

**Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und  
Psychotherapie**

der Universität Würzburg

**Direktor: Prof. Dr. J. Deckert**

**Auswirkungen unterschiedlicher  
Haltungsbedingungen auf Phänotyp und  
Genexpression im Mausmodell**

**Inaugural - Dissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde der

**Medizinischen Fakultät**

der

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

**Ulrich Severin Dischinger**

aus Bayreuth

Würzburg, August 2015



**Referent: Prof. Dr. Andreas Reif**

**Korreferent: Prof. Dr. Martin Fassnacht**

**Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2016**

**Der Promovend ist Arzt**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Corticotropin-releasing Hormon-System . . . . .	3
1.2	Neuropeptid Y-System . . . . .	5
1.3	Neuropeptid S-System . . . . .	7
1.4	Maternal Separation . . . . .	8
1.5	Environmental Enrichment . . . . .	12
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1	Versuchstiere . . . . .	16
2.2	Haltungsbedingungen . . . . .	17
2.2.1	Standard . . . . .	17
2.2.2	Environmental Enrichment . . . . .	17
2.2.3	Maternal Separation . . . . .	17
2.3	Phänotypisierung . . . . .	18
2.3.1	Sucrose-Präferenz . . . . .	18
2.3.2	Elevated Plus-Maze . . . . .	18
2.3.3	Light-Dark Box . . . . .	19
2.3.4	Open Field . . . . .	20
2.3.5	Barnes Maze . . . . .	21
2.3.6	Gewichtsverlauf . . . . .	22
2.4	Genexpressionsanalyse . . . . .	23
2.4.1	Sektion der Gehirne . . . . .	23
2.4.2	RNA-Extraktion . . . . .	26
2.4.3	cDNA-Synthese . . . . .	27
2.4.4	Polymerase Chain Reaction . . . . .	27
2.4.5	Evaluierung der RNA-Integrität . . . . .	28
2.4.6	Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction	30
2.5	Statistik . . . . .	34
2.6	Reagenzien . . . . .	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
3.1	Phänotypisierung . . . . .	37
3.1.1	Sucrose-Präferenz . . . . .	37
3.1.2	Elevated Plus-Maze . . . . .	39

3.1.3	Light-Dark Box . . . . .	39
3.1.4	Open Field . . . . .	42
3.1.5	Barnes Maze . . . . .	46
3.1.6	Gewichtsverlauf . . . . .	52
3.2	Genexpressionsanalyse . . . . .	54
3.2.1	NPY-System . . . . .	55
3.2.2	CRH, CRHR1 und CRHR2 . . . . .	55
3.2.3	NPSR . . . . .	61
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>74</b>

# 1 Einleitung

Die Auswirkungen rezidivierender Stressbelastung stellen ein zunehmendes gesundheitsökonomisches Problem dar. In diesem Sinne konnte eine Erhebung der „Deutschen Rentenversicherung Bund“ eine stressbedingte Einschränkung der Arbeitsfähigkeit bei einem Anteil von über 30% der arbeitenden Bevölkerung feststellen (Bethge et al., 2008). Umso wichtiger ist es, Grundlagen und Folgen rezidivierender Stressbelastung weiter zu erforschen, mit dem Ziel, neue Erkenntnisse zu neurobiologischen Zusammenhängen, Präventionsmöglichkeiten und Therapieoptionen zu gewinnen.

Besondere Bedeutung für das Risiko im weiteren Lebensverlauf somatisch und vor allem psychisch zu erkranken, scheint wiederholter Stress in der frühkindlichen Lebensphase zu haben. Schließlich konnte vielfach gezeigt werden, dass die Gehirnentwicklung und somit auch Adaptation des Gehirns an äußere Umstände mit der Geburt bei weitem nicht abgeschlossen ist. Mit logarithmischem Verlauf ist vor allem in den ersten beiden Lebensjahren (und weiter bis zur Adoleszenz) eine Zunahme von weißer und grauer Hirnsubstanz mit raschem Fortschreiten der Myelinisierung, von Synaptogenese und synaptischer Plastizität zu verzeichnen (Tau und Peterson, 2010). Dabei ist einerseits von einer gewissen genetischen Determination der frühkindlichen Gehirnentwicklung auszugehen. Andererseits dürften eben auch Umwelteinflüsse – im Sinne einer „Programmierung“ des Gehirns und damit einer Anpassung und Vorbereitung des Individuums an im weiteren Lebensverlauf zu erwartende Bedingungen – eine Rolle spielen. So kann wiederholter frühkindlicher Stress, d.h. eine auf widrige, aversive Umweltbedingungen zurückzuführende, wiederholte Bedrohung der Homöostase, im weiteren Lebensverlauf intensitätsabhängig zu Resilienz gegenüber in der Realität nicht vermeidbarem Stress mit Aufrechterhaltung (Allostase) oder rascher Wiederherstellung der Homöostase oder aber zur Entwicklung physischer und psychischer Erkrankungen führen. Letzteres wird durch zahlreiche Untersuchungen bekräftigt. So konnte gezeigt werden, dass wiederholter Stress im Kindesalter, hervorgerufen durch Missbrauch und andere traumatische Erfahrungen, die Suszeptibilität für Depressionen, Angsterkrankungen, Drogenmissbrauch, antisoziales Verhalten und Suizidalität erhöht (McCauley et al., 1997; Heim und Nemeroff, 1999; Nemeroff, 2004; Shea et al., 2005; Susman, 2006). Andererseits jedoch kann wiederholter Stress – vermutlich intensitätsabhängig – im frühkindlichen Lebensalter offenbar auch die Entwicklung von Resilienz begünstigen, wie an Totenkopffaffen gezeigt werden konnte (Lyons et al., 2010). In Übereinstimmung hiermit führen die Gaben verschieden hoher Corticosteron-Dosen über einen Zeitraum von zehn Tagen (als Imitation einer wiederholten Stressbelastung) an zwei Gruppen von Cd1-Mäusen

zu einem positiven (niedrigere Dosierung) bzw. negativen (höhere Dosierung) Effekt auf die Resilienz im späteren Leben (Macrì et al., 2009). Andererseits können sich auch dezidiert positive Umweltbedingungen im Sinne einer (in Maßen) komplexen stimulierenden Entwicklungsumgebung, wie in zahlreichen tierexperimentellen Studien gezeigt, auf die spätere Resilienz von Versuchstieren auswirken (Fox et al., 2006).

Die frühkindliche Plastizität und damit Anpassungsfähigkeit des Gehirns ist somit einerseits möglicherweise als „window of opportunity“ zu sehen: Umweltbedingungen können sich offenbar in einer Weise auf das frühkindliche Gehirn auswirken, die einer „Programmierung“ des Gehirns, solchen Bedingungen auch im weiteren Lebensverlauf im evolutionsbiologischen Sinne eines „Survival of the fittest“ optimal gewachsen zu sein, gleichkommt. Dabei sind verständlicherweise auch „Fehlprogrammierungen“, bedingt durch Divergenzen frühkindlicher und späterer Umweltbedingungen, möglich. (Macrì und Würbel, 2006) Andererseits muss die frühkindliche Lebensphase offenbar auch als „window of vulnerability“ gesehen werden: So können widrige, aversive Umweltbedingungen mit wiederholter Stressexposition in dieser Zeit auch Ursache für Pathologien im späteren Lebensverlauf sein. (Marco et al., 2011) Die exakten Auswirkungen wiederholter Stressexposition in der frühkindlichen Lebensphase auf Gehirnentwicklung sowie neuro- und verhaltensbiologische Konsequenzen sind nach wie vor nicht gänzlich aufgeklärt. Dies ist insbesondere insofern bedauernd, da weiterer Erkenntnisgewinn auf diesem Gebiet möglicherweise Präventionsstrategien und Therapieoptionen für den Menschen begründen könnte.

Ziel dieser Arbeit ist es, den bisherigen Ausführungen entsprechend, die Folgen positiver bzw. widriger/aversiver Umweltbedingungen mit rezidivierender Stressbelastung im Tierversuch weiter aufzuklären. Hierfür wurden Versuchstiere unterschiedlichen Haltungsbedingungen unterworfen, welche für die Imitation entsprechender Umweltbedingungen geeignet erscheinen. Neben den Auswirkungen auf den Phänotyp mittels Darstellung der behavioralen Konsequenzen mit Hilfe etablierter Verhaltenstestung wurden insbesondere die neurobiologischen Folgen, entsprechend o.g. „Programmierung“, von wiederholtem frühkindlichem Stress evaluiert. Hierfür wurden mittels Genexpressions-Analysen die Auswirkungen auf das Corticotropin-releasing Hormone (CRH)-System, das Neuropeptid Y (NPY)- sowie das Neuropeptid S (NPS)-System untersucht. Natürlich sind auch Auswirkungen der genannten Bedingungen auf andere Hormone/Neurotransmitter anzunehmen. Hier wären beispielhaft die Gruppe der Melanocortine sowie Leptin und Serotonin zu nennen. Aus Kapazitätsgründen konnten diese im Rahmen dieser Arbeit jedoch leider keine Beachtung finden.

## 1.1 Corticotropin-releasing Hormon-System

Das CRH-System umfasst verschiedene Interaktionen und Feedback-Mechanismen, an deren Spitze das unter anderem in parvocellulären Neuronen des Nucleus paraventricularis des Hypothalamus gebildete CRH steht, welches in verschiedenen Gehirnregionen im Rahmen einer Stressantwort freigesetzt wird. Das CRH steht an der Spitze der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HHN)-Achse und stimuliert die Freisetzung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) in der Adenohypophyse. ACTH wiederum stimuliert die Freisetzung der Glucocorticoide Cortisol (Mensch) bzw. Corticosteron (Nagetier) in der Nebennierenrinde. (Thorsell, 2010) Die Effekte der Stressachse sind – wie grundsätzlich von Selye 1950 beschrieben – hauptsächlich in einer Mobilisierung von Glucose und Fettsäuren, Steigerung cerebraler und muskulärer Perfusion, Alteration von Blutdruck, Herzfrequenz, Körpertemperatur und Immunsystem zu sehen (Carrasco und Van de Kar, 2003). Im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus inhibieren Cortisol/Corticosteron die Freisetzung von CRH und ACTH durch Bindung an Glucocorticoidrezeptoren (GR) in Hypothalamus bzw. Adenohypophyse. (Kapoor et al., 2006) Auch der dem limbischen System zugehörige Hippocampus scheint für die Inhibierung der HHN-Achse eine bedeutende Rolle zu spielen. In diesem Sinne exprimieren die Zellen des Gyrus dentatus des Hippocampus GR und Mineralocorticoidrezeptoren (MR). Binden Glucocorticoide an diese Rezeptoren auf Granularzellen des Gyrus dentatus, so üben diese exzitatorische Effekte auf Pyramidalzellen der CA3-Region aus, welche ihrerseits exzitatorisch auf Pyramidalzellen der CA1-Region des Hippocampus einwirken. Letztgenannte Zellen wiederum erregen Pyramidalzellen des Subiculum, welche abschließend inhibitorisch auf die HPA-Achse einwirken. (Schoenfeld und Gould, 2011) Die Entwicklung des Hippocampus ist dabei mit der Geburt nicht, bzw. je nach Spezies mehr oder weniger abgeschlossen. Dies bedeutet, dass nicht nur pränatal sondern auch postnatal individuelle Modifikationen des Hippocampus, im Sinne der o.g. „Programmierung“, möglich sein dürften. So konnten vielfach Effekte wiederholter Stressbelastung auf Zellproliferation, neuronale Differenzierung und Zellüberleben in Gyrus dentatus, CA1- und CA3-Region des Hippocampus in verschiedenen Spezies gezeigt werden (Stein-Behrens et al., 1994; Gould et al., 1998; Ferragud et al., 2010; Joëls et al., 2004; Phillips et al., 2006; Schoenfeld und Gould, 2011). Die beobachteten Effekte sind dabei keineswegs einheitlich (Review siehe Schoenfeld und Gould, 2011). Ob „positive“ oder „negative“ Effekte zu verzeichnen sind mag dabei von der Intensität der jeweiligen Stressoren, der untersuchten Spezies und anderen Faktoren abhängen.

