malafosse A. (2011). *Increased methylation of glucocorticoid receptor gene (NR3C1) in adults with a history of childhood mal-treatment: a link with the severity and type of trauma*. Transl Psychiatry. 1(12):e59.
- Peyron C., Petit J.-M., Rampon C., Jouvét M., Luppi P.-H. (1998). *Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods*. Neuroscience. 82(2):443–468.
- Pezawas L., Meyer-Lindenberg A., Drabant E.M., Verchinski B.A., Munoz K.E., Kolachana B.S., Egan M.F., Mattay V.S., Hariri A.R., Weinberger D.R. (2005). *5-HTTLPR polymorphism impacts human cingulate-amygdala interactions: a genetic susceptibility mechanism for depression*. Nat. Neurosci. 8(6):828–834.
- Pigott T.A. (2003). *Anxiety disorders in women*. Psychiatr Clin North Am. 26(3):621–672.
- Pihoker C., Owens M.J., Kuhn C.M., Schanberg S.M., Nemeroff C.B. (1993). *Maternal separation in neonatal rats elicits activation of the hypothalamic-pituitary-adreno-cortical axis: A putative role for corticotropin-releasing factor*. Psychoneuroendocrinology. 18(7):485–493.
- Pitkänen A., Stefanacci L., Farb C.R., Go G.G., LeDoux J.E., Amaral D.G. (1995). *Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the lateral nucleus*. J. Comp. Neurol. 356(2):288–310.
- Plescia F., Marino R.A., Navarra M., Gambino G., Brancato A., Sardo P., Cannizzaro C. (2014). *Early handling effect on female rat spatial and non-spatial learning and memory*. Behav Process. 103:9-16.
- Plotsky P.M., Meaney M.J. (1993). *Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats*. Mol. Brain Res. 18(3):195–200.
- Plotsky P.M., Thirivikraman K.V., Nemeroff C.B., Caldji C., Sharma S., Meaney M.J. (2005). *Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring*. Neuropsychopharmacology. 30:2192–2204.
- Pobbe R.L., Zangrossi H., Jr. (2005). *5-HT(1A) and 5-HT(2A) receptors in the rat dorsal periaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus*. Psychopharmacology. 183(3):314–321.

- Pobbe R.L., Zangrossi H. Jr, Blanchard D.C., Blanchard R.J. (2011). *Involvement of dorsal raphe nucleus and dorsal periaqueductal gray 5-HT receptors in the modulation of mouse defensive behaviors*. *Eur Neuropsychopharmacol*. 21(4):306–315.
- Pohl J., Olmstead M.C., Wynne-Edwards K.E., Harkness K., Menard J.L. (2007). *Repeated exposure to stress across the childhood-adolescent period alters rats' anxiety- and depression-like behaviors in adulthood: the importance of stressor type and gender*. *Behav Neurosci*. 121(3):462–474.
- Pollak S.D., Sinha P. (2002). *Effects of early experience on children's recognition of facial displays of emotion*. *Dev. Psychol*. 38(5):784–791.
- Pollak S.D., Tolley-Schell S.A. (2003). *Selective attention to facial emotion in physically abused children*. *J. Abnorm. Psychol*. 112(3):323–338.
- Porrino L.J., Goldman-Rakic P.S. (1982). *Brainstem innervation of prefrontal and anterior cingulate cortex in the rhesus monkey revealed by retrograde transport of HRP*. *J Comp Neurol*. 205(1):63–76.
- Post R.M., Altshuler L.L., Leverich G.S., Frye M.A., Suppes T., McElroy S.L., Keck P.E. Jr, Nolen W.A., Kupka R.W., Grunze H., Rowe M. (2013). *Role of childhood adversity in the development of medical comorbidities associated with bipolar disorder*. *J Affect Disord*. 147(1-3):288-94.
- Preskorn S., Ross R., Stanga C. (2004). *Selective serotonin reuptake inhibitors in Antidepressants: Past, Present and Future*, Preskorn S. H., Feighner J. P., Stanga C. Y., Ross R. (edit.) Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 241–262.
- Preter M., Klein D.F. (2008). *Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 32(3):603-612.
- Prossnitz E.R., Arterburn J.B., Smith H.O., Oprea T.I., Sklar L.A., Hathaway H.J. (2008). *Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30*. *Annual Review of Physiology*. 70:165–190.
- Provençal N., Binder E.B. (2015a). *The effects of early life stress on the epigenome: from the womb to adulthood and even before*. *Exp Neurol*. 268:10-20.
- Provençal N., Binder E.B. (2015b). *The neurobiological effects of stress as contributors to psychiatric disorders: focus on epigenetics*. *Curr Opin Neurobiol*. 30:31–37.
- Pryce C.R., Bettschen D., Nanz-Bahr N.I., Feldon J. (2003). *Comparison of the effects of early handling and early deprivation on conditioned stimulus, context, and spatial learning and memory in adult rats*. *Behav. Neurosci*. 117(5):883–893.
- Qin C., Li J., Tang K. (2018). *The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus: Development, Function, and Human Diseases*. *Endocrinology*. 159(9):3458-3472.
- Radley J.J., Arias C.M., Sawchenko P.E. (2006). *Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress*. *J. Neurosci*. 26(50):12967–12976.
- Radley J.J., Rocher A.B., Rodriguez A., Ehlenberger D.B., Dammann M., McEwen B.S., Morrison J.H., Wearne S.L., Hof P.R. (2008). *Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex*. *J Comp Neurol*. 507(1):1141–1150.
- Raineki C., Holman P.J., Debiec J., Bugg M., Beasley A., Sullivan R.M. (2010). *Functional emergence of the hippocampus in context fear learning in infant rats*. *Hippocampus*. 20(9):1037–1046.
- Raineki C., Cortes M.R., Belnoue L., Sullivan R.M. (2012). *Effects of early-life abuse differ across development: infant social behavior deficits are followed by adolescent depressive-like behaviors mediated by the amygdala*. *J Neurosci*. 32(22):7758–7765.
- Rainey W.E., Rehman K.S., Carr B.R. (2004). *Fetal and maternal adrenals in human pregnancy*. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 31(4):817–835.
- Rainnie D.G. (1999). *Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat basolateral amygdala*. *J Neurophysiol*. 82(1):69-85.
- Ramboz S., Oosting R., Amara D.A., Kung H.F., Blier P., Mendelsohn M., Mann J.J., Brunner D., Hen R. (1998). *Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(24):14476–14481.

- Refojo D., Holsboer F. (2009). *CRH signaling. Molecular specificity for drug targeting in the CNS*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1179: 106–119.
- Reiman E.M., Raichle M.E., Robins E., Mintun M.A., Fusselman M.J., Fox P.T., Price J.L., Hackman K.A. (1989). *Neuroanatomical correlates of a lactate-induced anxiety attack*. Arch Gen Psychiatry. 46(6):493–500.
- Reimer A.E., de Oliveira A.R., Brandao M.L. (2012). *Glutamatergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray matter modulate the expression of conditioned freezing and fear-potentiated startle*. Neuroscience. 219:72–81.
- Renard G.M., Rivarola M.A., Suarez M.M. (2007). *Sexual dimorphism in rats: effects of early maternal separation and variable chronic stress on pituitary-adrenal axis and behavior*. Int. J. Dev. Neurosci. 25(6):373–379.
- Renard G.M., Rivarola M.A., Suarez M.M. (2010). *Gender-dependent effects of early maternal separation and variable chronic stress on vasopressinergic activity and glucocorticoid receptor expression in adult rats*. Dev. Neurosci. 32(1):71–80.
- Reshetnikov V.V., Kovner A.V., Lepeshko A.A., Pavlov K.S., Grinkevich L.N., Bondar N.P. (2018). *Stress early in life leads to cognitive impairments, reduced numbers of CA3 neurons and altered maternal behavior in adult female mice*. Genes Brain Behav. 19(3):e12541.
- Reynolds D.V. (1969). *Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation*. Science 164(3878):444–445.
- Reynolds R.M., Labad J., Buss C., Ghaemmaghami P., Räikkönen K. (2013). *Transmitting biological effects of stress in utero: implications for mother and offspring*. Psychoneuroendocrinology. 38(9):1843–1849.
- Ribatti D., Nico B., Crivellato E., Artico M. (2006). *Development of the blood-brain barrier: a historical point of view*. Anat. Rec. B New Anat. 289(1):3–8.
- Rice C.J., Sandman C.A., Lenjavi M.R., Baram T.Z. (2008). *A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress*. Endocrinology 149(10):4892–4900.
- Richardson-Jones J.W., Craige C.P., Nguyen T.H., Kung H.F., Gardier A.M., Dranovsky A., David D.J., Guiard B.P., Beck S.G., Hen R., Leonardo E.D. (2011). *Serotonin-1A autoreceptors are necessary and sufficient for the normal formation of circuits underlying innate anxiety*. J Neurosci. 31(16):6008–6018.
- Rincón-Cortés M., Sullivan R.M. (2014). *Early life trauma and attachment: immediate and enduring effects on neurobehavioral and stress axis development*. Front Endocrinol (Lausanne). 5:33.
- Rizvi T.A., Ennis M., Behbehani M.M., Shipley M.T. (1991). *Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity*. J Comp Neurol. 303(1):121–131.
- Rohleder N., Joksimovic L., Wolf J.M., Kirschbaum C. (2004). *Hypocortisolism and increased glucocorticoid sensitivity of pro-inflammatory cytokine production in Bosnian war refugees with posttraumatic stress disorder*. Biol. Psychiatry. 55(7):745–751.
- Romeo E., Ströhle A., Spalletta G., di Michele F., Hermann B., Holsboer F., Pasini A., Rupprecht R. (1998). *Effects of antidepressant treatment on neuroactive steroids in major depression*. Am J Psychiatry 155(7):910–913.
- Romeo R.D., Mueller A., Sisti H.M., Ogawa S., McEwen B.S., Brake W.G. (2003). *Anxiety and fear behaviors in adult male and female C57BL/6 mice are modulated by maternal separation*. Horm Behav. 43(5):561–567.
- Roncon C.M., Biesdorf C., Santana R.G., Zangrossi H. Jr, Graeff F.G., Audi E.A. (2012). *The panicolytic-like effect of fluoxetine in the elevated T maze is mediated by serotonin-induced activation of endogenous opioids in the periaqueductal gray*. J Psychopharmacol. 26(4):525–531.
- Rooszendaal B., Hui G.K., Hui I.R., Berlau D.J., McGaugh J.L., Weinberger N.M. (2006). *Basolateral amygdala noradrenergic activity mediates corticosterone-induced enhancement of auditory fear conditioning*. Neurobiol Learn Mem. 86(3):249–255.
- Rossi D.V., Dai Y., Thomas P., Carrasco G.A., Don Carlos L.L., Muma N.A., Li Q. (2010). *Estradiol-induced desensitization of 5-HT_{1A} receptor signaling in the paraventricular nucleus of the hypothalamus is independent of estrogen receptor-beta*. Psychoneuroendocrinology. 35(7):1023–1033.