CRH und seine beiden G-Protein gekoppelten Rezeptoren (CRHR1 und CRHR2)

können in zahlreichen weiteren Gehirnregionen detektiert werden. In den Amygdalae, welche ebenso dem limbischen System zugerechnet werden und Afferenzen aus dem Hypothalamus erhalten, wird CRH – wie auch im Hypothalamus – im Rahmen der Stressantwort freigesetzt. (Gray und Bingaman, 1996; Shekhar et al., 2005; Thorsell, 2010) Dabei scheint der zentrale, anxiogene Effekt von CRH hauptsächlich durch die Amygdalae mediert zu werden, da Läsionen der Amygdalae, nicht aber Läsionen des Hypothalamus die Anxiogenität von CRH verhindern (Liang et al., 1992). Andererseits scheinen CRHerge Efferenzen der Amygdalae die HPA-Achse aktivieren zu können, wie anhand spezifischen *CRH*-Knockdowns im Nucleus centralis Amygdalae (höchste Konzentration CRH-produzierender Zellen nach dem Hypothalamus) gezeigt werden konnte (Callahan et al., 2013).

Offenbar wird die Anxiogenität des CRH dabei durch den CRHR1 vermittelt (Contarino et al. 1999; Müller und Wurst, 2004). So führen Knockout, medikamentöse Antagonisierung oder Inhibierung der *CRHR1*-Expression im Tierversuch zu verminderter Ängstlichkeit (Timpl et al., 1998; Skutella et al., 1998; Deak et al., 1999). Die Bedeutung des CRHR2 ist demgegenüber weniger klar (Carrasco und Van de Kar, 2003). So führt die Deletion des *CRHR2* in Mäusen zu verstärkter Ängstlichkeit in diversen Verhaltenstests (Kishimoto et al., 2000). Der Einsatz des CRHR2-Antagonisten „Antisauvagine-30“ hingegen produziert anxiolytische Effekte (Takahashi et al., 2001).

Der Nucleus dorsomedialis des Hypothalamus scheint ebenfalls eine Rolle in Stressverarbeitung und Ängstlichkeit zu spielen (File et al., 1999; Canteras et al., 2002). Dabei dürfte der CRHR1 von entscheidender Bedeutung sein, was u.a. durch Injektion von CRH bzw. des CRHR1-Antagonisten „Antalarmin“ (Anxiolyse) gezeigt werden konnte (Silva et al., 2014). Im Frontalcortex von Wistar Kyoto Ratten wurde eine verstärkte Expression des *CRHR1* in Folge von Stressbelastung nachgewiesen (O'Malley et al., 2014). Im Globus pallidus (Teil der Basalganglien) hingegen scheint der CRHR1 anxiolytische Effekte zu mediieren (Sztainberg et al., 2011).

*CRHR1* und *CRHR2* werden außerdem in der Raphe dorsalis, Teil des Hirnstamms und wichtigster Ursprungsort serotonerger Neuronen, exprimiert. In niedriger Dosierung scheint CRH hier über CRHR1 inhibitorisch auf serotonerge Neuronen einzuwirken, in höherer Dosierung über CRHR2 jedoch exzitatorisch (Lukkes et al., 2008). Dabei scheint Stress eine Veränderung der Verteilung der beiden Rezeptoren zu bewirken: Da CRHR1 durch akuten Stress einen Shift von der Plasmamembran der exprimierenden Zellen ins Zellinnere erfährt, verändert sich das Verhältnis der Rezeptoren auf der Membran (weiter) zu Gunsten von CRHR2 (Waselus et al., 2009). Auf diese Weise werden behaviorale Konsequenzen von Stress durch CRH

auch über die Raphe dorsalis vermittelt, da sich steigende Aktivität des Serotonin-Systems u.a. über den Nucleus accumbens negativ auf Impulsivität, Aggression und Motivation auswirken dürfte (Lukkes et al., 2008).

In Übereinstimmung mit den tierexperimentell gewonnenen Erkenntnissen konnten in klinischen Studien an Probanden, welche im frühen Kindesalter wiederholt negativen Erfahrungen ausgesetzt waren, ein verringertes Hippocampusvolumen, erhöhte CRH-Spiegel im Liquor cerebrospinalis sowie eine erhöhte Glucocorticoidsensitivität (als Hinweis auf eine veränderte GR-/MR-Ausstattung im Hippocampus) detektiert werden (Review: Heim et al., 2008). Patienten mit Depression weisen ebenso erhöhte CRH-Spiegel im Liquor cerebrospinalis auf (Widerlöv et al., 1988).

Allerdings ist die Rolle von CRH, CRHR1 und CRHR2 im Rahmen von Stressantwort und Resilienz nach wie vor nur unzureichend erforscht. Ziel dieser Arbeit ist es dementsprechend, die Auswirkungen positiver bzw. negativer Umweltbedingungen auf die Expression von *CRH*, *CRHR1* und *CRHR2* tierexperimentell weiter aufzuklären.

## 1.2 Neuropeptid Y-System

Auch dem Neuropeptid Y (NPY)-System scheint eine bedeutende Rolle im Rahmen der Stressantwort zuzukommen. Das NPY, welches u.a. als potentes orexigenes Neuropeptid bekannt ist, sowie die G-Protein gekoppelten NPY-Rezeptoren NPYR1, NPYR2, NPYR4 und NPYR5 können in zahlreichen Regionen des Gehirns detektiert werden, u.a. in den Nuclei arcuatus und paraventricularis des Hypothalamus, in Amygdala, Hippocampus, Raphe dorsalis und Nucleus accumbens. (Redrobe et al., 2002) Das NPY scheint im ZNS dabei dem CRH entgegengesetzte, antidepressive und anxiolytische Eigenschaften zu haben (Heilig et al., 1989; Redrobe et al., 2005). Dabei scheinen die anxiolytischen/antidepressiven Eigenschaften des NPY im ZNS am ehesten durch NPYR1, aber auch durch NPYR5 vermittelt zu sein, während der präsynaptische autoinhibitorische NPYR2 sowie der NPYR4 eher anxiogene/depressiogene Effekte mediieren dürften (Heilig et al., 1993; Sajdyk et al., 2002; Sajdyk et al., 2004; Morales-Medina et al., 2010). So führt die Injektion von NPY in die Amygdala von Versuchstieren über den NPYR1 zu Anxiolyse, was durch den Einsatz des NPYR1-Agonisten „p[Leu<sup>31</sup> Pro<sup>34</sup>]NPY“ gezeigt werden konnte (Heilig et al., 1993). In Tiermodellen für Depression hat die Infusion von NPY in die CA3-Region des Hippocampus antidepressive Effekte, welche durch die gleichzeitige Gabe des NPYR1-Antagonisten „BIBO3304“, nicht jedoch durch die gleichzeitige Gabe des NPYR2-Antagonisten „BIIE0246“ blockiert werden können. Auch die alleinige Verabreichung von „[Leu<sup>31</sup> Pro<sup>34</sup>]PYY“ (NPYR1- und NPYR5-Agonist) oder „BI-

IE0246“ vermittelt hierbei antidepressive Effekte. (Ishida et al., 2007) Die intraven-trikuläre Applikation von NPY führt bei *NPYR1*-Knockout Mäusen nicht zu Anxiolyse (Karlsson et al., 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine mittels viraler Vektoren induzierte *NPY*- sowie eine *NPYR1*-Überexpression im Hippocampus eine reduzierte Ängstlichkeit von Versuchstieren bedingen. (Lin et al., 2010; Olesen et al., 2012) Knockout des *NPYR2* führt zu einem anxiolytischen, antidepressiven Verhaltensprofil (Carvajal et al., 2006). Ebenso zeigen *NPYR4*-Knockout-Tiere reduzierte Ängstlichkeit und Depressivität (Painsipp et al., 2008). Intraventrikuläre Applikation des NPYR5-Agonisten „[cPP(1-7),NPY(19-23),Ala(31),Aib(32),Gln(34)]hPP“ führt ebenso zu Anxiolyse (Sørensen et al., 2004).

Das NPY- und das CRH-System scheinen eng verknüpft zu sein. Im Sinne eines negativen Feedbacks zur Unterbrechung/Abschwächung von CRH-Effekten wird von einer Freisetzung von NPY nach Stress-bedingter Freisetzung von CRH ausgegangen, was eine Bedeutung des NPY für Stress-Verarbeitung und -Resilienz nahelegt (Heilig, 2004; Morales-Medina et al., 2010). So konnte gezeigt werden, dass direkte Administration von CRH in den Nucleus paraventricularis des Hypothalamus dosisabhängig einen Anstieg des NPY-Spiegels ebendort bewirkt (Morris und Pavia, 1998). Ferner scheint einmaliger akuter Stress *NPY* mRNA-Expression in der Amygdala zwar zu supprimieren (Thorsell et al., 1998), wiederholter Stress jedoch mit einer Upregulierung von präpro-NPY mRNA und NPY selbst in der Amygdala einherzugehen (Thorsell et al., 1999). Injektion von NPY in die basolaterale Amygdala scheint außerdem CRH-Effekte zu inhibieren und eine Resilienz gegenüber Stressoren zur Folge zu haben. So zeigen entsprechend vorbehandelte Ratten reduzierte Ängstlichkeit nach Urocortin I-Injektion (CRHR-Agonist) und „Restraint Stress“. (Sajdyk et al., 2006; Sajdyk et al., 2008) Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine intraperitoneale Injektion von NPY den Spiegel des neurotrophen „Brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) im Hypothalamus verringern kann (Gelfo et al., 2011). Da Stress BDNF mRNA-Expression im Hypothalamus zu induzieren (Rage et al., 2002) und andererseits intracerebroventrikuläre BDNF-Injektion die HHN-Achse zu aktivieren scheint (Givalois et al., 2004), könnte das NPY auch auf diesem Wege die Stress-Antwort modifizieren (Gelfo et al., 2011). Andererseits scheint das NPY die Stress-Achse auch direkt beeinflussen zu können. So existieren NPYerge Efferenzen vom Nucleus arcuatus zum Nucleus paraventricularis des Hypothalamus (Li et al., 2000). Diese Verbindung scheint insbesondere bei Nahrungsrestriktion/Fasten aktiviert zu werden (Dube et al., 1992) und Nahrungsaufnahme zu stimulieren, während CRH hier gegenteilige, anorexigene Effekte ausübt (Heinrichs et al., 1993). Die Freisetzung von NPY im Nucleus paraventricularis stimuliert außerdem die Freisetzung

von ACTH und Corticosteron (Inoue et al., 1989; Albers et al., 1990).

Im Tiermodell für posttraumatische Belastungsstörung (PTBS) konnte eine Downregulation des NPY in Hippocampus und Amygdala festgestellt werden, während die Gabe von NPY PTBS-Symptome abschwächen zu können scheint (Cohen et al., 2012). In klinischen Untersuchungen an Patienten mit Depression konnten reduzierte NPY-Spiegel im Liquor cerebrospinalis sowie im Plasma detektiert werden (Hashimoto et al., 1996; Hou et al., 2006). Behandlung mit selektiven Serotonin-Reuptake Inhibitoren hingegen scheint sich auf den NPY-Spiegel im Liquor cerebrospinalis positiv auszuwirken (Nikisch et al., 2005). Ferner existieren offenbar Variationen des *NPY*-Gens, welche den Träger zu einer geringeren *NPY*-Expression prädisponieren. Diese liegen in Patienten mit Depression im Vergleich zur Gesamtbevölkerung gehäuft vor. (Mickey et al., 2011) Die Bedeutung des NPY für Stress-Resilienz unterstreichend können auch in PTBS-Patienten geringere NPY-Spiegel im Liquor cerebrospinalis detektiert werden als in gesunden Probanden (Sah et al., 2009).

Da also das NPY-System eine Rolle im Rahmen von Stressverarbeitung und -resilienz zu spielen scheint, ist es Ziel dieser Arbeit, die Auswirkungen positiver bzw. negativer Umweltbedingungen auf die Expression von *NPY*, *NPYR1*, *NPYR2* und *NPYR5* tierexperimentell weiter aufzuklären.

### 1.3 Neuropeptid S-System

Eine bedeutende Rolle im Rahmen der Stressantwort scheint auch das Neuropeptid S (NPS)-System zu spielen. NPS Präkursor-mRNA wird im Hirnstamm im Bereich des Locus coeruleus, des Nucleus principalis nervi trigemini sowie des Nucleus parabrachialis lateralis exprimiert. Expression des G-Protein gekoppelten Rezeptors des NPS (NPSR, codierendes Gen: *NPSR1*) kann vor allem in den Nuclei olfactorii, in Amygdala, Subiculum (Teil des Hippocampus), Raphe dorsalis, Thalamus und Hypothalamus detektiert werden. (Okamura und Reinscheid, 2007; Clark et al., 2011; Leonard und Ring, 2011) Wie an männlichen C57bl/6-Mäusen gezeigt werden konnte, scheint das NPS einerseits positiv auf Lokomotion, Wachheit und Gedächtnis einzuwirken und andererseits anxiolytische Eigenschaften zu haben (Xu et al., 2004; Han et al., 2009). Außerdem scheint das NPS anorexigen wirksam zu sein (Beck et al., 2005). Das NPS konnte ferner als Stimulator der HHN-Achse identifiziert werden. In diesem Sinne konnten positive Effekte des NPS auf CRH, ACTH und Corticosteron gezeigt werden. (Smith et al., 2006) Andererseits scheint CRH über CRHR1 *NPS*-exprimierende Neuronen im Locus coeruleus zu aktivieren, was eine Freisetzung des NPS u.a. in der Amygdala zur Folge haben könnte. Auf diese Weise könnte das NPS im Sinne eines negativen Feedbacks zumindest den anxiogenen Teil

der Stress-Antwort abschwächen. (Jüngling et al., 2012) Allerdings ist die Physiologie des NPS insgesamt nur unzureichend aufgeklärt, wobei das NPS als Modulator diverser Neurotransmittersysteme fungieren dürfte (Gardella et al., 2013).

In klinischen Studien konnte eine Korrelation einer *NPSR1*-Genvariante mit der Entwicklung einer Panikstörung gefunden werden (Domschke et al., 2011). Inwieweit sich wiederholter frühkindlicher Stress auf die Expression von *NPS* und *NPSR1* auswirkt, ist bislang noch nicht untersucht. Dabei könnte das NPS-System sowohl für eine verstärkte Vulnerabilität gegenüber Stressoren, als auch für die Entwicklung einer Stress-Resilienz eine Rolle spielen. Ziel dieser Arbeit ist es dementsprechend, die Auswirkungen positiver bzw. negativer Umweltbedingungen auf die Expression des *NPSR1* tierexperimentell zu untersuchen.

## 1.4 Maternal Separation

Aus verschiedenen Gründen (siehe auch Diskussion) ist die Übertragbarkeit von tierexperimentell gewonnenen Erkenntnissen auf den Menschen limitiert. Dennoch ist eine tierexperimentelle Herangehensweise zur Untersuchung der Auswirkungen rezidivierender Stressbelastung unumgänglich, ein Wissensgewinn auf diesem Gebiet könnte sonst kaum erreicht werden. Als Versuchsobjekte bieten sich dabei Ratten und Mäuse an, welche unter kontrollierten Bedingungen in vergleichsweise großer Zahl gehalten werden können.

Als Imitation wiederholter frühkindlicher Stressbelastung hat sich im Tierversuch das Konzept der „Maternal separation“ (MS) bewährt. Dabei handelt es sich um eine meist in den ersten beiden Lebenswochen vollzogene, i.d.R. mehrtägige und auf ein bis drei Stunden täglich begrenzte räumliche Trennung von Muttertier und Nachkommen. Schließlich ist die Nachkommenschaft aus mehreren Gründen (Nahrungsaufnahme, Wärme, Regulation der Körperflüssigkeiten) vom Muttertier abhängig (Gubernick und Alberts, 1983), eine Abwesenheit des Muttertieres stellt somit einen Stressor dar. Untersuchungen an Ratten, welche einem MS-Protokoll unterworfen wurden, zeigen in entsprechenden Phänotypisierungstestungen (u.a. Open Field-Test (OF), Elevated Plus-Maze (EPM), s.u.) vermehrte Ängstlichkeit (Vermeidungsverhalten) dieser Versuchstiere (Kalinichev et al., 2002; Aisa et al, 2008; Marco et al., 2011; Li et al., 2013). Demgegenüber sind die Folgen von MS im Mausmodell weniger klar, die Studienlage ist hier widersprüchlich. Romeo et al. (2003) konnten in OF und EPM gesteigerte Ängstlichkeit von MS (Tag 1-9, 3h) unterworfenen männlichen C57bl/6-Mäusen nachweisen. Weibliche Mäuse dieses Stamms zeigten im selben Versuch hingegen nur dann ein reduziertes Explorationsverhalten im OF, wenn sie sich in einer bestimmten Phase ihres Sexualzyklus befanden (Romeo et al.,

2003). An männlichen Cd1-Mäusen konnte ein verstärktes Explorationsverhalten im EPM nach MS (Tag 2-14, 3h) nachgewiesen werden (Venerosi et al., 2003). Auch eine einmalige 24-stündige Separation kann zu verstärktem Explorationsverhalten im EPM, jedoch nicht zu signifikanten Unterschieden im Barnes Maze (s.u.) führen (Fabricius et al., 2008). Weiterhin konnten in C57bl/6 nach MS (Tag 0-9, 3h) höhere Corticosteron-Spiegel als Reaktion auf einen akustischen Stressor detektiert werden als in nicht-separierten Vergleichstieren (Parfitt et al., 2004). Eine weitere Studie an C57bl/6-Mäusen konnte paradoxerweise reduzierte Ängstlichkeit in der Light-Dark Box (LDB, s.u.) bei verstärktem Explorationsverhalten im OF nach MS (Tag 1-14, 3h) feststellen (Savignac et al., 2011). Millstein und Holmes (2007) fanden keine klaren Konsequenzen von MS (Tag 0-13, 3h) für das Verhalten (in EPM, LDB, OF) von Versuchstieren mehrerer Mausstämme (129s1/SvimJ, 129p3/J, A/J, Balb/cJ, Balb/CbyJ C57bl/6J, Dbal/2J, Fvb/NJ).

Auf neurobiologischer Ebene kann als Folge von MS in Ratten u.a. eine vermehrte basale Expression von *CRHR1* in Hypothalamus, bzw. post-Stress in präfrontalem Cortex und Hippocampus sowie eine post-Stress vermehrte Expression von *CRHR2* in der Amygdala detektiert werden (O'Malley et al., 2011). Außerdem konnte an Ratten gezeigt werden, dass MS erhöhte basale Plasmacorticosteron-Spiegel, eine verminderte GR-Dichte im Hippocampus sowie eine erhöhte CRH mRNA-Dichte im Nucleus paraventricularis bedingen kann (Aisa et al., 2008; Rivarola et al., 2008). In C57bl/6-Mäusen konnte in Folge von MS eine Reduktion der Neuronenzahl im Gyrus dentatus des Hippocampus detektiert werden (Fabricius et al., 2008). Weiterhin fanden Horii-Hayashi et al. (2013) in C57bl/6-Mäusen als Folge von MS (Tag 1-14, 3h) veränderte Expressionsraten des proto-onkogens *c-Fos* (als Indikator neuronaler Aktivität) in verschiedenen Gehirnregionen (u.a. CA1- und CA3-Region des Hippocampus). In diesem Sinne scheinen MS unterworfenen Versuchstiere durch entsprechende frühkindliche „Programmierung“ (durch MS-induzierten, wiederholten Stress) ein verändertes „Stress-System“ aufzuweisen und können so Stressoren gegenüber im weiteren Lebensverlauf vulnerabler sein als die entsprechenden Vergleichstiere.

Auch das NPY-System scheint durch MS beeinflusst werden zu können. So konnte in Sprague-Dawley Ratten, welche einem MS-Protokoll unterworfen worden waren, im Vergleich zu Kontrolltieren geringere NPY-Immunoreaktivität im Hippocampus, jedoch vermehrte NPY-Immunoreaktivität im Hypothalamus detektiert werden (Jiménez-Vasquez et al., 2001). Außerdem scheint das NPY-System eine wesentliche Rolle für die neurobiologischen Konsequenzen der MS zu spielen. In diesem Sinne konnten Schmidt et al. (2008) reduzierte Plasma-Corticosteronspiegel, erhöhte CRH mRNA- sowie erhöhte GR mRNA-Spiegel im Nucleus paraventricularis in *NPY* de-

fizienten Mäusen im Vergleich zu *NPY* „wild-type“ Mäusen nach achtstündiger MS feststellen. Ferner kann sich MS möglicherweise positiv auf den weiteren Gewichtsverlauf und die Entwicklung von Übergewicht auswirken (Miki et al., 2013). Der Vollständigkeit halber soll nicht unerwähnt bleiben, dass auch Effekte der MS auf das Serotonin-System gezeigt werden konnten. In diesem Sinne konnte in C57bl/6-Mäusen unter MS-Bedingungen eine Reduktion von Tryptophanhydroxylase 2- und Serotonintransporter-mRNA in der dorsalen Raphe dorsalis und ventralis festgestellt werden (Own et al., 2013). Auch in Ratten führt MS zu Veränderungen des Serotonin-Systems (Lee et al., 2007; Xue et al., 2013).

Jedoch ist auch der gegenteilige Effekt von MS, d.h. eine Resilienz gegenüber Stressoren, möglich, wie am Beispiel von Totenkopffaffen, welche nach MS geringere Ängstlichkeit und geringere Cortisolspiegel aufwiesen, gezeigt werden konnte (Levine und Mody, 2003; Lyons et al., 2010). Auch an Nagetieren konnte eine solche Stressresilienz nach MS gezeigt werden. Entscheidend scheint hier die Länge der Separation zu sein. So konnten in C57bl/6-Mäusen nach zehnminütiger MS („Handling“, Tag 0-9) geringere Corticosteron-Spiegel als Reaktion auf einen akustischen Stressor detektiert werden als in nicht-separierten Vergleichstieren (Parfitt et al., 2004). Auch wiesen Nmri-Mäuse nach fünfzehnminütiger MS (Tag 1-14) geringere Ängstlichkeit im EPM als Kontrolltiere auf (Moles et al., 2004).