- Rots N.Y., de Jong J., Workel J.O., Levine S., Cools A.R., De Kloet E.R. (1996). *Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary-adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine*. *J Neuroendocrinol.* 8(7):501-506.
- Roy A., Gorodetsky E., Yuan Q., Goldman D., Enoch M.A. (2010). *Interaction of FKBP5, a stress-related gene, with childhood trauma increases the risk for attempting suicide*. *Neuropsychopharmacology.* 35(8):1674–1683.
- Rozeske R.R., Evans A.K., Frank M.G., Watkins L.R., Lowry C.A., Maier S.F. (2011). *Uncontrollable, But Not Controllable, Stress Desensitizes 5-HT_{1A} Receptors in the Dorsal Raphe Nucleus*. *J Neurosci.* 31(40):14107–14115.
- Rüedi-Bettschen D., Zhang W., Russig H., Ferger B., Weston A., Pedersen E.-M., Feldon J., Pryce C.R. (2006). *Early deprivation leads to altered behavioural, autonomic and endocrine responses to environmental challenge in adult Fischer rats*. *Eur. J. Neurosci.* 24(10):2879–2893.
- Sabihi S., Durosko N.E., Dong S.M., Leuner B. (2014). *Oxytocin in the prelimbic medial prefrontal cortex reduces anxiety-like behavior in female and male rats*. *Psychoneuroendocrinology.* 45:31-42.
- Sachs B.D., Rodriguiz R.M., Tran H.L., Iyer A., Wetsel W.C., Caron M.G. (2015). *Serotonin deficiency alters susceptibility to the long-term consequences of adverse early life experience*. *Psychoneuroendocrinology.* 53:69–81.
- Sadler T.R., Nguyen P.T., Yang J., Givrad T.K., Mayer E.A., Maarek J.M., Hinton D.R., Holschneider D.P. (2011). *Antenatal maternal stress alters functional brain responses in adult offspring during conditioned fear*. *Brain Res.* 1385:163–174.
- Saha S., Gamboa-Esteves F.O., Batten T.F.C. (2010). *Differential distribution of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B}-like immunoreactivities in rat central nucleus of the amygdala neurones projecting to the caudal dorsomedial medulla oblongata*. *Brain Res.* 1330:20–30.
- Sahingoz M., Uguz F., Gezgin K. (2011). *Prevalence and related factors of mood and anxiety disorders in a clinical sample of postmenopausal women*. *Perspectives in Psychiatric Care.* 47(4):213–219.
- Saijo K., Collier J.G., Li A.C., Katzenellenbogen J.A., Glass C.K. (2011). *An ADIOL-ER β -CtBP transrepression pathway negatively regulates microglia-mediated inflammation*. *Cell.* 145(4):584–595.
- Sanchez M.M., Noble P.M., Lyon C.K., Plotsky P.M., Davis M., Nemeroff C.B., Winslow J.T. (2005). *Alterations in diurnal cortisol rhythm and acoustic startle response in nonhuman primates with adverse rearing*. *Biol. Psychiatr.* 57(4):373–381.
- Sanchez M.M., McCormack K., Grand A.P., Fulks R., Graff A., Maestripieri D. (2010a). *Effects of sex and early maternal abuse on adrenocorticotropin hormone and cortisol responses to the corticotropin-releasing hormone challenge during the first 3 years of life in group-living rhesus monkeys*. *Dev Psychopathol* 22(1):45– 53.
- Sanchez R.L., Reddy A.P., Bethea C.L. (2010b). *Ovarian steroid regulation of the midbrain corticotropin releasing factor and urocortin systems in macaques*. *Neuroscience.* 171(3):893–909.
- Sandi C., Haller J. (2015). *Stress and the social brain: behavioural effects and neurobiological mechanisms*. *Nat. Rev. Neurosci.* 16(5):290–304.
- Santarelli S., Lesuis S.L., Wang X.D., Wagner K.V., Hartmann J., Labermaier C., Scharf S.H., Müller M.B., Holsboer F., Schmidt M.V. (2014). *Evidence supporting the match/mismatch hypothesis of psychiatric disorders*. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 24(6):907–918.
- Savignac H.M., Dinan T.G., Cryan J.F. (2011). *Resistance to early-life stress in mice: effects of genetic background and stress duration*. *Front Behav Neurosci.* 5:13.
- Sawchenko P.E., Swanson L.W., Steinbusch H.W., Verhofstad A.A. (1983). *The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat*. *Brain Res.* 277(2):355–360.
- Schenberg L.C., Vasquez E.C., da Costa M.B. (1993). *Cardiac baroreflex dynamics during the defence reaction in freely moving rats*. *Brain Res.* 621(1):50–58.
- Schiller L., Jahkel M., Kretzschmar M., Brust P., Oehler J. (2003). *Autoradiographic analyses of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors after social isolation in mice*. *Brain Res.* 980(2):169–178.
- Schmidt M.V., Enthoven L., van der Mark M., Levine S., de Kloet E.R., Oitzl M.S. (2003). *The postnatal development of the hypothalamic- pituitary- adrenal axis in the mouse*. *Int J Dev Neurosci.* 21(3):125-132.

- Schmidt M.V., Levine S., Oitzl M.S., van der Mark M., Müller M.B., Holsboer F., de Kloet E.R. (2005). *Glucocorticoid receptor blockade disinhibits pituitary-adrenal activity during the stress hyporesponsive period of the mouse*. *Endocrinology*. 146(3):1458-1464.
- Schoebi D., Way B.M., Karney B.R., Bradbury T.N. (2012). *Genetic moderation of sensitivity to positive and negative affect in marriage*. *Emotion* 12(2):208–212.
- Schulkin J. (2006). *Angst and the amygdala*. *Dialogues Clin. Neurosci.* 8(4):407–416.
- Schwabe L., Joëls M., Roozendaal B., Wolf O.T., Oitzl M.S. (2011). *Stress effects on memory: an update and integration*. *Neurosci Biobehav Rev.* 36(7):1740–1749.
- Seibenhener M.L., Wooten M.C. (2015). *Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice*. *J. Visual. Exp.* 96:e52434.
- Seidel K., Helmeke C., Poeggel G., Braun K. (2008). *Repeated neonatal separation stress alters the composition of neurochemically characterized interneuron subpopulations in the rodent dentate gyrus and basolateral amygdala*. *Dev Neurobiol.* 68(9):1137-1152.
- Sengupta A., Bocchio M., Bannerman D.M., Sharp T., Capogna M. (2017). *Control of amygdala circuits by 5-HT neurons via 5-HT and glutamate co-transmission*. *J. Neurosci.* 37(7):1785–1796.
- Shah B.P., Vong L., Olson D.P., Koda S., Krashes M.J., Ye C., Yang Z., Fuller P.M., Elmquist J.K., Lowell B.B. (2014). *MC4R-expressing glutamatergic neurons in the paraventricular hypothalamus regulate feeding and are synaptically connected to the parabrachial nucleus*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 111(36):13193–13198.
- Sheridan M.A., McLaughlin K.A. (2014). *Dimensions of early experience and neural development: deprivation and threat*. *Trends Cogn Sci* 18(11): 580–585.
- Shimada T., Matsumoto K., Osanai M., Matsuda H., Terasawa K., Watanabe H. (1995). *The modified light/dark transition test in mice: evaluation of classic and putative anxiolytic and anxiogenic drugs*. *Gen. Pharmacol.* 26(1):205–210.
- Sigmon S., Fink C., Rohan K., Hotovy L. (1996). *Anxiety sensitivity and menstrual cycle reactivity: psychological and self-report differences*. *Journal of Anxiety Disorders.* 10(5):393–410.
- Sigmon S.T., Dorhofer D.M., Rohan K.J., Hotovy L.A., Boulard N.E., Fink C.M. (2000). *Psychophysiological, somatic, and affective changes across the menstrual cycle in women with panic disorder*. *J Consult Clin Psychol.* 68(3):425–431.
- di Simplicio M., Massey-Chase R., Cowen P., Harmer C.J. (2009). *Oxytocin enhances perception and memory for positive versus negative emotional information in healthy male volunteers*. *J Psychopharmacol* 23(3):241–248.
- Sink K.S., Walker D.L., Freeman S.M., Flandreau E.I., Ressler K.J., Davis M. (2013). *Effects of continuously enhanced corticotropin releasing factor expression within the bed nucleus of the stria terminalis on conditioned and unconditioned anxiety*. *Mol Psychiatry.* 18:308–319.
- Slotten H.A., Kalinichev M., Hagan J.J., Marsden C.A., Fone K.C.F. (2006). *Long-lasting changes in behavioural and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: gender-dependent effects*. *Brain Res.* 1097(1): 123–132.
- Smith M.A., Kim S.-Y., van Oers H.J., Levine S. (1997). *Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain*. *Endocrinology.* 138(11):4622–4628.
- Smith S.S., Shen H., Gong Q.H., Zhou X. (2007). *Neurosteroid regulation of GABA(A) receptors: Focus on the alpha4 and delta subunits*. *Pharmacol Ther* 116(1):58–76.
- Smith A.S., Tabbaa M., Lei K., Eastham P., Butler M.J., Linton L., Altshuler R., Liu Y., Wang Z. (2016). *Local oxytocin tempers anxiety by activating GABAA receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus*. *Psychoneuroendocrinology.* 63:50-58.
- Sosnowski D.W., Booth C., York T.P., Amstadter A.B., Kliewer W. (2018). *Maternal prenatal stress and infant DNA methylation: a systematic review*. *Dev. Psychobiol.* 60(2):127–139.
- Sowa J., Bobula B., Glombik K., Slusarczyk J., Basta-Kaim A., Hess G. (2015). *Prenatal stress enhances excitatory synaptic transmission and impairs long-term potentiation in the frontal cortex of adult offspring rats*. *PLoS ONE* 10(3):e0119407.