Die Vorteile der MS als Imitation einer widrigen/aversiven Umweltbedingung und zur Erzeugung wiederholter Stressbelastung im Tiermodell liegen in der vergleichsweise einfachen Durchführbarkeit; ein umfangreiches Handling der sehr jungen und somit auch vulnerablen Versuchstiere ist nicht notwendig. Auch scheint die Herangehensweise vergleichsweise wenig artifiziell, ist doch eine längere Abwesenheit des Muttertieres von der Nachkommenschaft zumindest bei Nagetieren auch in der Natur, z.B. zur Nahrungssuche, möglich und dient den anfangs nestgebundenen Nachkommen möglicherweise als Indikator der Widrigkeit der bestehenden Umweltbedingungen. Dennoch ist die Übertragbarkeit mittels MS gewonnener Versuchsergebnisse auf den Menschen – insbesondere bei Einsatz von Nagetieren als Versuchsobjekte – aus verschiedenen Gründen eingeschränkt. So scheinen die Auswirkungen von MS im Nagetiermodell in gewissem Ausmaß vom Verhalten des Muttertieres abzuhängen. Nach der Trennung scheinen die Muttertiere durch verstärktes Fürsorgeverhalten gegenüber der Nachkommenschaft die Auswirkungen der Separation – zumindest bis zu einem gewissen Grad – abschwächen zu können. MS und maternales Fürsorgeverhalten scheinen sich somit entgegengesetzt auf die Nachkommen auszuwirken. (Macrì und Würbel, 2006) Dementsprechend korreliert maternales Fürsorgeverhalten negativ mit ACTH-Spiegel, Corticosteron-Anstieg post-Stress und hypothalamischer

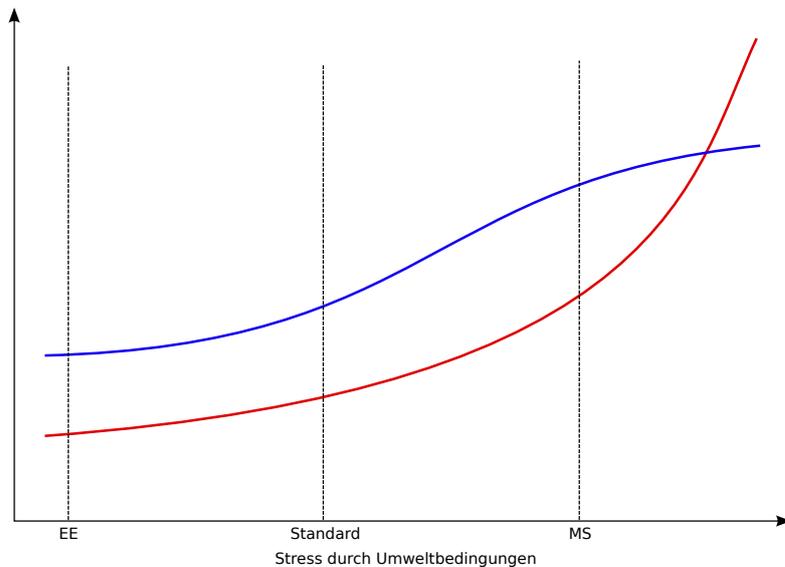


Abbildung 1: Mit zunehmender Widrigkeit der Umweltbedingungen (x-Achse) nehmen die Auswirkungen auf die Stress-Achse (rote Kurve) der Versuchstiere zu. Maternales Fürsorgeverhalten (blaue Kurve) kann dies bis zu einem gewissen Grad abschwächen. Modifiziert nach Macrì und Würbel, 2006.

*CRH* mRNA-Expression sowie positiv mit hippocampaler *GR* mRNA-Expression (Liu et al., 1997). Es ist also davon auszugehen, dass neben der MS-Dauer (und anderen unvermeidbaren Stressoren) insbesondere auch das Ausmaß an maternalem Fürsorgeverhalten bedeutenden Einfluss auf den späteren Phänotyp der Nachkommen haben dürfte (siehe Abbildung 1). Welches Gewicht die einzelnen Faktoren dabei haben, dürfte außerdem in bedeutendem Maße von Gattung, Art und Stamm der Versuchstiere abhängen, was die Auswahl eines geeigneten Protokolls zusätzlich erschwert.

Eine weitere Einschränkung der Nutzung von Nagetieren zur Untersuchung von früher wiederholter Stressbelastung scheint in einer in Mäusen und Ratten in den ersten Lebenstagen (in Mäusen Tag 1-12) physiologischerweise verminderten Responsivität auf Stressoren zu liegen (Schmidt et al., 2005; Parker et al., 2006). In diesem Sinne führt die Exposition mit einem milden Stressor in Cd1-Mäusen an Lebensstag 18 zu einem deutlichen Anstieg von ACTH und Corticosteron, an Lebensstag 9 hingegen lediglich zu einem geringen Anstieg dieser Hormone (Schmidt et al., 2009). Diese „stress hyporesponsive period“ (SHRP) dürfte am ehesten auf einen in diesem Zeitraum verstärkten, GR vermittelten negativen Feedback der Stress-Achse zurückzuführen sein (Schmidt et al., 2005). Maternales Fürsorgeverhalten scheint für die SHRP dabei wesentlich zu sein: So konnte gezeigt werden, dass maternales Für-

sorgeverhalten negativ mit post-Stress ACTH und Corticosteron-Spiegel und positiv mit hippocampaler *GR* mRNA Expression und Glucocorticoid-Feedbacksensitivität korreliert (Liu et al., 1997). Möglicherweise stellt die SHRP bei Nagetieren einen gewissen Schutz vor einer Fehlanpassung (s.o.) der Nachkommen dar. So können beispielsweise – in freier Wildbahn vermutlich unabdingbare – Abwesenheiten des Muttertieres vom Nest bis zu einem gewissen Maß ohne Konsequenzen (auf neuronaler Ebene und für den späteren Phänotyp) toleriert werden, auch durch eine Zunahme maternalen Fürsorgeverhaltens post Separationem (Millstein und Holmes, 2007). Die Übertragbarkeit mittels MS an Nagern gewonnener Resultate einschränkend scheint eine solche SHRP in Primaten, die i.d.R. nicht nestgebunden sind, nicht zu existieren. Auch scheint MS in Primaten zwar zu Stress-Resilienz im späteren Leben führen zu können, jedoch nicht mit einer Zunahme des maternalen Fürsorgeverhaltens post Separationem verbunden zu sein. (Parker et al., 2006; Lyons et al., 2010)

Trotz der genannten Einschränkungen kann das Konzept der MS bei durchdachter Anwendung dennoch für die Imitation einer widrigen/aversiven Umweltbedingung zur Erzeugung wiederholter Stressbelastung und zur Erforschung von deren Auswirkungen genutzt werden, wie in zahlreichen Studien belegt werden konnte (siehe z.B. Romeo et al., 2003; Aisa et al., 2008; Li et al., 2013; Own et al., 2013; Nishi et al., 2014). Andererseits sind jedoch weitere Untersuchungen der Suszeptibilität der verschiedenen Mausstämmen für MS und die Erueirung der verhaltens- und neurobiologischen Konsequenzen dringend erforderlich.

## 1.5 Environmental Enrichment

Wie oben bereits angedeutet, können sich auch dezidiert positive Umweltbedingungen günstig auf die Entwicklung von Resilienz auswirken. Dies legt die Untersuchung der Auswirkungen einer entsprechenden Haltungsbedingung auf Phänotyp und Genexpression im Vergleich zu MS nahe, umso mehr, da davon auszugehen ist, dass Versuchstiere auch unter Standardhaltungsbedingungen, welche sich ja deutlich von den natürlichen Lebensbedingungen der Tiere unterscheiden, einer gewissen Stressbelastung ausgesetzt sind. Als alleinige Vergleichsgruppe für die Untersuchung wiederholter Stressbelastung sind Standardhaltungsbedingungen somit nur eingeschränkt geeignet. (Laviola et al., 2008) Entsprechend sollte also (zusätzlich zu Standardhaltungsbedingungen) eine Gruppe gebildet werden, deren Haltungsbedingungen den natürlichen Lebensbedingungen der Tiere im Rahmen der technischen Möglichkeiten am nächsten kommen. Hierfür hat sich das Konzept des „Environmental Enrichment“ (EE) vielfach bewährt. Als „enriched“ im Vergleich zu Standardhaltebedingungen gel-

ten Haltungsbedingungen dann, wenn sie größere Käfige, mehrere Tiere pro Käfig und damit die Möglichkeit zur sozialen Interaktion sowie die Ausstattung der Käfige mit regelmäßig auszutauschenden Spielobjekten (Tunnel, Laufräder usw.) und Nestbaumaterial vorsehen (van Praag et al., 2000).

Untersuchungen der behavioralen Auswirkungen von EE in Mäusen und Ratten konnten mehrheitlich Stressresilienz, reduzierte Ängstlichkeit sowie verbessertes Lernen und Gedächtnis von unter EE-Bedingungen gehaltenen Versuchstieren zeigen (van Praag et al., 2000; Leggio et al., 2005; Fox et al., 2006): So konnten Huang et al. an C57bl6-Mäusen mittels Barnes Maze einen positiven Effekt von EE auf räumliche Gedächtnisleistungen nachweisen (Huang et al., 2007). Weiterhin wurden mittels EPM negative Auswirkungen von EE auf die Ängstlichkeit von Long-Evans Ratten (Galani et al., 2007), Balb/C-Mäusen und C57bl/6-Mäusen (Chapillon et al., 1999) festgestellt. Außerdem konnten an Mäusen (C57bl/6) antidepressive Effekte von EE detektiert werden (Llorens-Martín et al., 2007; Xu et al., 2009). Das Explorationsverhalten von Mäusen (Cf1 männlich, C57bl/6 weiblich) im Open Field wird durch EE positiv beeinflusst (Kazlauckas et al., 2011; Kobiló et al., 2011).

Auf neuronaler Ebene dürfte dies einerseits auf eine vermehrte Expression von *GR* in den Regionen CA1 und CA2 des Hippocampus und damit auf einen verstärkten negativen Feedbackmechanismus der HPA-Achse zurückzuführen sein (Olsson et al., 1994). Andererseits dürften eine beschleunigte neuronale Entwicklung und GABAerge Neurotransmission sowie vermehrte Synaptogenese im Gyrus dentatus und in den Regionen CA1 und CA3 des Hippocampus eine Rolle spielen (Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 2000; Olson et al., 2006; Llorens-Martín et al., 2007; He et al., 2010; Liu et al., 2012). Außerdem könnte dem anxiolytischen Effekt von EE eine verminderte Expression des *CRHR1* in der basolateralen Amygdala zugrunde liegen (Sztainberg et al., 2010). Hippocampale BDNF-Spiegel werden durch EE positiv beeinflusst (Branchi et al., 2006; Kazlauckas et al., 2011). Weiterhin werden die Expressionsraten zahlreicher Gene im Striatum, deren Produkte Zell-Proliferation/-Differenzierung und Signaltransduktion beeinflussen, durch EE modifiziert (Thiriet et al., 2008). Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass EE die stressbedingte Freisetzung von Dopamin und die Dopamin-Rezeptordichte im präfrontalen Cortex zu reduzieren scheint (Segovia et al., 2008; Del Arco et al., 2007), und dass offenbar auch das Endocannabinoid-System (El Rawas et al., 2011) sowie das Serotonin-System in Frontalcortex und Striatum (Brenes et al., 2008) sowie Hippocampus (Rasmuson et al., 1998) durch EE modifiziert werden können. Ferner konnten Auswirkungen von EE auf die Expressionsraten zahlreicher corticaler Gene, deren Produkte DNA/RNA-Synthese, Signaltransduktion und neuronales

Wachstum beeinflussen, gezeigt werden (Rampon et al., 2000).

Es ist dabei nicht auszuschließen, dass die Auswirkungen von EE in bedeutendem Umfang auf eine durch Käfiggröße und stimulierende Objekte verstärkte Lokomotion der Versuchstiere zurückzuführen sind (van Praag et al., 2000; Kobilko et al., 2011). Schließlich scheint sich körperliche Aktivität per se positiv auf die synaptische Plastizität u.a. im Gyrus dentatus auszuwirken (Christie et al., 2008). So konnte in C57bl/6-Mäusen ein Anstieg hippocampaler BDNF mRNA nach sowie ein anxiolytischer/antidepressiver Effekt von Laufradaktivität gezeigt werden (Duman et al., 2008). Andererseits konnten Effekte von EE auch unabhängig von hippocampaler Neurogenese nachgewiesen werden (Meshi et al., 2006). Die Auswirkungen von EE dürften weiterhin in bedeutendem Maße von Spezies und Stamm der eingesetzten Versuchstiere abhängen (van de Weerd et al., 1994). Außerdem scheint die Dauer der EE-Bedingungen eine wesentliche Bedeutung für die Auswirkungen auf den Phänotyp von Versuchstieren zu haben; eine minimale Dauer von drei Wochen scheint sinnvoll zu sein (Leger et al., 2014). Auch für EE existiert, ebenso wie für MS, kein einheitliches Protokoll. Bei einem Einsatz von EE sollte jedoch darauf geachtet werden, dass eine „Überstimulation“ durchaus entgegengesetzte Effekte auf Versuchstiere haben kann (Fox et al., 2006).