- Spannuth B.M., Hale M.W., Evans A.K., Lukkes J.L., Campeau S., Lowry C.A. (2011). *Investigation of a central nucleus of the amygdala/dorsal raphe nucleus serotonergic circuit implicated in fear-potentiated startle*. *Neuroscience*. 179:104-119.
- Spiteri T., Musatov S., Ogawa S., Ribeiro A., Pfaff D.W., Ågmo A. (2010). *The role of the estrogen receptor α in the medial amygdala and ventromedial nucleus of the hypothalamus in social recognition, anxiety and aggression*. *Behavioural Brain Research*. 210(2):211–220.
- Spiteri T., Ogawa S., Musatov S., Pfaff D.W., Ågmo A. (2012). *The role of the estrogen receptor α in the medial preoptic area in sexual incentive motivation, proceptivity and receptivity, anxiety, and wheel running in female rats*. *Behavioural Brain Research*. 230(1):11–20.
- Stanton M.E., Gutierrez Y.R., Levine S. (1988). *Maternal deprivation potentiates pituitary-adrenal stress responses in infant rats*. *Behav. Neurosci.* 102(5):692–700.
- Staub D.R., Spiga F., Lowry C.A. (2005). *Urocortin 2 increases c-Fos expression in topographically organized subpopulations of serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus*. *Brain Res.* 1044(2):176–189.
- Staub D.R., Evans A.K., Lowry C.A. (2006). *Evidence supporting a role for corticotropin-releasing factor type 2 (CRF(2)) receptors in the regulation of subpopulations of serotonergic neurons*. *Brain Res.* 1070(1):77–89.
- Steckler T., Holsboer F. (1999). *Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion*. *Biol. Psychiatry*. 46(11):1480–1508.
- Steimer T. (2011). *Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues*. *Dialog. Clin. Neurosci.* 13(4):495-506.
- Steinbusch H.W.M. (1981). *Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat—cell bodies and terminals*. *Neuroscience* 6(4):557–618.
- Steinman M.Q., Duque-Wilckens N., Greenberg G.D., Hao R., Campi K.L., Laredo S.A., Laman-Maharg A., Manning C.E., Doig I.E., Lopez E.M., Walch K., Bales K.L., Trainor B.C. (2016). *Sex-Specific Effects of Stress on Oxytocin Neurons Correspond With Responses to Intranasal Oxytocin*. *Biol Psychiatry*. 80(5):406-414.
- Stezhka V.V., Lovick T.A. *Projections from dorsal raphe nucleus to the periaqueductal grey matter: studies in slices of rat midbrain maintained in vitro*. (1997). *Neurosci Lett.* 230(1):57–60.
- Stonawski V., Frey S., Golub Y., Rohleder N., Kriebel J., Goecke T.W., Fasching P.A., Beckmann M.W., Kornhuber J., Kratz O., Moll G.H., Heinrich H., Eichler A. (2018). *Associations of prenatal depressive symptoms with DNA methylation of HPA axis-related genes and diurnal cortisol profiles in primary school-aged children*. *Dev. Psychopathol.* 31(2):419-431.
- Strobel A., Gutknecht L., Rothe C., Reif A., Mossner R., Zeng Y., Brocke B., Lesch K.P. (2003). *Allelic variation in 5-HT1A receptor expression is associated with anxiety- and depression-related personality traits*. *J Neural Transm.* 110:1445–1453.
- Sturman O., Germain P.-L., Bohacek J. (2018). *Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test*. *Stress.* 21(5):443-452.
- Stutzmann G.E., McEwen B.S., LeDoux J.E. (1998). *Serotonin modulation of sensory inputs to the lateral amygdala: dependency on corticosterone*. *J. Neurosci.* 18(22):9529–9538.
- Stutzmann G.E., LeDoux J.E. (1999). *GABAergic antagonists block the inhibitory effects of serotonin in the lateral amygdala: a mechanism for modulation of sensory inputs related to fear conditioning*. *J. Neurosci.* 19(11):RC8.
- SucHECKI D., Duarte Palma B., Tufik S. (2000). *Pituitary- adrenal axis and behavioural responses of maternally deprived juvenile rats to the open field*. *Behav Brain Res.* 111(1-2):99-106.
- Sullivan R.M., Landers M., Yeaman B., Wilson D.A. (2000). *Good memories of bad events in infancy*. *Nature* 407(6800):38–39.
- Sullivan R.M., Holman P.J. (2010). *Transitions in sensitive period attachment learning in infancy: the role of corticosterone*. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34(6):835–844.
- Sumara G., Sumara O., Kim J.K., Karsenty G. (2012). *Gut-derived serotonin is a multifunctional determinant to fasting adaptation*. *Cell Metab.* 16(5):588–600.

- Sutanto W., Rosenfeld P., de Kloet E.R., Levine S. (1996). *Longterm effects of neonatal maternal deprivation and ACTH on hippocampal mineralocorticoid and glucocorticoid receptors*. Dev. Brain Res. 92(2):156–163.
- Swanson L.W., Sawchenko P.E. (1983). *Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei*. Annu Rev Neurosci. 6(1):269–324.
- Szuran T.F., Pliška V., Pokorny J., Welzl H. (2000). *Prenatal stress in rats: effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze performance*. Physiol. Behav. 71(3-4):353–362.
- Szyf M., Weaver I.C.G., Champagne F.A., Diorio J., Meaney M.J. (2005). *Maternal programming of steroid receptor expression and phenotype through DNA methylation in the rat*. Front. Neuroendocrinol. 26(3-4):139–162.
- Tadic A., Rujescu D., Szegedi A., Giegling I., Singer P., Möller H.-J., Dahmen N. (2003). *Association of a MAOA gene variant with generalized anxiety disorder, but not with panic disorder or major depression*. American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics. 117B(1):1–6.
- Takahashi L.K., Ho S.P., Livanov V., Graciani N., Arneric S.P. (2001). *Antagonism of CRF(2) receptors produces anxiolytic behavior in animal models of anxiety*. Brain Res. 902(2):135–142.
- Takase L.F., Nogueira M.I., Baratta M., Bland S.T., Watkins L.R., Maier S.F., Fornal C.A., Jacobs B.L. (2004). *Inescapable shock activates serotonergic neurons in all raphe nuclei of rat*. Behav. Brain Res. 153(1):233–239.
- Tanaka S., Young J.W., Halberstadt A.L., Masten V.L., Geyer M.A. (2012). *Four factors underlying mouse behavior in an open field*. Behav Brain Res. 233(1):55–61.
- Taylor S.E., Way B.M., Welch W.T., Hilmert C.J., Lehman B.J., Eisenberger N.I. (2006). *Early family environment, current adversity, the serotonin transporter promoter polymorphism, and depressive symptomatology*. Biol Psychiatry. 60(7):671–676.
- Thoman E., Levine S. (1969). *Role of maternal disturbance and temperature change in early experience studies*. Physiol Behav. 4(2):143–145.
- Thompson B.L., Erickson K., Schulkin J., Rosen J.B. (2004). *Corticosterone facilitates retention of contextually conditioned fear and increases CRH mRNA expression in the amygdala*. Behavioural Brain Research. 149(2):209–215.
- Thompson W. (1957). *Influence of prenatal maternal anxiety on emotionality in young rats*. Science. 125(3250):698–699.
- Tomihara K., Soga T., Nomura M., Korach K.S., Gustafsson J.-Å., Pfaff D.W., Ogawa S. (2009). *Effect of ER- β gene disruption on estrogenic regulation of anxiety in female mice*. Physiology & Behavior. 96(2):300–306.
- Tottenham N., Hare T.A., Millner A., Gilhooly T., Zevin J.D., Casey B.J. (2011). *Elevated amygdala response to faces following early deprivation*. Dev. Sci. 14(2):190–204.
- Tovote P., Esposito M.S., Botta P., Chaudun F., Fadok J.P., Markovic M., Wolff S.B.E., Ramakrishnan C., Fenno L., Deisseroth K., Herry C., Arber S., Lüthi A. (2016). *Midbrain circuits for defensive behaviour*. Nature. 534(7606):206–212.
- Tractenberg S.G., Levandowski M.L., de Azeredo L.A., Orso R., Roithmann L.G., Hoffmann E.S., Brenhouse H., Grassi-Oliveira R. (2016). *An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: evidence from a four-stage methodological systematic review*. Neurosci Biobehav Rev. 68:489–503.
- Truitt W.A., Johnson P.L., Dietrich A.D., Fitz S.D., Shekhar A. (2009). *Anxiety-like behavior is modulated by a discrete subpopulation of interneurons in the basolateral amygdala*. Neuroscience. 160(2):284–294.
- Tyrka A.R., Price L.H., Marsit C., Walters O.C., Carpenter L.L. (2012). *Childhood adversity and epigenetic modulation of the leukocyte glucocorticoid receptor: preliminary findings in healthy adults*. PLoS One. 7(1):e30148.
- Uchida S., Hara K., Kobayashi A., Funato H., Hobara T., Otsuki K., Yamagata H., McEwen B.S., Watanabe Y. (2010). *Early life stress enhances behavioral vulnerability to stress through the activation of REST4-mediated gene transcription in the medial pre-frontal cortex of rodents*. J. Neurosci. 30(45):15007–15018.
- Uher R., McGuffin P. (2010). *The moderation by the serotonin transporter gene of environmental adversity in the etiology of depression: 2009 update*. Mol. Psychiatry. 15(1):18–22.