Die Nutzung von EE-Bedingungen als Vergleichsgruppe dürfte auch auf Grund folgender Überlegungen sinnvoll sein: Wie bereits erwähnt sind Standardhaltungsbedingungen als durchaus artifiziell zu betrachten und können für die Versuchstiere eine gewisse Stressbelastung darstellen. Dies trifft natürlich auch auf die Muttertiere der eigentlichen Versuchstiere zu, welche diesen haltungsbedingten Stress bereits während der Gravidität an den ungeborenen Nachwuchs weitergeben dürften. So konnte in zahlreichen tierexperimentellen Studien – wie oben bereits erwähnt – gezeigt werden, dass pränataler maternaler Stress und damit eine Belastung des Foetus mit Glucocorticoiden zu lebenslang messbaren Alterationen der neuroendokrinen Funktionalität und des Verhaltens (gesteigerte Ängstlichkeit, Einschränkung von Lernen und Gedächtnis), von Metabolismus und Immunsystem sowie zu strukturellen Veränderungen zahlreicher Gehirnregionen führen kann (Kapoor et al., 2006; Darnaudéry und Maccari, 2008; Weinstock, 2008). Die sich in entsprechenden Verhaltenstestungen im weiteren Lebensverlauf durch gesteigerte Ängstlichkeit äußernde, verstärkte Stressreaktivität dürfte dabei zum einen auf eine veränderte Expression von *GR* und *MR* sowie eine Verlangsamung des Zellaustauschs im Hippocampus zurückzuführen sein (Kapoor et al., 2006; Darnaudéry und Maccari, 2008; Baquedano et al., 2011). Zum anderen scheint pränatal eine Alteration der placentaren 11-beta-Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2, welche die Übertragung maternalen

Cortisols auf den Foetus normalerweise verhindert, eine Rolle zu spielen (Bertram et al., 2002; Kapoor et al., 2006; Seckl und Holmes, 2007). Was in freier Wildbahn für eine Anpassung der Nachkommenschaft an zu erwartende Umweltbedingungen durchaus sinnvoll sein dürfte, kann unter tierexperimentellen Bedingungen also zu einer ungewollten Prägung der Versuchstiere führen und so die Interpretierbarkeit der Resultate erschweren. Diese Hypothek kann durch den Einsatz eines EE-Protokolls eventuell vermieden werden, da EE die Effekte pränatalen Stresses auf Verhalten und neurobiologische Konsequenzen möglicherweise nivellieren kann (Morley-Fletcher et al., 2003).

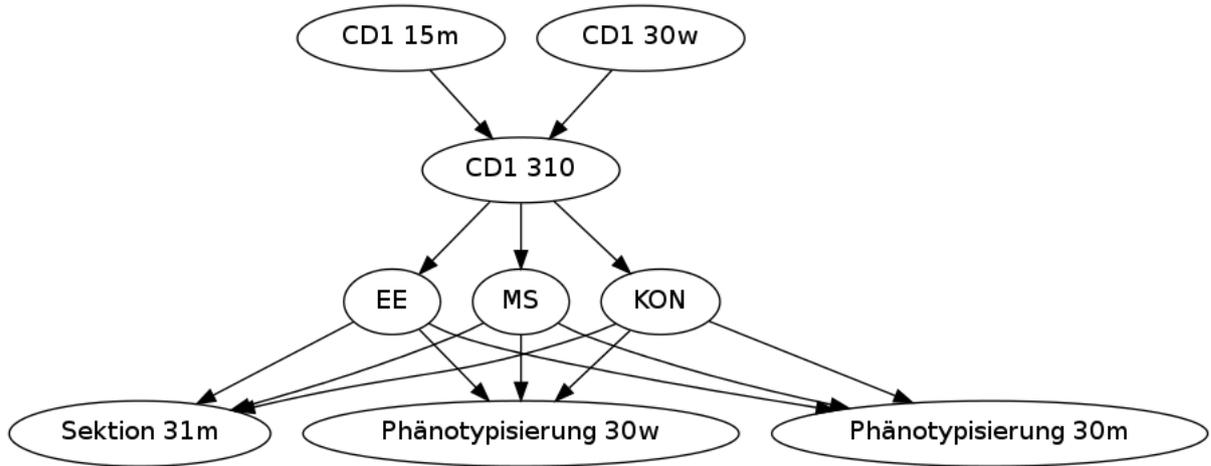


Abbildung 2: Versuchsablauf schematisch. w = weiblich, m = männlich.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Um eine ausreichende Anzahl an Versuchstieren gleichen Alters zu erhalten, wurden in 15 Käfigen jeweils zwei weibliche mit einer männlichen Maus (alle im Alter von sechs bis acht Wochen) des Cd1-Stammes verpaart, welcher wegen seiner in zahlreichen Studien offenbarten Suszeptibilität für Umwelteinflüsse ausgewählt wurde (Enthoven et al., 2008a; Enthoven et al., 2008b; Macri et al., 2009; Martini et Valverde, 2011; Venerosi et al., 2003). Nach einer Verpaarungszeit von einer Woche wurden die männlichen Cd1-Mäuse aus den Käfigen, welche zufällig den drei Hal- tungsgruppen EE, MS und Standard zugeordnet wurden, entfernt. Durch tägliche Kontrollen wurden in weiterer Folge Wurfdatum und -größe protokolliert. Alle 310 Jungen wurden im Zeitraum von Tag 19 bis 23 nach Beginn der Verpaarung geboren. Bis auf ein Junges erreichten alle den Tag des Absetzens (Trennung vom Mutter- tier), welcher auf 20 Tage nach Geburt festgelegt wurde. Um die „experimenter’s bias“ möglichst gering zu halten, wurden alle human-animal Interaktionen auf drei Personen beschränkt. Das deutsche Tierschutzgesetz (insbesondere §§7-9) sowie die EU-Richtlinie 2010/63/EU wurden stets strengstens befolgt. Das Versuchsvorhaben wurde unter dem Aktenzeichen 55.2-2532-92/12 durch die Regierung von Unterfran- ken genehmigt. Die grundsätzliche Versuchsstruktur ist in Abbildung 2 dargestellt.

## **2.2 Haltungsbedingungen**

### **2.2.1 Standard**

Als Käfige wurden ausschließlich Makrolon Typ III Käfige mit einer Grundfläche von ca. 900cm<sup>2</sup> verwendet. Diese wurden bis zu einer Höhe von 3-4 cm mit Sägespänen angefüllt. Die Standardhaltungskäfige wurden außerdem mit drei bis sechs Lagen einfacher Zellstofftücher und zwei unbedruckten Standardeierschachteln für sechs Eier (jeweils Deckel oder Boden) als Nistmaterial versehen. In zweiwöchentlichen Abständen erfolgten Wechsel von Käfigen und Nistmaterial. Außerdem wurden die Käfige mit einer Wasserflasche versehen, welche wöchentlich gewechselt wurde, sowie mit ausreichend Futter. Die Standardhaltungsgruppe wird im Folgenden synonym auch als Kontrollgruppe (KON) bezeichnet. Bis zum Tag des Absetzens wurden – wie auch in den beiden anderen Haltungsgruppen – jeweils zwei Muttertiere mit Nachkommenschaft in einem Käfig gehalten.

### **2.2.2 Environmental Enrichment**

Die Käfige dieser Haltungsgruppe (EE) wurden ebenso mit Sägespänen und Zellstofftüchern, jedoch nur mit einer Standardeierschachtel (Deckel oder Boden) versehen. Außerdem wurden die Käfige entweder mit zwei kleinen (Holzleitern, mit Glöckchen versehene Spiegel, Holzzylinder) oder einem großen (Laufräder, Holzröhren, Holzzippen, Holzdächern) Spielobjekt ausgestattet. Im wöchentlichen Abstand wurden die Spielobjekte gegen andere ausgetauscht, im zweiwöchentlichen Abstand erfolgten außerdem Wechsel von Käfigen und Nistmaterial.

### **2.2.3 Maternal Separation**

Die Versuchstiere dieser Gruppe (MS) waren denselben grundsätzlichen Haltungsbedingungen unterworfen wie die Tiere der Kontrollgruppe. Jedoch wurden die MS-Tiere ab Tag zwei post natum über insgesamt drei Wochen täglich für drei Stunden (von ca. 11 bis 14 Uhr) vom Muttertier separiert. Hierfür wurde die gesamte Nachkommenschaft mit bestehendem Nest dem Heimkäfig entnommen und in Makrolon Typ II Käfige überführt. Um die fehlende Körperwärme des Muttertieres zu kompensieren und eine Temperatur von anfangs ca. 30°C zu erzeugen, wurden die Tiere von 80cm über dem Käfig installierten Infrarot-Lampen bestrahlt. Um eine ausreichende Luftfeuchtigkeit von 60% zu gewährleisten wurden die Käfige ferner mit feuchten Tüchern bedeckt. Es erfolgten kontinuierliche elektronische Messungen von Temperatur und Luftfeuchtigkeit und – falls nötig – Adaptation der Maßnahmen. Um der Entwicklung und damit auch einem geringeren Wärmebedürfnis der Nach-

kommenschaft Rechnung zu tragen, wurde die Installationshöhe der Infrarotlampen im Laufe der drei Wochen stetig gesteigert.

## 2.3 Phänotypisierung

Für die Eruierung des Verhaltensphänotyps von Versuchstieren stehen zahlreiche Verhaltenstests zur Verfügung. Diese Tests beruhen auf verhaltensbiologischen Beobachtungen und erlauben so u.a. eine Analyse von Ängstlichkeit (ausgedrückt durch Vermeidungsverhalten), lokomotorischer Aktivität sowie von Lernen und Gedächtnis, Eigenschaften bzw. Fähigkeiten, die durch MS bzw. EE beeinflusst werden können (siehe 1.4, 1.5). Die eingesetzten Tests werden im Folgenden näher erläutert. Insgesamt 60 Versuchstiere (30 männlich, 30 weiblich) wurden den Testungen zugeführt. Ab der vierten Lebenswoche wurden diese Tiere über den gesamten Zeitraum der Verhaltenstests gleichgeschlechtlich und gruppengleich zu zweit gehalten.

### 2.3.1 Sucrose-Präferenz

Nagetiere bevorzugen Zuckerlösungen (Sucrose) vor klarem Wasser. Werden beide Trinkquellen zur Auswahl gestellt, dürften Reduktionen dieser Sucrose-Präferenz auf Anhedonie und Depressivität hinweisen (Appelbaum und Holtzman 1986). Um Unterschiede der drei Gruppen in dieser Hinsicht zu untersuchen, wurde den Versuchstieren über einen Zeitraum von jeweils zwei Tagen sowohl vor als auch nach den sonstigen Verhaltenstests zwei Wasserflaschen angeboten, die erste mit klarem Leitungswasser gefüllt, die zweite mit einer 1% Sucrose-Lösung. Zur Detektion des Verbrauchs und damit der Präferenz wurden die Gewichte der Wasserflaschen vor, täglich während und nach dem jeweiligen Untersuchungszeitraum erfasst. Um eine Verfälschung durch eine mögliche Seitenpräferenz zu vermeiden, wurden die Positionen der Flaschen am jeweils zweiten Untersuchungstag vertauscht. Die Sucrose-Präferenz (in %) wurde wie folgt berechnet:  $\frac{\text{Konsumierte Sucroselösung}}{\text{Konsumierte Sucroselösung} + \text{Konsumiertes Wasser}} * 100$ . Zum Versuchszeitpunkt waren die Versuchstiere 10 bzw. 21 Wochen alt.