- Uher R. (2014). *Gene-environment interactions in severe mental illness*. Front Psychiatry. 5:48.
- Uvnas-Moberg K., Bjokstrand E., Hillegaard V., Ahlenius S. (1999). *Oxytocin as a possible mediator of SSRI-induced antidepressant effects*. Psychopharmacology. 142(1): 95–101.
- Uzunova V., Sheline Y., Davis J.M., Rasmusson A., Uzunov D.P., Costa E. (1998). *Increase in the cerebrospinal fluid content of neurosteroids in patients with unipolar major depression who are receiving fluoxetine or fluvoxamine*. Proc Natl Acad Sci U S A. 95(6):3239–3244.
- Vanyukov M.M., Maher B.S., Devlin B., Tarter R.E., Kirillova G.P., Yu L.M., Ferrell R.E. (2004). *Haplotypes of the monoamine oxidase genes and the risk for substance use disorders*. American Journal of Medical Genetics. 125B:120–125.
- Varnas K., Halldin C., Hall H. (2004). *Autoradiographic distribution of serotonin transporters and receptor subtypes in human brain*. Hum Brain Mapp. 22(3):246–260.
- Vázquez D.M., Eskandari R., Zimmer C.A., Levine S., López J.F. (2002). *Brain 5-HT receptor system in the stressed infant rat: implications for vulnerability to substance abuse*. Psychoneuroendocrinology. 27(1-2):245–272.
- Vázquez D.M., Bailey C., Dent G.W., Okimoto D.K., Steffek A., López J.F., Levine S. (2006). *Brain corticotropin-releasing hormone (CRH) circuits in the developing rat: effect of maternal deprivation*. Brain Res. 1121(1):83–94.
- Veenema A.H., Blume A., Niederle D., Buwalda B., Neumann I.D. (2006). *Effects of early life stress on adult male aggression and hypothalamic vasopressin and serotonin*. Eur. J. Neurosci. 24(6):1711–1720.
- Veenema A.H., Bredewold R., Neumann I.D. (2007). *Opposite effects of maternal separation on intermale and maternal aggression in C57BL/6 mice: link to hypothalamic vasopressin and oxytocin immunoreactivity*. Psychoneuroendocrinology 32(5):437–450.
- Veening J.G., Swanson L.W., Sawchenko P.E. (1984). *The organization of projections from the central nucleus of the amygdala to brainstem sites involved in central autonomic regulation: a combined retrograde transport-immunohistochemical study*. Brain Res. 303(2):337-357.
- Vertes R.P. (1991). *A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat*. J Comp Neurol. 313(4): 643-668.
- Vertes R.P., Fortin W.J., Crane A.M. (1999). *Projections of the median raphe nucleus in the rat*. J Comp Neurol. 407(4):555–582.
- Vinkers C.H., Joëls M., Milaneschi Y., Gerritsen L., Kahn R.S., Penninx B.W., Boks M.P. (2015). *Mineralocorticoid receptor haplotypes sex-dependently moderate depression susceptibility following childhood maltreatment*. Psychoneuroendocrinology. 54:90-102.
- Vuong S.M., Oliver H.A., Scholl J.L., Oliver K.M., Forster G.L. (2010). *Increased anxiety-like behavior of rats during amphetamine withdrawal is reversed by CRF2 receptor antagonism*. Behav. Brain Res. 208(1):278–281.
- Vyas A., Mitra R., Shankaranarayana Rao B.S., Chattarji S. (2002). *Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons*. J. Neurosci. 22(15):6810– 6818.
- Wadhwa P.D. (2005). *Psychoneuroendocrine processes in human pregnancy influence fetal development and health*. Psychoneuroendocrinology. 30(8):724–743.
- Waider J., Proft F., Langhofer G., Asan E., Lesch K.-P., Gutknecht L. (2012). *GABA concentration and GABAergic neuron populations in limbic areas are differentially altered by brain serotonin deficiency in Tph2 knockout mice*. Histochem Cell Biol. 139(2):267–281.
- Waider J., Popp S., Lange M.D., Kern R., Kolter J.F., Kobler J., Donner N.C., Lowe K.R., Malzbender J.H., Brazell C.J., Arnold M.R., Aboagye B., Schmitt-Böhrer A., Lowry C.A., Pape H.C., Lesch K.-P. (2017). *Genetically driven brain serotonin deficiency facilitates panic-like escape behavior in mice*. Trans. Psychiatr. 7(10): e1246.
- Walf A.A., Koonce C.J., Frye C.A. (2008). *Estradiol or diarylpropionitrile decrease anxiety-like behavior of wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice*. Behavioral Neuroscience. 122(5): 974–981.

- Walf A.A., Koonce C., Manley K., Frye C.A. (2009). *Proestrous compared to diestrous wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice have better performance in the spontaneous alternation and object recognition tasks and reduced anxiety-like behavior in the elevated plus and mirror maze*. Behavioural Brain Research. 196(2):254–260.
- Walker C.D., Scribner K.A., Cascio C.S., Dallman M.F. (1991). *The pituitary-adrenocortical system of neonatal rats is responsive to stress throughout development in a time-dependent and stressor-specific fashion*. Endocrinology. 128(3):1385–1395.
- Walker D.L., Miles L.A., Davis M. (2009). *Selective participation of the bed nucleus of the stria terminalis and CRF in sustained anxiety-like versus phasic fear-like responses*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 33(8):1291–1308.
- Walsh R.N., Cummins R.A. (1976). *The open field test: a critical review*. Psychol. Bull. 83(3):482–504.
- Walther D.J., Peter J.U., Bashammakh S., Hörtnagl H., Voits M., Fink H., Bader M. (2003). *Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform*. Science. 299(5603):76.
- Walther D.J., Peter J.U., Winter S., Höltje M., Paulmann N., Grohmann M., Vowinkel J., Alamo-Bethencourt V., Wilhelm C.S., Ahnert-Hilger G., Bader M. (2003). *Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release*. Cell. 115(7):851–862.
- Wang X.D., Rammes G., Kraev I., Wolf M., Liebl C., Scharf S.H., Rice C.J., Wurst W., Holsboer F., Deussing J.M., Baram T.Z., Stewart M.G., Müller M.B., Schmidt M.V. (2011). *Forebrain CRF(1) modulates early-life stress-programmed cognitive deficits*. J. Neurosci. 31(38):13625–13634.
- Wang X.D., Labermaier C., Holsboer F., Wurst W., Deussing J.M., Müller M.B., Schmidt M.V. (2012). *Early-life stress-induced anxiety-related behavior in adult mice partially requires forebrain corticotropin-releasing hormone receptor 1*. Eur J Neurosci 36(3):2360–2367.
- Watanabe Y., Ikegaya Y., Saito H., Abe K. (1995). *Roles of GABAA, NMDA and muscarinic receptors in induction of long-term potentiation in the medial and lateral amygdala in vitro*. Neurosci. Res. 21(4):317–322.
- Way B.M., Taylor S.E. (2010). *The serotonin transporter promoter polymorphism is associated with cortisol response to psychosocial stress*. Biol. Psychiatry. 67(5):487–492.
- Weathington J.M., Cooke B.M. (2012). *Corticotropin-releasing factor receptor binding in the amygdala changes across puberty in a sex-specific manner*. Endocrinology. 153(12):5701–5705.
- Weathington J.M., Hamki A., Cooke B.M. (2014). *Sex- and region-specific pubertal maturation of the corticotropin-releasing factor receptor system in the rat*. J. Comp. Neurol. 522(6):1284–1298.
- Weaver I.C., Cervoni N., Champagne F.A., D'Alessio A.C., Sharma S., Seckl J.R., Dymov S., Szyf M., Meaney M.J. (2004). *Epigenetic programming by maternal behavior*. Nat Neurosci. 7(8):847–854.
- Weidner M.T., Lardenoije R., Eijssen L., Mogavero F., De Groot L.P.M.T., Popp S., Palme R., Förstner K.U., Strelakova T., Steinbusch H.W.M., Schmitt-Böhrer A.G., Glennon J.C., Waider J., van den Hove D.L.A., Lesch K.-P. (2019). *Identification of cholecystinin by genome-wide profiling as potential mediator of serotonin-dependent behavioral effects of maternal separation in the amygdala*. Front Neurosci. 13:460.
- Weihua Z., Lathe R., Warner M., Gustafsson J.A. (2002). *An endocrine pathway in the prostate, ER beta, AR, 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol, and CYP7B1, regulates prostate growth*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 99(21):13589–13594.
- Weintraub A., Singaravelu J., Bhatnagar S. (2010). *Enduring and sex-specific effects of adolescent social isolation in rats on adult stress reactivity*. Brain Res. 1343:83–92.
- Welberg L.A., Thiruvikraman K.V., Plotsky P.M. (2005). *Chronic maternal stress inhibits the capacity to up-regulate placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity*. J Endocrinol. 186(3):R7–R12.
- Wellman C.L., Izquierdo A., Garrett J.E., Martin K.P., Carroll J., Millstein R., Lesch K.-P., Murphy D.L., Holmes A. (2007). *Impaired stress-coping and fear extinction and abnormal corticolimbic morphology in serotonin transporter knock-out mice*. J. Neurosci. 27(3):684–691.
- White M.G., Bogdan R., Fisher P.M., Munoz K.E., Williamson D.E., Hariri A.R. (2012). *FKBP5 and emotional neglect interact to predict individual differences in amygdala reactivity*. Genes Brain Behav. 11(7):869–878.

- Wieck A., Andersen S.L., Brenhouse H.C. (2013). *Evidence for a neuroinflammatory mechanism in delayed effects of early life adversity in rats: relationship to cortical NMDA receptor expression*. *Brain Behav Immun*. 28:218-226.
- Wigger A., Neumann I. D. (1999). *Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats*. *Physiol. Behav*. 66(2):293–302.
- Williams L.M., Debattista D., Duchemin A.-M., Schatzberg A.F., Nemeroff C.B. (2016). *Childhood trauma predicts antidepressant response in adults with major depression: data from the randomized international study to predict optimized treatment for depression*. *Transl Psychiatry* 6: e799.
- Windle R.J., Shanks N., Lightman S.L., Ingram C.D. (1997). *Central oxytocin administration reduces stress induced corticosterone release and anxiety behavior in rats*. *Endocrinology*. 138(7):2829– 2834.
- Winslow J.T., Noble P.L., Lyons C.K., Sterk S.M., Insel T.R. (2003). *Rearing effects on cerebrospinal fluid oxytocin concentration and social buffering in rhesus monkeys*. *Neuropsychopharmacology*. 28(5):910-8.
- Wolff S.B.E., Gründemann J., Tovote P., Krabbe S., Jacobson G.A., Müller C., Herry C., Ehrlich I., Friedrich R.W., Letzkus J.J., Lüthi A. (2014). *Amygdala interneuron subtypes control fear learning through disinhibition*. *Nature* 509:453–458.
- Wong P., Sze Y., Gray L.J., Chang C.C.R., Cai S., Zhang X. (2015). *Early life environmental and pharmacological stressors result in persistent dysregulations of the serotonergic system*. *Front. Behav. Neurosci*. 9:94.
- Wood S.K., Zhang X.Y., Reyes B.A., Lee C.S., Van Bockstaele E.J., Valentino R.J. (2013). *Cellular adaptations of dorsal raphe serotonin neurons associated with the development of active coping in response to social stress*. *Biol. Psychiatr*. 73(11):1087–1094.
- Workel J.O., Oitzl M.S., Fluttert M., Lesscher H., Karssen A., de Kloet E.R. (2001). *Differential and age-dependent effects of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of brown norway rats from youth to senescence*. *J. Neuroendocrinol*. 13(7):569–580.
- Wu M.V., Shah N.M. (2011). *Control of masculinization of the brain and behavior*. *Curr Opin Neurobiol*. 21(1):116–123.
- Wu Y., Patchev A.V., Daniel G., Almeida O.F., Spengler D. (2014). *Early-life stress reduces DNA methylation of the Pomc gene in male mice*. *Endocrinology*. 155(5):1751–1762.
- Yadav V.K., Oury F., Suda N., Liu Z.W., Gao X.B., Confavreux C., Klemenhausen K.C., Tanaka K.F., Gingrich J.A., Guo X.E., Tecott L.H., Mann J.J., Hen R., Horvath T.L., Karsenty G. (2009). *A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure*. *Cell*. 138(5):976–989.
- Yamamoto R., Hatano N., Sugai T., Kato N. (2014). *Serotonin induces depolarization in lateral amygdala neurons by activation of TRPC-like current and inhibition of GIRK current depending on 5-HT2C receptor*. *Neuropharmacology*. 82:49–58.
- Yang X.D., Liao X.M., Uribe-Mariño A., Liu R., Xie X.M., Jia J., Su Y.A., Li J.T., Schmidt M.V., Wang X.D., Si T.M. (2015). *Stress during a critical postnatal period induces region-specific structural abnormalities and dysfunction of the prefrontal cortex via CRF1*. *Neuropsychopharmacology*. 40(5):1203–1215.
- Yehuda R., Yang R.-K., Buchsbaum M.S., Golier J.A. (2006). *Alterations in cortisol negative feedback inhibition as examined using the ACTH response to cortisol administration in PTSD*. *Psychoneuroendocrinology*. 31(4):447–451.
- Yi S.J., Baram T.Z. (1994). *Corticotropin-releasing hormone mediates the response to cold stress in the neonatal rat without compensatory enhancement of the peptide's gene expression*. *Endocrinology*. 135(6):2364–2368.
- Yoshida M., Takayanagi Y., Inoue K., Kimura T., Young L.J., Onaka T., Nishimori K. (2009). *Evidence that oxytocin exerts anxiolytic effects via oxytocin receptor expressed in serotonergic neurons in mice*. *J Neurosci*. 29(7): 2259–2271.
- Young S.N. (2007). *How to increase serotonin in the human brain without drugs*. *J Psychiatry Neurosci*. 32(6): 394–399.
- Zanoveli J.M., Carvalho M.C., Cunha J.M., Brandao M.L. (2009). *Extracellular serotonin level in the basolateral nucleus of the amygdala and dorsal periaqueductal gray under unconditioned and conditioned fear states: an in vivo microdialysis study*. *Brain Res*. 1294:106–115.
- Zhang L., Ma W., Barker J.L., Rubinow D.R. (1999). *Sex differences in expression of serotonin receptors (subtypes 1A and 2A) in rat brain: a possible role of testosterone*. *Neuroscience*. 94(1):251– 259.

- Zhang Z.W. (2003). *Serotonin induces tonic firing in layer V pyramidal neurons of rat prefrontal cortex during postnatal development*. J. Neurosci. 23(8):3373–3384.
- Zhang G., Asgeirsdottir H.N., Cohen S.J., Munchow A.H., Barrera M.P., Stackman R.W. Jr. (2013). *Stimulation of serotonin 2A receptors facilitates consolidation and extinction of fear memory in C57BL/6J mice*. Neuropharmacology. 64(1):403-413.
- Zhang X., Wang B., Jin J., An S., Zeng Q., Duan Y., Yang L., Ma J., Cao X. (2014). *Early deprivation reduced anxiety and enhanced memory in adult male rats*. Brain Res. Bull. 108:44–50.
- Zhong P., Yan Z. (2011). *Differential regulation of the excitability of prefrontal cortical fast-spiking interneurons and pyramidal neurons by serotonin and fluoxetine*. PLoS One. 6(2):e16970.
- Zhu P., Wang W., Zuo R., Sun K. (2019). *Mechanisms for establishment of the placental glucocorticoid barrier, a guard for life*. Cell Mol Life Sci. 76(1):13-26.
- Zimmermann P., Bruckl T., Nocon A., Pfister H., Binder E.B., Uhr M., Lieb R., Moffitt T.E., Caspi A., Holsboer F., Ising M. (2011). *Interaction of FKBP5 gene variants and adverse life events in predicting depression onset: results from a 10-year prospective community study*. Am J Psychiatry. 168(10):1107–1116.
- Zuloaga D.G., Carbone D.L., Hiroi R., Chong D.L., Handa R.J. (2011). *Dexamethasone induces apoptosis in the developing rat amygdala in an age-, region-, and sex-specific manner*. Neuroscience 199:535–547.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Ausgeschriebene Form
11 β -HSD2	11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase 2
5-HIAA	5-Hydroxyindolyllessigsäure
5-HT	Serotonin
5-HT1AR	Serotoninrezeptor 1A
5-HT1BR	Serotoninrezeptor 1B
5-HT2AR	Serotoninrezeptor 2A
5-HT2CR	Serotoninrezeptor 2C
5-HT3R	Serotoninrezeptor 3
5-HTT	Serotonintransporter
5-HTTLPR	Serotonintransporter-Längenpolymorphismus
AACD	Aminosäuredecarboxylase
Abb.	Abbildung
ACC	Anteriorer cingulärer Cortex
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung
AHy	Adenohypophyse
AR	Androgenrezeptor
AVP	Arginin-Vasopressin
BL	Basolateraler Kern der Amygdala
BNST	Bed Nucleus der Stria terminalis
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
Ce	Zentraler Kern der Amygdala
CeL	Lateraler zentraler Kern der Amygdala
CeM	Medialer zentraler Kern der Amygdala
c-Fos+	c-Fos positiv
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CORT	Corticosteron
CRF	Corticotropin Releasing Factor = Corticotropin Releasing Hormone
CRH	Corticotropin Releasing Hormone = Corticotropin Releasing Factor
CRHR1	Corticotropin Releasing Hormone Receptor 1
CRHR2	Corticotropin Releasing Hormone Receptor 2
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DLB	Dark-light Box
DLPAG	Dorsolaterales Periaquäduktales Höhlengrau
DMPAG	Dorsomediales Periaquäduktales Höhlengrau
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPAG	Dorsales Periaquäduktales Höhlengrau
DR	Dorsale Raphe
DRC	Kaudaler dorsaler Raphekern
DRD	Dorsaler dorsaler Raphekern
DRI	Interfaszikulärer dorsaler Raphekern
DRVL	Ventrolaterale dorsale Raphe
E	Embryonaler Tag
ELS	Early-life Stress
EPM	Elevated-plus Maze
ER α	Östrogenrezeptor α
ER β	Östrogenrezeptor β
ESD	Early Social Deprivation
FKBP5	FK506 binding protein 5
GABA	Gamma-Aminobuttersäure

GC	Glucocorticoidrezeptor
G x E	Gen x Umwelt-Interaktion
GPR30	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 30
h	Stunde
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxid
Hip	Hippocampus
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse
HPA axis	Hypothalamic pituitary adrenal axis
Hyp	Hypothalamus
INs	Interneurone
Int.	Intervall
La	Lateraler Kern der Amygdala
l-Allel	Langes Allel
LC	Locus coeruleus
LH	Lateraler Hypothalamus
LN	Limited Nesting
LPAG	Laterales Periaquäduktales Höhlengrau
LTP	Long term potentiation (=Langzeit-Potenzierung)
MAOA	Monoaminoxidase A
MC	Mineralocorticoidrezeptor
MD	Maternal Deprivation
min	Minute
mm	Millimeter
MnR	Medianer Raphekern
mPFC	Medialer präfrontaler Cortex
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
MS	Maternal Separation
n	Anzahl
n.s.	Nicht signifikant
NA	Noradrenalin
NFR	Nuclear Fast Red
NHS	Normal Horse Serum (= Pferdenormalserum)
NNR	Nebennierenrinde
NPY	Neuropeptid Y
NR3C1	Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1
OF	Open Field
P	Postnataler Tag
PAG	Periaquäduktales Höhlengrau
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PET	Positronenemissionstomographie
PFA	Paraformaldehyd
PFC	Präfrontaler Cortex
pit	Pituitary gland (= Hypophyse)
PNs	Prinzipalneurone / Projektionsneurone
PR	Progesteronrezeptor
PS	Pränataler Stress
PTBS	Posttraumatische Belastungsstörung
PV	Parvalbumin
PVN	Paraventriculärer Kern des Hypothalamus
s	Sekunde
s-Allel	Kurzes Allel
SERT	Serotonintransporter
SHRP	Stresshypo-responsive Phase
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (= Einzelnukleotidpolymorphismus)
SOM	Somatostatin

Sq	Square (= Fläche)
SSRI	Selektive Serotoninwiederaufnahmehemmer
Thal	Thalamus
Tph2	Tryptophanhydroxylase 2
v.a.	Vor allem
VLPAG	Ventrolaterales Periaquäduktales Höhlengrau
Vs.	Versus
VTA	Ventrales tegmentales Areal
z.B.	Zum Beispiel
ZEMM	Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin
ZNS	Zentrales Nervensystem
*	$p < 0,05$
**	$p < 0,01$
***	$p < 0,001$
#	$p < 0,1$
+/+	Wildtypisch
+/-	Heterozygoter Knockout
-/-	Homozygoter Knockout

9 Danksagung

„Keine Schuld ist dringender als die, Dank zu sagen“

(Marcus Tullius Cicero)

Hinter dieser Arbeit stehen viele Menschen, die mich auf verschiedene Art und Weise unterstützt und damit zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Ich danke Euch und Ihnen von Herzen.

Beginnen möchte ich mit meinem Doktorvater, Herrn Prof. Klaus-Peter Lesch, dem ich zu tiefem und aufrichtigem Dank verpflichtet bin.

Ich danke Ihnen, dass Sie mich 2014 als Doktorandin aufgenommen und mich über den gesamten Prozess meiner Promotion hinweg unterstützt und geleitet haben. Danke für Ihre Großzügigkeit und Ihre Offenheit, dafür, dass Sie mich und meine wissenschaftlichen Fähigkeiten stets gefördert und gefordert haben, und mich stetig und uneingeschränkt unterstützt haben. Teil Ihres Labors und Ihre Doktorandin zu sein ist eine Ehre, die mich mit Glück und Stolz erfüllt.

Indem Sie mich vor nunmehr fast fünf Jahren mit einem an einer Doktorarbeit in unserer Arbeitsgruppe interessierten Medizinstudenten bekannt machten, der dann nicht mein Laborkollege, sondern mein Partner wurde, haben Sie neben meiner wissenschaftlichen Ausbildung auch mein privates Glück nachhaltig positiv beeinflusst.

Ich danke Ihnen mit dem Ausdruck all meinen Respekts für alles, was Sie für mich getan haben, und werde Ihnen und unserem Labor immer herzlich verbunden sein.

Großer Dank gilt auch meinen zweiten und dritten Supervisorinnen, PD Dr. Angelika Schmitt-Böhrer und Prof. Esther Asan, für Ihre stetige und kontinuierliche Unterstützung.

Danke Angelika, dass Du meine Arbeit seit meinen wissenschaftlichen Kinderschuhen begleitet und rückhaltlos unterstützt hast. Danke, dass die Türe Deines Büros, wenn ich an manchen Abenden verzweifelt über die Launen des Stereo Investigators war, immer einen Spalt weit offenstand, und damit eigentlich schon alles über Dich, Dein stets offenes Ohr und Dein großes Herz aussagt. Dein hoher wissenschaftlicher Anspruch und Dein stetiger Einsatz für unser Labor und seine Mitglieder verdienen meine größte Bewunderung, beeindrucken und inspirieren mich. Herzlichen Dank für Deine stetige und uneingeschränkte Unterstützung in der Vertretung meiner Interessen und Deine kontinuierliche Begleitung auf meinem wissenschaftlichen Weg.