### 2.3.2 Elevated Plus-Maze

Das Elevated Plus-Maze (EPM) ist ein häufig eingesetztes Instrument zur Beurteilung der Ängstlichkeit von Versuchstieren (Walf und Frye, 2007) und bedient sich dabei des nagetiertypischen Konfliktes zwischen Explorationsdrang und Vermeidung offener Flächen und Höhen (File, 2001). Das verwendete EPM ist ein auf ca. 62cm langen Beinen stehender Testapparat, welcher aus einem zentralen 5x5cm messenden Quadrat mit vier daran angeschlossenen Armen (davon je zwei gegenüberliegende

offen, zwei geschlossen) von 30cm Länge und 5cm Breite besteht. Die beiden offenen Arme sind, um ein akzidentielles Abstürzen der Versuchstiere zu verhindern, seitlich mit 2x2mm messenden Kanten ausgestattet, während die beiden geschlossenen Arme mit 15cm hohen Wänden aus schwarzem Plastik versehen sind. Die Böden von Armen und zentralem Quadrat bestehen aus Infrarot-durchlässigem schwarzem Plexiglass. Länge des Aufenthalts bzw. Häufigkeit des Eintritts des Versuchstieres in den/die offenen Armen des EPM scheinen negativ mit der Ängstlichkeit des Versuchstiers zu korrelieren (Fernández Espejo, 1997; Carola et al., 2002; Wolf und Frye, 2007). In diesem Sinne verbringen Versuchstiere nach der Einnahme anxiolytisch wirksamer Substanzen (Benzodiazepine, Ethanol) mehr Zeit auf den offenen Armen des EPM (Lister, 1987). Die Anzahl der Eintritte/Wiedereintritte in die geschlossenen Arme dürfte hingegen positiv mit der Ängstlichkeit des Versuchstiers korrelieren (Fernández Espejo, 1997; Carola et al., 2002). Die gesamte während eines Versuchsdurchlaufs zurückgelegte Strecke bzw. die Gesamtzahl der Armeintritte korrelieren positiv mit dem allgemeinen lokomotorischen Aktivitätsniveau des Versuchstiers (Fernández Espejo, 1997). Die zu testenden Versuchstiere wurden zu Beginn jeder Testung im zentralen Quadrat zu einem der offenen Arme hin platziert. Unmittelbar hierauf wurde die 5 Minuten dauernde Testung gestartet. Während des Testzeitraumes wurden alle Bewegungen des Versuchstieres mittels des VideoMot 2-Systems aufgezeichnet und anhand der dem System übergebenen definierten Areale (geschlossene Arme, offene Arme, zentrales Quadrat) analysiert. Außerdem wurden Aufstellen der Tiere auf die Hinterbeine und Anlehnen an die Wände des EPM („Rearing“), was mit der allgemeinen lokomotorischen Aktivität und Ängstlichkeit der Versuchstiere korreliert, und Fellpflege („Grooming“) als Übersprungbewegung mit Ängstlichkeit korrelierend, manuell mitgezählt (Fernández Espejo, 1997; Carola et al., 2002). Am Ende des Versuchszeitraumes wurden, nach Rücktransport des Versuchstieres in den entsprechenden Heimatkäfig, Faeces- und Urinmengen dokumentiert und die Oberfläche des EPM mit Terralin gereinigt. Zum Versuchszeitpunkt waren die Versuchstiere 11 Wochen alt. Die Versuche wurden an aufeinanderfolgenden Tagen jeweils zwischen 10 Uhr und 15 Uhr durchgeführt.

### **2.3.3 Light-Dark Box**

Auch die Light-Dark Box (LDB) ist ein Testapparat, bestehend aus zwei Räumen, einem hellen und einem dunklen, welche durch ein zentrales Loch verbunden sind. Die LDB dient – das nagetiertypische Vermeidungsverhalten heller Bereiche nutzend – zur Beurteilung der Ängstlichkeit von Versuchstieren (Hascoët et al., 2001). Als LDB diente eine rechteckige, oben offene Box von 60cm Länge, 40cm Breite und 27cm

Höhe. Dem Testprinzip (nach Crawley et Goodwin, 1980) entsprechend ist diese Box durch eine Trennwand in zwei Kompartimente unterteilt: Ein dunkles abdeckbares (20x40cm), dessen Wände aus schwarzem Plexiglas bestehen, sowie ein helles Kompartiment (40x40cm) mit Wänden aus weißem Plexiglas. Durch eine zentral bodenständige Öffnung (5x6cm) besteht eine Verbindung der beiden Kompartimente. Zu Beginn jedes Testdurchlaufs wurde das Versuchstier im dunklen Kompartiment platziert und dieses mit einer Abdeckung versehen. Über die darauf folgenden fünf Minuten erfolgte eine Video-Aufzeichnung des hellen Kompartiments und folgende Ereignisse wurden hierüber simultan manuell erfasst: Die gesamte Aufenthaltsdauer des Versuchstiers im hellen Kompartiment, die Anzahl der Transitionen zwischen den beiden Kompartimenten als wichtigster Maßstab der Ängstlichkeit der Versuchstiere (Crawley et Goodwin, 1980), die Zeitdauer, nach welcher das Versuchstier erstmalig in das helle Kompartiment blickt (Kopf des Tiers im hellen Kompartiment), sowie die Zeitdauer, nach welcher sich das Versuchstier erstmalig mit allen vier Pfoten im hellen Teil befindet. Zu beachten ist dabei, dass eine generell geringe motorische Aktivität von Versuchstieren und damit seltene Transitionen als Ängstlichkeit fehlinterpretiert werden kann (File, 2001). Nach Ablauf der Versuchsdauer und Transfer des Versuchstieres in den entsprechenden Heimatkäfig wurden Faeces- und Urinmengen dokumentiert und die Box mit Terralin gereinigt. Alle Testungen der 11 Wochen alten Tiere erfolgten zwischen 10 Uhr und 15 Uhr.

#### **2.3.4 Open Field**

Das Open Field (OF) dient einerseits zur Beurteilung der allgemeinen lokomotorischen Aktivität und des Explorationsverhaltens und andererseits zur orientierenden Evaluierung der Ängstlichkeit von Versuchstieren (Lipkind et al., 2004) und bedient sich dabei – wie auch das EPM – des nagetiertypischen Konfliktes zwischen Explorationsdrang und Vermeidung offener Flächen. Vermehrte Ängstlichkeit eines Versuchstiers dürfte mit wandnahen Bewegungsmustern (Thigmotaxis) bzw. Immobilität einhergehen. Anxiolytisch wirksame Substanzen hingegen führen zu entgegengesetztem Verhalten (Prut und Belzung, 2003). Als OF-Testapparat wurde eine oben offene Box mit einer quadratischen Grundfläche, einer Seitenlänge von 51cm und 40cm hohen Wänden an allen vier Seiten verwendet. Grundfläche und Seitenwände bestehen aus schwarzem Plexiglas. Zu Beginn jedes 30 minütigen Testdurchlaufs wurde das Versuchstier an einer Wand zum Feldmittelpunkt ausgerichtet platziert und die Testung unmittelbar hierauf gestartet. Während des gesamten Versuchszeitraumes wurden horizontale Bewegungen des Versuchstiers mittels des VideoMot 2-Systems aufgezeichnet und anhand der dem System übergebenen definierten Areale

(peripherer wandnaher Bereich, zentraler Bereich) analysiert. Dabei dürften Eintritte in den zentralen Bereich, Eintritte in den peripheren Bereich und Gesamtstrecke positiv mit der lokomotorischen Aktivität des Versuchstiers korrelieren (Carola et al., 2002). Längerer Aufenthalt im zentralen Bereich, größeres Verhältnis von zentraler zu gesamter lokomotorischer Aktivität sowie eine kürzere Eintrittslatenz in den zentralen Bereich sind hingegen als Indikatoren verminderter Ängstlichkeit zu sehen (Prut und Belzung, 2003). Am Ende des Versuchszeitraumes wurden, nach Rücktransport des Versuchstieres in den entsprechenden Heimatkäfig, Faeces- und Urinmengen (als Indikatoren für Ängstlichkeit (Carola et al., 2002)) dokumentiert und die Oberfläche des OF mit Terralin gereinigt. Zum Versuchszeitpunkt waren die Versuchstiere 12 bis 13 Wochen alt. Die Versuche wurden an aufeinanderfolgenden Tagen jeweils zwischen 10 Uhr und 16 Uhr durchgeführt.

### **2.3.5 Barnes Maze**

Das Barnes Maze (BM; nach Barnes, 1979) ist ein Testapparat zur Evaluierung von räumlichem Lernen und Gedächtnis (Arbeits- und Referenzgedächtnis, Kurz- und Langzeitgedächtnis) von Versuchstieren (Fox et al., 1998; Harrison et al., 2006; Rosenfeld und Ferguson, 2014). Hippocampale Funktionalität scheint für das Abschneiden der Versuchstiere in diesem Testverfahren entscheidend zu sein (Paylor et al., 2001; Raber et al., 2004). Als BM wurde eine runde auf 100cm hohen Beinen stehende Plattform (Diameter 120cm) verwendet, welche, in jeweils 5cm Abstand vom Rand, mit 40 Löchern (Diameter 5cm) versehen ist. Unter jedem Loch kann eine kleine Box („Escape-Box“) als Zufluchtsort für das getestete Tier angebracht werden. Ihrer Natur entsprechend, ist von einem Bestreben der Versuchstiere auszugehen, möglichst rasch von der offenen, hell erleuchteten Oberfläche des BM, auf welche sie zu Beginn jedes Versuchsdurchlaufs gesetzt werden, in diese Box zu gelangen. Ein visueller Hinweis außerhalb des BM nahe der Box, wie auch hier eingesetzt, scheint den Tieren die Entwicklung von Lernstrategien und so das Finden der Box zu erleichtern (Harrison et al., 2006). Ängstlichkeit und Aktivitätsniveau der Versuchstiere können die Interpretation der Versuchsergebnisse erschweren. Außerdem ist zu beachten, dass serielle Suchstrategien, d.h. Suche der Box durch sequentielles Prüfen aller Löcher und nicht auf räumlichem Gedächtnis basierend, und direktes, tatsächlich auf räumlichem Gedächtnis beruhendes Ansteuern des „richtigen“, mit Box versehenen Loches, zeitlich aufgrund der hohen Bewegungsgeschwindigkeit der Tiere eventuell schwer differenzierbar sein könnten. (Harrison et al., 2006) In mehreren Versuchsdurchgängen (pro Tier vier an Tag eins und vier, sowie drei an Tag zwei, drei und fünf) wurde dementsprechend neben der Zeitdauer bis zum Eintritt

des Versuchstiers in die Escape-Box auch die hierfür zurückgelegte Strecke sowie die Geschwindigkeit des Tiers erhoben. Dabei wurde die Position der Box, nicht jedoch die Position des visuellen Stimulus nach dem dritten Versuchstag verändert. Die Positionen der Boxen bzw. des Stimulus vor bzw. nach dem Wechsel waren für alle Versuchstiere gleich. Am Ende des Versuchsdurchgangs wurden die 16 bis 20 Wochen alten Tiere, falls nicht bereits in dieser befindlich, zur Box geführt, in derselben in ihren Heimatkäfig transferiert und das BM mit Terralin gereinigt.