Vielen Dank auch an Dr. Jonas Waider. Das Gespräch mit Dir vor Beginn meiner Doktorarbeit hat mich binnen kurzer Zeit überzeugt, in unserer Arbeitsgruppe zu promovieren, denn wenige Minuten Gespräch mit Dir über die Tph2 Mäuse haben ausgereicht, dass Deine Begeisterung für diese besondere Mauslinie auf mich überggesprungen ist – eine Begeisterung, die sich niemals gelegt hat. Danke hierfür und für Deine Unterstützung und Begleitung bei der Durchführung dieses Projekts.

Mein tiefer Dank richtet sich an Dr. Magdalena Weidner, meine direkte Betreuerin, dafür dass Du, Magda, die beste Betreuerin warst, die ich mir jemals hätte vorstellen können. Deine Energie, Kreativität, Motivation, Intelligenz und Willensstärke, Deine Leidenschaft für die Wissenschaft, Deine hohen wissenschaftlichen und menschlichen Standards, und Dein stetiger Drang, immer (wirklich immer!) alles (wirklich alles!) besser zu machen, haben mich, wissenschaftlich wie menschlich beeindruckt und inspiriert und werden das auch weiterhin. Danke, dass Du den intensiven Sommer 2015 unserer Verhaltensversuche, in dem Du über Wochen hinweg mein einziger amuriner Kontakt warst, zu einer einzigartigen und besonderen Zeit gemacht hast. Danke, dass Du Seite an Seite mit mir durch alle Herausforderungen dieses Projekts gegangen bist, mit den Rückschlägen und Frustrationen, die dazugehören, danke für all die Excel- und Prism-Hacks, danke für die Mittagspausen im ZEMM mit guten Gesprächen und stinkendem Käse! Danke, dass Du auch aus Maastricht, und trotz all Deiner anderen Verpflichtungen, immer mein zuverlässiger Ansprechpartner warst. Danke für Deine jahrelange stetige uneingeschränkte und rückhaltlose Unterstützung in der Durchführung dieses Projekts und in der Vertretung meiner Interessen. Danke, dass Du immer und ohne Vorbehalte an mich und dieses Projekt geglaubt hast.

Danke, vor allem, dass Du mich immer als einen Partner wahrgenommen hast, und danke, dass Du mich in den Kinderschuhen dieses Projekts zu einer Wissenschaftlerin gemacht hast, indem Du mit mir gesprochen hast, wie mit einer Wissenschaftlerin, bevor ich selber wusste, dass ich im Begriff war, eine zu werden. Meinen Wunsch, Forschung zu machen, verdanke ich in weiten Teilen Dir, und ich bin glücklich und stolz, dass mich das wissenschaftliche Fundament, das Du bei mir gelegt hast, und die wissenschaftliche Prägung, die ich durch Dich erfahren habe, immer, auf allen Wegen, und in allen Projekten, begleiten werden.

Ebenfalls sehr herzlich danken möchte ich allen anderen Kollegen, mit denen ich in meinen Jahren im Labor zusammenarbeiten durfte.

Danke, Gabi, für Dein immer offenes Ohr und Dein großes Herz, für Deine Hilfsbereitschaft, für das vertrauensvolle Verwahren meiner Unterlagen und Materialien, danke für den gelegentlichen Tritt in den Hintern bezüglich Organisation und Ordnung, denn wie wichtig gute Organisation ist, ist eine der Lehren meiner Zeit im Labor.

Danke allen Kollegen für die technische Unterstützung und Hilfe, die ich von allen Seiten erhalten habe, danke für das Tolerieren meines wochenendlichen Platzhirschgebarens am Cryostaten oder am Neurolucida, und danke, dass ich im biologisch dominierten Territorium nicht (nur) als nervige Medizinstudentin wahrgenommen wurde ;-). Danke für all die netten Gespräche und das gelegentliche Glas nach Feierabend, die die Arbeit und den Alltag schöner gemacht und dazu beigetragen haben, die Zeit im Labor zu einem der schönsten und spannendsten Abschnitte in meinem Leben zu machen. Ich schätze Euch alle sehr, und die Zeit mit Euch wird immer einen besonderen Platz in meinem Herzen haben.

Herzlichen Dank auch meinen liebevollen und durch und durch *formidablen* Eltern, die Ihr mir nicht nur das Leben als solches geschenkt habt, sondern mich auch immer und auf allen Wegen in ebendiesem unterstützt habt. Danke, dass Ihr meine Neugier angeregt und ihr Raum zur freien Entfaltung gegeben habt. Danke, Mama und Papa, dass Ihr immer an mich geglaubt habt, und in allen Lebenslagen rückhaltlos hinter mir steht.

Danke Papa, dass Du zum Gelingen dieses Projekts beigetragen hast, indem Du mich an manchen Tagen nach Mitternacht aus dem Labor abgeholt hast oder den Pförtner alarmiert hast, wenn ich mich nachts im Labor auf dem Gang ausgesperrt hatte. Neben diesen augenfälligen Dingen hat Dein Beitrag zu diesem Projekt jedoch tatsächlich schon sehr viel früher angefangen und sehr viel tiefgreifender gewirkt, indem Du durch die sonntäglichen „schlauhen Stunden“ meiner Kindheit mein Interesse und meine Neugier an Wissenschaft und dem Begreifen von Zusammenhängen geweckt hast. Danke hierfür, und für so viel mehr, was Du mir auf meinem Weg mitgegeben hast.

Mein großer Dank gilt auch meinem Freund Maxi, den ich im Oktober 2015 durch eine glückliche Fügung kennengelernt habe, und der dann (zunächst) nicht mein Laborkollege sondern mein Partner wurde. Die Tatsache, dass Du in der Zeit, in der wir angefangen haben, uns näher zu kommen, kein Hindernis darin sahst, mir zu nächtllicher Stunde am Cryostaten, zugegebenermaßen nicht dem romantischsten Ort der Welt, Gesellschaft zu leisten, um Zeit mit mir zu verbringen, sagt schon einiges über Dich aus. Neben der Liebe für den jeweils anderen vereint uns auch die Liebe zur Wissenschaft, was ein großes Geschenk und eine Bereicherung für unser gemeinsames Leben ist. Danke für unsere langen Spaziergängen und unsere *Scientific Sundays*, danke für Deine uneingeschränkte Unterstützung in allen Zeiten und Lebenslagen, danke, dass Du bereit bist alles mit mir zu teilen, außer Deiner Zahnbürste, danke, dass Du so bist wie Du bist, meine sehr unterschiedliche bessere Hälfte, die mich so perfekt ergänzt, mein *partner in crime*, und mein *partner in science*. Danke für all die eng umschlungenen Sonnenuntergänge im 12. Stock des Center for Life Science, Boston, MA - und alle die noch kommen werden. "To love and to be loved is to feel the sun from both sides."

Last, but for sure not least, danke an die Tph2-Mäuse, die die Hauptrolle in dieser Arbeit spielen und die ich an dieser Stelle würdigen möchte, denn ohne sie gäbe es diese ganze Arbeit nicht. Tierversuche sind kein einfaches Thema, für die Gesellschaft wie für das Individuum, waren es nicht für mich und werden es auch nie sein. Ich bin glücklich und stolz, dass ich mit dieser besonderen Mauslinie arbeiten durfte, und, um auf das Zitat, das ich meiner Doktorarbeit vorangestellt habe, zurückzukommen und den Bogen zu schließen: „Always remember that this whole thing was started with a dream and a mouse.“

Euch und Ihnen allen,

in tiefer Verbundenheit,

Charlotte

10 Lebenslauf

11 Eidesstattliche Erklärung/Affidavit

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled *Differential anxiety-related behaviour and brain activation in Tph2-deficient female mice exposed to adverse early environment* is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation *Die Auswirkungen von Tph2-Defizienz und negativen frühen Umwelterfahrungen auf Angstverhalten in weiblichen Mäusen* eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

12 Anhang

12.1 Physiologische Parameter von Muttertieren und Nachkommen

Die Muttertiere wurden am ersten Tag der Verpaarung gewogen und es konnten in keiner der beiden Kohorten Gewichtsunterschiede zwischen den Muttertieren, die MS erfahren hatten und den Muttertieren der Kontrollgruppe festgestellt werden. Darüber hinaus zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der geborenen Jungtiere zwischen den Gruppen, weder innerhalb, noch zwischen den Kohorten. In der 1. Kohorte konnte kein Unterschied im Gewicht der Mütter oder Jungtiere in der Kontrollgruppe im Vergleich zur MS-Gruppe gefunden werden. In der 2. Kohorte konnten wir eine leichte Abnahme des Gewichts der Muttertiere an P5 feststellen ($p = 0,017$ Mann-Whitney U; $p = 0,053$ t-Test). Das Überleben der Jungtiere zeigte sich durch das Stressparadigma nicht beeinflusst. Ab dem Zeitpunkt des Absetzens konnte ein von MS unabhängiger signifikanter Genotypeneffekt auf das Gewicht der weiblichen Nachkommen festgestellt werden. Dieser Effekt bestand in beiden Kohorten, und zu allen erhobenen Zeitpunkten ((P25, P41 und P55), $p < 0,001$). Post hoc Analysen ergaben, dass weiblichen Tph2^{-/-} Mäuse beider Kohorten ein niedrigeres Körpergewicht zu allen Zeitpunkten (P25, P41 und P55 ($p \leq 0,025$; S2)) im Vergleich zu Tph2^{+/+} und Tph2^{+/-} Tieren aufwiesen. Dieser Effekt zeigte sich unabhängig von der Exposition gegenüber MS. Darüber hinaus haben konnte ein MS-Effekt in Tph2^{+/+} Nachkommen der 2. Kohorte an P41 und P55 ($p < 0,010$) und in Tph2^{+/-} Nachkommen der 1. Kohorte an P55 (U = 77,0; $p = 0,020$) festgestellt werden, wobei Tiere, die einem MS-Paradigma unterzogen worden waren, ein höheres Gewicht als nichtgestresste Kontrolltiere aufwiesen. Darüber hinaus konnte in Kohorte 2 ein Unterschied innerhalb der nicht-gestressten Kontrolltiere zwischen Tph2^{+/+} und Tph2^{+/-} Nachkommen an P41 festgestellt werden (U = 65,0; $p = 0,017$). Die statistische Analyse wurde mittels non-parametrischem Kruskal-Wallis und Mann-Whitney U Test, wenn keine Normalverteilung vorlag, oder, wenn eine Normalverteilung gegeben war, mittels Student's T-Test durchgeführt.