### **2.3.6 Gewichtsverlauf**

Um den Gewichtsverlauf der Versuchstiere und etwaige Unterschiede zwischen den Gruppen diesbezüglich feststellen zu können, wurden die Tiere im Alter von zehn, 14 und 19 Wochen gewogen. Um die Störung der Tiere möglichst gering zu halten, wurden diese Erhebungen im Rahmen der routinemäßigen Käfigwechsel durchgeführt.

## 2.4 Genexpressionsanalyse

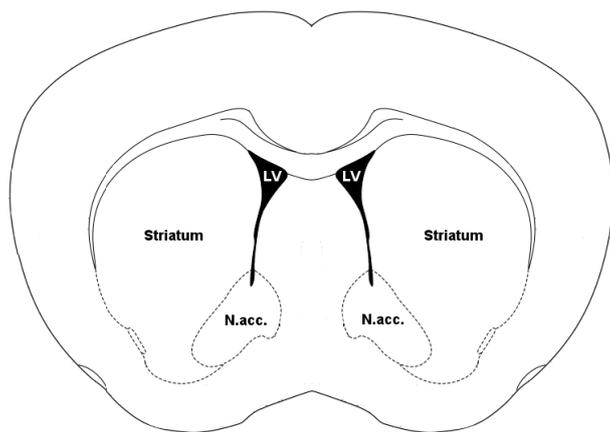
Um die Auswirkungen der unterschiedlichen Haltungsbedingungen auf die Expression der untersuchten Gene feststellen zu können, wurden 31 der männlichen Versuchstiere im Alter von vier Wochen zunächst, nach Sedierung mit Isofluran und Dekapitation, die Gehirne entnommen, auf Korkplättchen platziert und mit Isopentan schockgefroren. Die gefrorenen Gehirne wurde hierauf in Alufolie verpackt und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. In weiterer Folge wurden die zu untersuchenden Regionen aus den gefrorenen Gehirnen herauspräpariert. Aus den gewonnenen Proben wurde im nächsten Schritt die RNA extrahiert und hieraus sodann cDNA synthetisiert. Um Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, wurden weiterhin einige Kontroll-„Polymerase Chain Reactions“ (PCRs) durchgeführt. Um die Integrität der extrahierten RNA zu kontrollieren, wurden außerdem alle RNA-Proben einer Evaluierung durch das „Experion™ Automated Electrophoresis System“ zugeführt. Abschließend wurden die Expressionsraten der untersuchten Gene mittels „Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction“ (RT-qPCR) quantifiziert. Vorgehen und Nomenklatur wurden entsprechend den MIQE („Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments“)-Richtlinien gewählt (Bustin et al., 2009). Im Folgenden werden die genannten Schritte näher erläutert.

### 2.4.1 Sektion der Gehirne

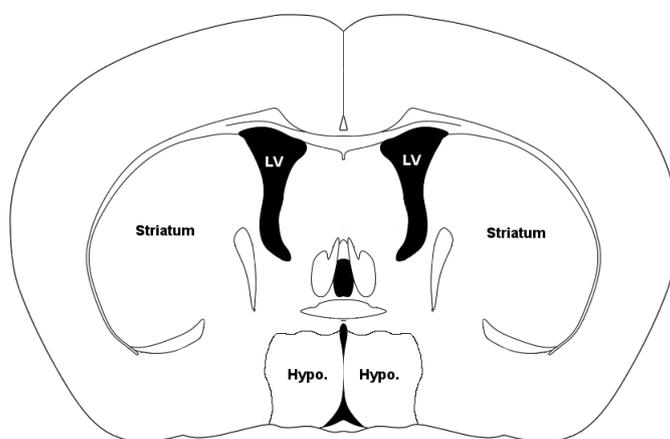
Aus den gefrorenen Gehirnen wurden unter Zuhilfenahme eines Mikroskops auf einer auf  $-5^{\circ}\text{C}$  gekühlten Platte folgende Regionen herauspräpariert: Frontalcortex, Striatum (bestehend aus Nucleus caudatus und Putamen), Nucleus accumbens, Hippocampus, Amygdala, dorsale Nuclei raphes und Hypothalamus. Hierfür wurden zunächst mittels Skalpell folgende coronale Schnitte der Gehirne durchgeführt (Angaben als Distanz von einer coronalen Ebene durch das Bregma<sup>1</sup> in mm, nach Paxinos G und Franklin K, 2001): 3.56, 1.98, 0.74, -0.10, -1.58, -2.54, -3.52, -4.48 (zur Erläuterung siehe Abbildungen 3 und 4). Anschließend wurden aus den erhaltenen Teilen o.g. Regionen entsprechend Abbildungen 3 und 4 mit einem chirurgischen Löffel herauspräpariert und in 1.5ml Eppendorf Tubes, welche bei  $-70^{\circ}\text{C}$  vorgekühlt worden waren, transferiert.

---

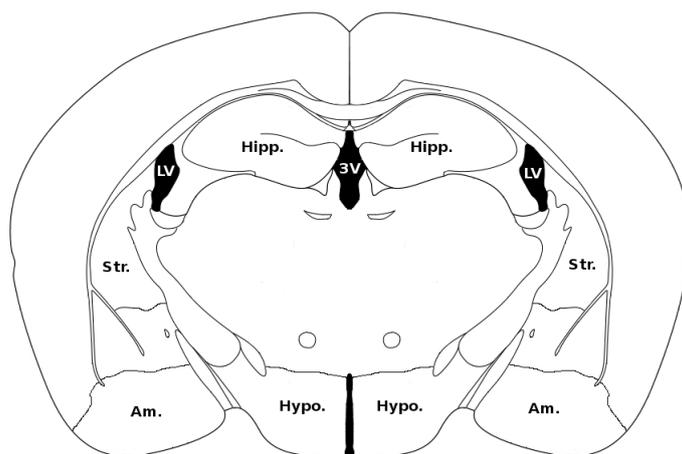
<sup>1</sup>Schnittpunkt von Kranz- und Pfeilnaht



(a) 0,74mm

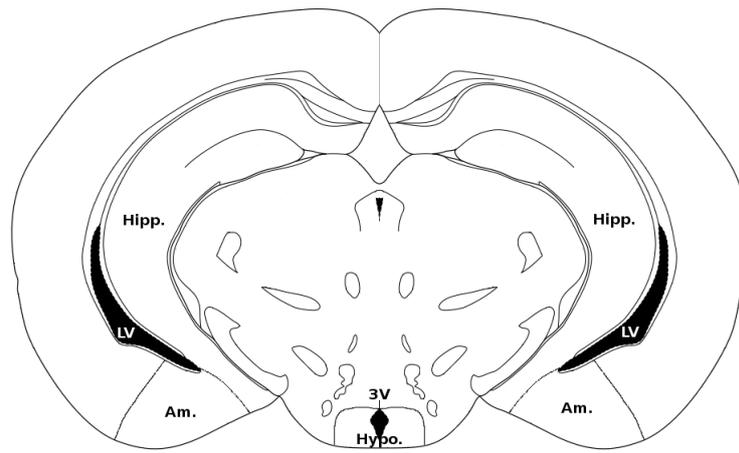


(b) -0,10mm

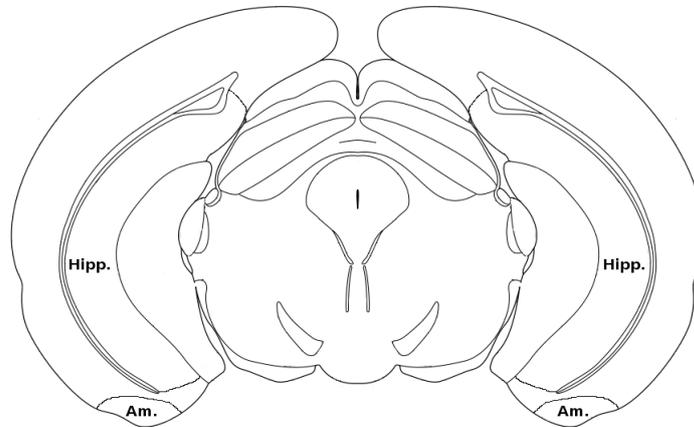


(c) -1,58mm

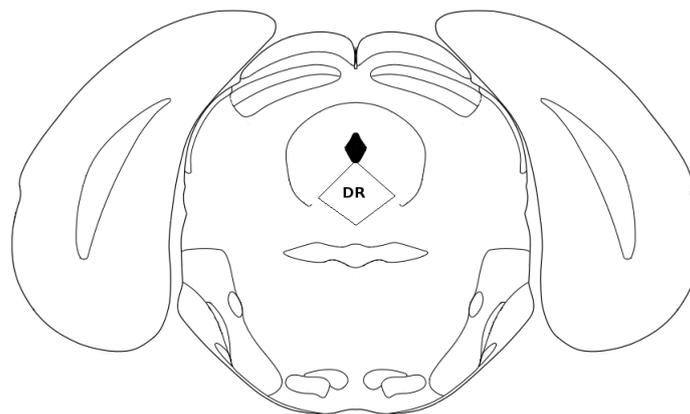
Abbildung 3: Schemata der angefertigten Schnitte mit untersuchten Regionen. Fortsetzung in Abbildung 4. Modifiziert nach: Paxinos G, Franklin K, The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press 2001.



(a) -2,54mm



(b) -3,52mm



(c) -4,48mm

Abbildung 4: Schemata der angefertigten Schnitte mit untersuchten Regionen (Fortsetzung), Ansichten von hinten, 3V = dritter Ventrikel, Am. = Amygdala, DR = Dorsale Raphe, Hipp. = Hippocampus, Hypo. = Hypothalamus, LV = linker Ventrikel, N.acc. = Nucleus accumbens, Str. = Striatum. Modifiziert nach: Paxinos G, Franklin K, The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press 2001.

### 2.4.2 RNA-Extraktion

Zur Extraktion der RNA wurden die gewonnenen Gewebeproben zunächst in vorgekühlte 2ml Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Tubes<sup>2</sup> überführt sowie 500 µl PegGold RNA und – zum Zwecke der Homogenisierung – eine kleine Metallkugel dazugegeben. Die so präparierten Tubes wurden hierauf im TissueLyser bei 20Hz für drei Minuten homogenisiert und dann für fünf Minuten bei 21°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden in jedes Tube 100µl Chloroform hinzugegeben und die Tubes für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Hierauf wurde die Lösung nach Durchmischen in ein „MaXtract“-Tube transferiert und bei 4°C und 12000 Rotationen pro Minute für fünf Minuten zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der erhaltene Überstand in ein neues Tube überführt, 250µl 70% Ethanol in DEPC-H<sub>2</sub>O hinzugefügt, die Lösung in eine mini-spin Säule („RNeasy MiniKit“) gegeben und bei 21°C und 12000 Rotationen pro Minute für 30 Sekunden zentrifugiert. Hierauf wurden 350µl RW1-Puffer („RNeasy MiniKit“) hinzugegeben und die vorherige Zentrifugation wiederholt. Danach wurden 80µl DNase 1Mix, bestehend aus 10µl DNase 1 und 70µl RDD („Ribonuklease (RNase)-Free DNase Set“), auf die Membran der mini-spin Säule gegeben und für 15 Minuten inkubiert. Hierauf wurden wiederum 350µl RW1-Puffer („RNeasy MiniKit“) hinzugegeben und die Säule bei 21°C und 12000 Rotationen pro Minute für 30 Sekunden zentrifugiert. Dann wurden zweimalig 500µl RPE-Puffer („RNeasy MiniKit“) zugegeben und für 30 Sekunden bzw. zwei Minuten zentrifugiert (21°C, 12000 Rotationen pro Minute). Sodann erfolgte die Trocken zentrifugation der Säule, welche hierauf in ein frisches DEPC-Tube platziert wurde. Abschließend wurden 60µl RNase freies Wasser („RNeasy MiniKit“) auf die Membran der Säule gegeben und – nach einminütiger Wartezeit – eine letzte einminütige Zentrifugation (21°C, 12000 Rotationen pro Minute) durchgeführt. Die so erhaltenen RNA-Samples wurden unmittelbar hierauf auf Eis gelagert, die enthaltene RNA (bzw. 1µl hiervon, nach vorheriger Reinigung des Systems mit 1,5µl RNase freiem Wasser) mit einem „Nanodrop 1000 Spectrometer“ quantifiziert (Konzentration der RNA in ng/µl) und hinsichtlich einer Verunreinigung mit u.a. Phenolen, Phenolaten und Thiocyanaten – nicht jedoch ihrer Integrität – qualifiziert und bei -70°C eingelagert. Ausschließlich RNA-Samples mit ausreichender RNA-Konzentration ( $\geq 34$  ng/µl), einem Verhältnis der Absorbtionen bei 260nm und 280nm (260/280-Ratio) größer 1.9 sowie einem Verhältnis der Absorbtionen bei 260nm und 230nm (260/230-Ratio) von größer 1.6 wurden für die weiteren Schritte verwendet (Gallagher und Desjardins, 2006; Tataurov et al., 2008).