A)

condition	n	<i>Tph2</i> ^{+/+} P25±3		<i>Tph2</i> ^{+/-} P25±3		<i>Tph2</i> ^{-/-} P25±3	
cohort 1							
C	40	14.42	± 0.50	14.01	± 0.53	8.07	± 0.53
MS	49	14.84	± 0.31	14.40	± 0.35	9.20	± 0.41
cohort 2							
C	44	12.94	± 0.48	13.99	± 0.41	7.43	± 0.64
MS	42	13.35	± 0.51	12.85	± 0.50	6.97	± 0.52

B)

condition	n	<i>Tph2</i> ^{+/+} P41±7		<i>Tph2</i> ^{+/-} P41±7		<i>Tph2</i> ^{-/-} P41±7	
cohort 1							
C	40	19.26	± 0.28	18.66	± 0.47	15.90	± 0.44
MS	49	19.85	± 0.26	19.49	± 0.31	15.98	± 0.26
cohort 2							
C	44	16.24	± 0.44	18.33	± 0.57	12.26	± 1.01
MS	42	18.10	± 0.30	18.50	± 0.20	14.29	± 0.46

C)

condition	n	<i>Tph2</i> ^{+/+} P55±7		<i>Tph2</i> ^{+/-} P55±7		<i>Tph2</i> ^{-/-} P55±7	
cohort 1							
C	40	20.78	± 0.40	19.78	± 0.43	18.47	± 0.39
MS	49	21.61	± 0.30	21.15	± 0.32	18.99	± 0.29
cohort 2							
C	44	20.27	± 0.31	21.31	± 0.39	18.56	± 0.57
MS	42	21.73	± 0.38	21.55	± 0.24	18.99	± 0.47

Tabelle S1: **Gruppengröße und Körpergewicht in Nachkommen von Muttertieren der MS- oder Kontrollgruppe über die Zeit (P25-55)**. Eine vollständige *Tph2*-Depletion führt zu einem erniedrigten Körpergewicht im Vergleich zu *Tph2* +/- und *Tph2* +/+ Tieren, unabhängig von der Exposition gegenüber MS ($p < 0,005$). Außerdem führt MS zu einem Anstieg des Körpergewichts bei *Tph2* +/+ in Kohorte 2 an P41 und P55 und in Kohorte 1 bei *Tph2* +/- Tieren an P55 ($p < 0,030$). Die Werte stellen Gruppenmittelwerte ± Standardfehler dar, n = 0-16 pro Gruppe. * $p < 0,050$ (Post hoc: Mann-Whitney U).

12.2 Überblick über alle ausgewerteten Parameter für „Open field“ und „Dark-light box“

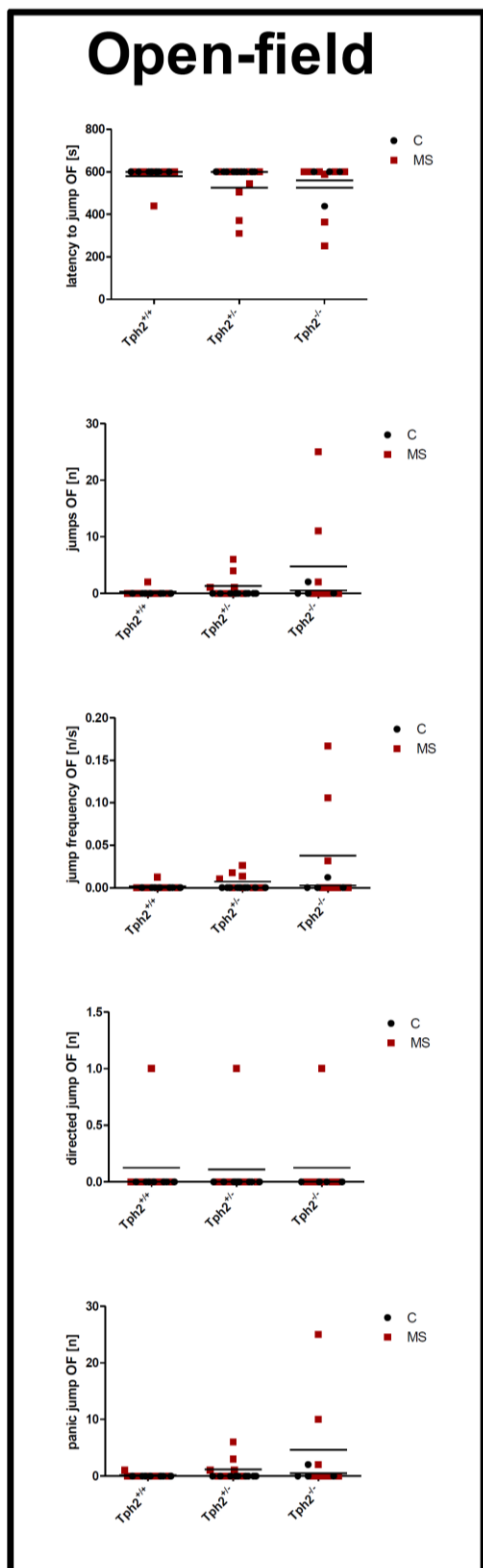
Im DLB-Test konnte eines der heterozygoten Kontrolltiere nicht von der Software getrackt werden, weshalb für alle automatisch erhobenen Parameter wie Latenzzeit bis zum Eintritt in das helle Kompartiment, im hellen Kompartiment verbrachte Zeit, im hellen Kompartiment im 1. Intervall verbrachte Zeit, im hellen Kompartiment im 2. Intervall verbrachte Zeit, Anzahl der Besuche des hellen Kompartiments, Anzahl der Besuche des hellen Kompartiments im 1. Intervall, Anzahl der Besuche des hellen Kompartiments im 2. Intervall, Rearingfrequenz im hellen Kompartiment, Rearingfrequenz im hellen Kompartiment im 1. Intervall, Rearingfrequenz im hellen Kompartiment im 2. Intervall, Rearingfrequenz im dunklen Kompartiment, Rearingfrequenz im dunklen Kompartiment im 1. Intervall, Rearingfrequenz im dunklen Kompartiment im 2. Intervall, zurückgelegte Distanz, zurückgelegte Distanz im 1. Intervall und zurückgelegte Distanz im 2. Intervall nur 8 anstelle von 9 Tieren in dieser Gruppe analysiert wurden. Das entsprechende Tier wurde allerdings in die Analyse der händisch ausgewerteten Parameter, nämlich initiale lokomotorische Latenz, Zeit, die beim 1. Besuch im hellen Kompartiment verbracht wurde und Springen, eingeschlossen.

	GxE			G			E			
	Kruskal-Wallis H	df	Asymp. Sig.	Kruskal-Wallis H	df	Asymp. Sig.	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	Z	Asymp. Sig. (2-tailed)
DLB										
initial delay in locomotion	4.0	5	0.550	1.1	2	0.566	252.5	505.5	-0.013	0.990
latency light	7.1	5	0.214	2.8	2	0.245	198.0	451.0	-1.033	0.302
time in light	6.2	5	0.288	0.6	2	0.735	168.0	421.0	-1.737	0.082
time in light 1	7.8	5	0.169	4.8	2	0.090	206.0	459.0	-0.845	0.398
time in light 2	8.1	5	0.153	0.3	2	0.856	145.0	398.0	-2.277	0.023
visit in light	7.9	5	0.162	2.1	2	0.358	212.5	465.5	-0.696	0.487
visit in light 1	10.1	5	0.072	5.5	2	0.065	234.5	487.5	-0.177	0.860
visit in light 2	6.3	5	0.276	0.3	2	0.852	206.5	459.5	-0.839	0.402
rearing frequency light	12.6	5	0.027	2.6	2	0.277	172.0	425.0	-1.643	0.100
rearing frequency light 1	16.9	5	0.005	4.2	2	0.125	169.0	422.0	-1.714	0.087
rearing frequency light 2	7.1	5	0.212	1.6	2	0.439	193.0	446.0	-1.150	0.250
rearing frequency dark	7.6	5	0.181	0.4	2	0.806	185.0	438.0	-1.338	0.181
rearing frequency dark 1	9.2	5	0.103	0.9	2	0.650	235.0	488.0	-0.164	0.869

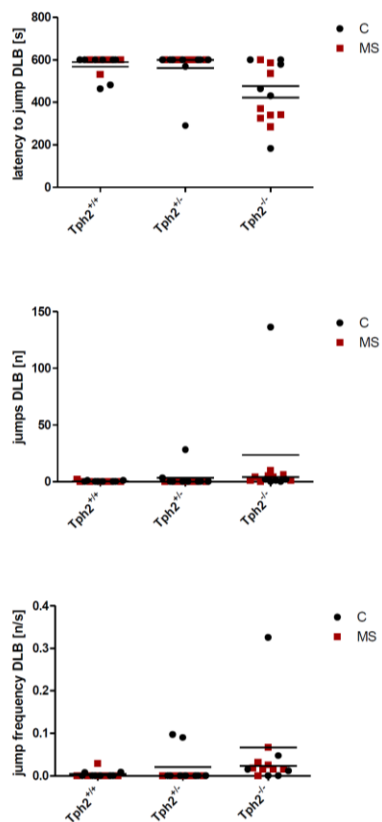
rearing frequency dark 2	11.4	5	0.043	3.1	2	0.207	121.0	374.0	-2.840	0.005
Distance	2.5	5	0.772	0.5	2	0.780	216.0	469.0	-0.610	0.542
distance 1	6.9	5	0.228	2.7	2	0.257	195.0	448.0	-1.103	0.270
distance 2	3.4	5	0.632	2.3	2	0.319	230.0	483.0	-0.282	0.778
OF										
initial delay in locomotion	14.4	5	0.013	11.7	2	0.003	192.5	402.5	-1.318	0.188
latency to centre	4.9	5	0.432	3.6	2	0.162	191.0	401.0	-1.348	0.178
time in centre	2.4	5	0.798	0.6	2	0.743	233.0	558.0	-0.388	0.698
time in centre 1	0.6	5	0.987	0.3	2	0.876	229.0	554.0	-0.480	0.631
time in centre 2	4.3	5	0.514	0.4	2	0.805	242.0	452.0	-0.183	0.855
visit in centre	1.7	5	0.888	0.5	2	0.792	227.0	437.0	-0.526	0.599
visit in centre 1	1.6	5	0.904	0.4	2	0.813	232.5	557.5	-0.400	0.689
visit in centre 2	5.6	5	0.347	0.2	2	0.902	180.5	390.5	-1.591	0.112
time/visit in centre	1.5	5	0.916	0.9	2	0.647	232.0	557.0	-0.411	0.681
time/visit in centre 1	1.5	5	0.918	1.2	2	0.558	248.0	458.0	-0.046	0.964
time/visit in centre 2	2.5	5	0.769	1.5	2	0.470	220.0	545.0	-0.685	0.493
distance in centre	2.6	5	0.758	1.1	2	0.569	219.0	429.0	-0.708	0.479
distance in centre 1	4.7	5	0.448	2.1	2	0.354	241.0	566.0	-0.206	0.837
distance in centre 2	4.4	5	0.490	0.9	2	0.628	196.0	406.0	-1.233	0.217
rearing	8.5	5	0.129	7.9	2	0.019	248.0	458.0	-0.046	0.964
rearing 1	12.0	5	0.035	8.9	2	0.012	226.0	551.0	-0.549	0.583
rearing 2	7.4	5	0.192	7.1	2	0.028	245.0	570.0	-0.114	0.909
distance	4.8	5	0.437	1.9	2	0.394	200.0	410.0	-1.142	0.253
distance 1	11.6	5	0.040	4.1	2	0.130	231.0	441.0	-0.434	0.664
distance 2	4.7	5	0.452	0.0	2	0.995	170.0	380.0	-1.827	0.068

Tabelle S2: Zusammenfassung der statistischen Analyse aller Verhaltensdaten über die gesamte Testdauer sowie über das 1. (0-5 Min) und 2. (5-10 Min.) Testintervall. Statistische Ergebnisse der Analyse von Gruppen- (GxE), Genotyp- (G) und Umwelt (E)-Effekten auf die aufgelisteten, in dem DLB- oder dem OF-Test erhobenen Verhaltensparameter. Die statistische Analyse wurde entweder mit dem Kruskal-Wallis Test durchgeführt, um einen kombinierten Effekt von genetischer Tph2-Inaktivierung und Maternaler Separation (MS) und einen Tph2 Genotypeneffekt zu untersuchen, oder mit dem Mann-Whitney U Test, um den Effekt von MS auf die beobachteten Verhaltensparameter zu analysieren. df = Freiheitsgrade (degrees of freedom). Rote Felder: $p < 0,05$

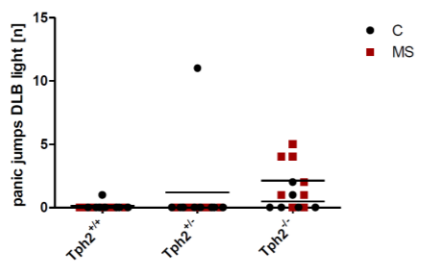
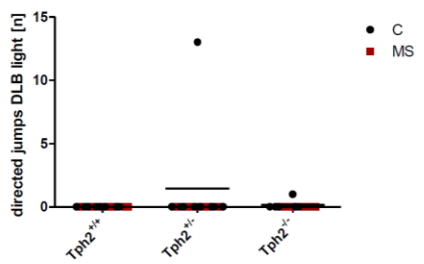
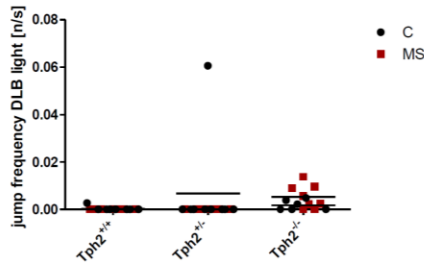
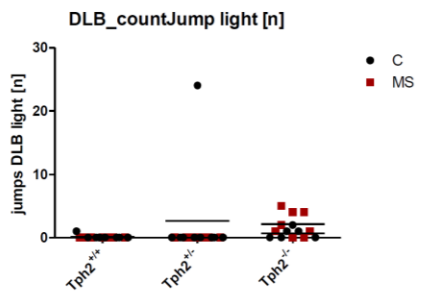
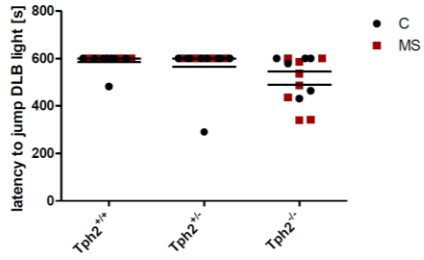
12.3 Darstellung aller in Hinblick auf Sprungverhalten erhobener Parameter in „Open field“ und „Dark-light box“-Test



Dark-light box



Light



Dark

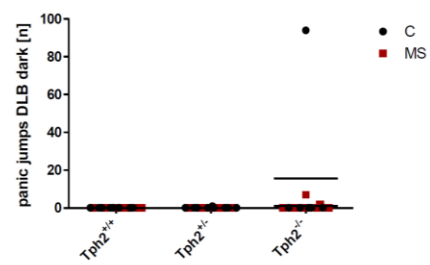
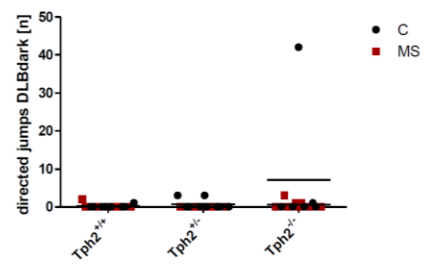
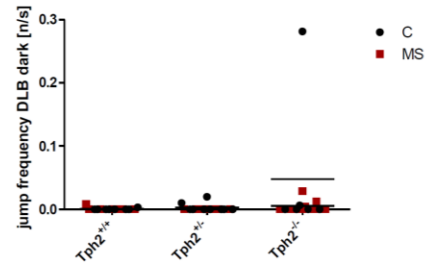
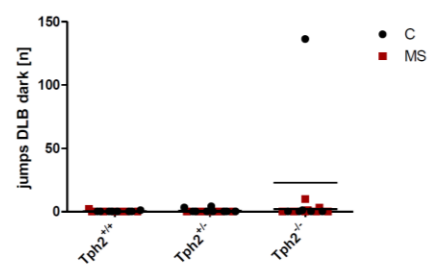
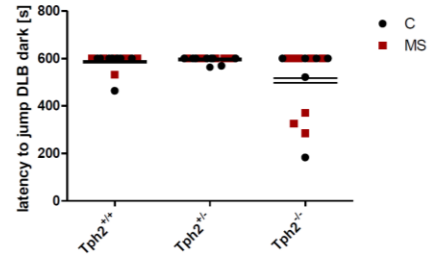


Abb. S1: Darstellung aller Parameter, die in Hinblick auf Sprungverhalten im OF- und DLB-Test erhoben wurden. Die meisten Tiere sprangen lediglich während des 2. Intervalls, wie im Graph, der die Latenzzeit bis zum 1. Sprung darstellt, gezeigt. Auch wenn nicht näher statistisch ausgewertet, fällt eine größere Anzahl und eine höhere Frequenz an Sprüngen in Tph2-defizienten Mäusen, v.a. im Kontext von MS, auf. Der DLB-Test wurde zusätzlich nach hellem und dunklem Kompartiment unterteilt analysiert. Es wurden „zielgerichtete“ und „panikartige“ Sprünge unterschieden, wobei „zielgerichtete“ Sprünge als aus der Rearingposition durchgeführte, nach oben gerichtete Sprünge definiert wurden, wohingegen „panikartige“ Sprünge weniger koordiniert, kraftvoller und impulsiver wirkten, und vorwiegend gegen die Wand anstatt nach oben gerichtet waren. n = 4-6/Gruppe.

12.4 Maße der Gehirnaeale

In Tph2 $-/-$ Mäusen konnte eine verringerte Größe verschiedener untersuchter Gehirnregionen (La und BL, $p \leq 0,030$ Kruskal-Wallis Test und $p < 0,035$ ANOVA) festgestellt werden, wobei die Fläche des La in Tph2 $-/-$ Tieren kleiner als in Tph2 $+/-$ ($p < 0,001$ Mann-Whitney U; $p = 0,002$ t-test; Bonferroni) sowie Tph2 $+/+$ Mäusen ($p = 0,003$ Mann-Whitney U; $p = 0,005$ t-test; Bonferroni) war. Ferner konnte eine verkleinerte Fläche des BL in Tph2 $-/-$ Tieren im Vergleich zu Tph2 $+/-$ Tieren gefunden werden ($p = 0,021$ Mann-Whitney U; $p = 0,023$ t-test Bonferroni). Im zentralen (Ce) Kern der Amygdala, sowie dem paraventriculären Kern des Hypothalamus (PVN) konnten hingegen keine Größenunterschiede zwischen den Gruppen beobachtet werden. Die Werte stellen die gesamte Fläche pro Gehirnregion \pm Standardfehler kombiniert aus beiden Kohorten ($n = 21-32$) und aufgetragen nach Gruppen, dar. Das reduzierte Volumen kann zum Teil durch Verlust von einzelnen Schnitten oder Beschädigung einer Hemisphäre bedingt sein. Deshalb sollten diese Ergebnisse nicht als Hinweis für eine Tph2-abhängige Verringerung der Größe einer bestimmten Gehirnregion gewertet werden, da für diese Art von Schlussfolgerung eine gründlichere und detaillierte Differenzierung und Untersuchung erforderlich wäre.

	BL	La	Ce	PVN
control Tph2 $+/+$	5975634 \pm 186588	1700582 \pm 64520	1234635 \pm 51429	380444 \pm 7775
MS Tph2 $+/+$	5764497 \pm 199502	1981797 \pm 108140	1357587 \pm 68297	396559 \pm 13114
control Tph2 $+/-$	5935762 \pm 171647	1878449 \pm 87480	1300084 \pm 52318	399326 \pm 8029
MS Tph2 $+/-$	6107297 \pm 184318	1808567 \pm 66604	1273798 \pm 40429	373488 \pm 6923
control Tph2 $-/-$	5625017 \pm 190417	1485289 \pm 53741	1192625 \pm 29288	391716 \pm 7489
MS Tph2 $-/-$	5463633 \pm 147085	1642958 \pm 87464	1221283 \pm 47305	377071 \pm 10296

Tabelle S3: **Totale Flächen gemessen für den basolateralen (BL), lateralen (La) und zentralen (Ce) Kern der Amygdala sowie den paraventriculären Kern des Hypothalamus (PVN) (Durchschnitt der totalen Fläche, Summe von rechter und linker Hemisphäre)**. In homozygot Tph2-defizienten Mäusen konnte eine verringerte Fläche des La in Tph2 $-/-$ Tieren im Vergleich zu Tph2 $+/-$ ($p < 0,001$ Mann-Whitney U; $p = 0,002$ t-test; Bonferroni) und Tph2 $+/+$ Mäusen ($p = 0,003$ Mann-Whitney U; $p = 0,005$ t-test; Bonferroni) festgestellt werden. Darüber hinaus zeigte sich eine verkleinerte Fläche des BL in Tph2 $-/-$ Tieren im Vergleich zu Tph2 $+/-$ Tieren ($p = 0,021$ Mann-Whitney U; $p = 0,023$ t-test Bonferroni).