---

<sup>2</sup>Diethylpyrocarbonat wird wegen seiner RNase-inaktivierenden Eigenschaften eingesetzt

### 2.4.3 cDNA-Synthese

Für die spätere Quantifizierung der Expressionsraten der untersuchten Gene muss zunächst die aus den Gewebeproben extrahierte RNA, d.h. hauptsächlich die codierende einzelsträngige „messenger RNA“ (mRNA), durch das Enzym „Reverse Transkriptase“ (RT) in stabile komplementäre („complementary“) DNA (cDNA) übersetzt werden. Für diesen Prozess müssen – als Bausteine der cDNA – Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und, um den Beginn des Übersetzungsvorganges überhaupt erst zu ermöglichen, an mRNA bindende Primer bereitgestellt werden. Das „iScript™cDNA Synthesis Kit“ diente als Quelle von RT, Nukleotiden und Primern. Als Einsatz für die cDNA-Synthese wurden 500ng RNA festgelegt, jedoch, um für spätere Schritte ausreichende Mengen cDNA zur Verfügung zu haben, ein doppelter Ansatz gewählt. Die mittels „Nanodrop Spectrometer“ erhobenen RNA-Konzentrationen dienten für die Berechnung des hierfür erforderlichen RNA Volumens als Grundlage. Dieses Volumen wurde zunächst – nach schonendem Auftauen der RNA-Samples auf Eis – in PCR Tubes pipettiert und mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 30µl aufgefüllt. Hierauf erfolgte die Zugabe von 10µl eines anfangs vorbereiteten Mastermix, bestehend aus (einem Vielfachen von) 8µl „5x ReactionMix“ und 2µl RT (beides aus „iScript™cDNA Synthesis Kit“), auf ein Gesamtvolumen von 40µl. Zur Qualitätskontrolle wurden außerdem ein PCR-Tube ohne RT und ein PCR-Tube ohne RNA präpariert. Hierauf wurden alle vorbereiteten PCR-Tubes in einem Thermocycler folgenden Temperaturzyklen unterworfen: Für fünf Minuten 25°C, für 30 Minuten 42°C, für fünf Minuten 85°C und abschließend bis zur Entnahme 4°C. Bis zum nächsten Arbeitsschritt wurden die PCR-Tubes (cDNA-Samples) daraufhin bei 4°C gelagert.

### 2.4.4 Polymerase Chain Reaction

Die „Polymerase Chain Reaction“ (PCR) wird zur (exponentiellen) Vervielfältigung von DNA eingesetzt um eine Quantifizierung dieser, bzw. spezieller Abschnitte der DNA, zu ermöglichen. Die Grundlage dieser Vervielfältigungsmethode, welche im optimalen Fall zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA führt, ist dabei der wiederholte Ablauf folgender Schritte: Denaturierung der DNA, d.h. Spaltung der Doppelstränge in Einzelstränge durch Zerstörung der verbindenden Wasserstoffbrückenbindungen, Primerhybridisierung („Annealing“), d.h. Anlagerung von Primern an die Einzelstränge, sowie Elongation, d.h. Wiederherstellung des Doppelstrangcharakters durch Anbau der komplementären Nukleotide. Die hierfür notwendigen Komponenten sind also die zu vervielfältigende DNA, dNTPs als Bausteine für die Elongation, eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase),

welche die Synthese von DNA katalysiert und bei hohen Temperaturen nicht denaturiert, zwei Primer, um den zu vervielfältigenden Abschnitt der DNA festzulegen, sowie geeignete Pufferlösungen mit  $Mg^{2+}$ -Ionen, um optimale chemische Bedingungen für die Polymerase zu schaffen. Um eine Verunreinigung der cDNA-Samples mit genomischer DNA auszuschließen, wurden PCRs mit Primern für Introns des 5-Hydroxytryptamintransporter (5-HTT)-Gens sowie mit Primern für das Protein-kinase C gamma (PKC $\gamma$ )-Gen durchgeführt. Zur Herstellung der Samples für diese Kontroll-PCRs wurden zunächst 0,5 $\mu$ l cDNA in ein PCR-Tube pipettiert und 24,5 $\mu$ l eines vorher präparierten Mastermix dazugegeben (Gesamtvolumen von 25 $\mu$ l). Dieser Mastermix setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 2,4 $\mu$ l eines 10mM  $MgCl_2$ -Puffer, 1 $\mu$ l 2,5mM dNTPs, 1 $\mu$ l Exon (10pmol/ $\mu$ l), 1 $\mu$ l Intron (10pmol/ $\mu$ l), 1 $\mu$ l Neo (10pmol/ $\mu$ l), 17,8 $\mu$ l  $H_2O$  sowie abschließend 0,2 $\mu$ l Taq-Polymerase (5U/ $\mu$ l). Die so erstellten PCR-Samples wurden dann in einem Thermocycler folgenden Bedingungen unterworfen: Für fünf Minuten 95°C, dann in 35facher Wiederholung für 45 Sekunden 95°C (Denaturierung), für 45 Sekunden 65,1°C (Annealing) und für 45 Sekunden 72°C (Elongation); hierauf für drei Minuten 72°C und abschließend bis zur Entnahme 10°C. Bis zum nächsten Schritt wurden die PCR-Samples dann bei 4°C gelagert. Für die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Samples wurde zunächst ein Agarose-Gel vorbereitet. Hierfür wurden 3g Agarose in 100ml TAE-Puffer auf ca. 100°C erhitzt und dann – nach Abkühlen – 3 $\mu$ l Ethidiumbromid hinzugefügt, durchmischt und ausgegossen. Sodann wurden 10 $\mu$ l einer 100bp Leiter in die erste der angelegten Vertiefungen des Agarose-Gels pipettiert, 5 $\mu$ l Bromphenolblau (Farbstoffmarker) zu den PCR-Samples gegeben und 20 $\mu$ l dieser Mischung in die weiteren angelegten Vertiefungen des Agarose-Gels pipettiert. Außerdem wurden, um auch die Qualität der eingesetzten Nukleotide/Primer/Polymerase festzustellen, pro Gel pipettiert: Ein Sample ohne Polymerase, ein Sample ohne cDNA, ein Sample ohne Nukleotide und – als Positivkontrolle – ein Sample mit 5-HTT-DNA anstelle von cDNA. Hierauf wurde die Elektrophorese (40 Minuten, 120V) gestartet und in direkter Folge die Analyse des Gels mittels UV-Licht im ChemiDoc-System vorgenommen. Auf diese Weise wurden 25 cDNA-Samples mit Primern für Introns des 5-HTT-Gens analysiert. Acht dieser 25 cDNA-Samples wurden zusätzlich mit Primern für das PKC $\gamma$ -Gen analysiert.

#### **2.4.5 Evaluierung der RNA-Integrität**

Um in der abschließend durchzuführenden RT-qPCR verlässliche Ergebnisse zu erhalten sowie Zeit- und Materialkonsum auf ein Minimum zu beschränken, ist eine vorherige Evaluierung der Integrität der – wie unter 2.4.2 beschrieben – extrahierten

RNA unerlässlich (Fleige und Pfaffl, 2006). Schließlich ist die Integrität durch potentiell vorliegende, Phosphodiesterbindungen spaltende Ribonukleasen (RNasen), fehlerhaftes Handling und suboptimale Lagerungsbedingungen ununterbrochen gefährdet (Schoor et al., 2003). Grundsätzlich kann die RNA-Integrität durch das Verhältnis von 28S- und 18S-Untereinheit (28S:18S-Ratio) der ribosomalen RNA (rRNA) geprüft werden (Imbeaud et al., 2005). Dies kann prinzipiell durch Anwendung der Agarose-Gel-Elektrophorese erfolgen, was jedoch visuelle, stark erfahrungsabhängige Beurteilung und Vergleich der entsprechenden Banden, einen relativ hohen RNA-Einsatz sowie die Verwendung des als toxisch anzusehenden Ethidiumbromids erfordert. Um diese Problematik zu umgehen, wurden diverse lab-on-chip Systeme entwickelt, welche elektrophoretische Auftrennung und Detektion der RNA auf entsprechenden Microchips und Berechnung der RNA-Integrität automatisiert durchführen (Imbeaud et al., 2005). Ein solches System, das „Experion™ Automated Electrophoresis System“, bestehend aus einer „Automated electrophoresis station“, einer „Priming station“, einer „Vortex station“, Analysesoftware und Analysekit (bestehend aus Microchips, RNA-Gel, RNA-Leiter, Fluoreszenzfarbstoff, „Loading buffer“, Spin-Filter), wurde zur Evaluierung der Integrität aller RNA-Proben herangezogen (Denisov et al., 2008). Dabei wurden den Herstellervorgaben entsprechend zunächst alle Bestandteile des Analysekits (abgesehen von der RNA-Leiter) für 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Sodann wurden 600µl des RNA-Gels in einen Spin-Filter gegeben und bei Raumtemperatur und 4000 Rotationen pro Minute für 10 Minuten zentrifugiert. Für einen Chip wurden hierauf 65µl des Gels in ein RNase-freies Tube gegeben, 1µl RNA-Fluoreszenzfarbstoff hinzugefügt und mittels der „Vortex station“ vermischt (Gel-Stain-Solution). Dann wurden 2µl von RNA-Leiter und RNA-Samples in RNase-freie Tubes überführt und bei 70°C für 2 Minuten im „Eppendorf Thermomixer® comfort“ denaturiert. Unmittelbar danach wurden die Tubes für 5 Minuten auf Eis inkubiert, kurz zentrifugiert, vermischt und bis zur weiteren Verarbeitung wieder auf Eis gelagert. Hierauf wurden 9µl der Gel-Stain-Solution in das entsprechende Well des Chips pipettiert, dieser auf die „Priming station“ gegeben und der Priming-Vorgang gestartet. Daraufhin wurden wiederum 9µl der Gel-Stain-Solution, 9µl des gefilterten Gels, 1µl der denaturierten RNA-Leiter sowie jeweils 1µl der denaturierten RNA-Samples (bzw. 1µl DEPC-behandeltes Wasser) in die hierfür vorgesehenen Wells des Chips pipettiert und 5µl des „Loading buffer“ in jedes Sample-Well sowie das Leiter-Well hinzugegeben. Der so präparierte Chip wurde hierauf auf die „Vortex station“ gesetzt und ein einminütiger Vortex-Vorgang gestartet. Unmittelbar darauf wurde der Chip in die „Electrophoresis station“ überführt und der Analysevorgang über die Analyse-

software initiiert. Parallel hierzu wurden zur internen Kontrolle einige der RNA-Samples zusätzlich mittels klassischer Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und analysiert. Nach jedem Analysevorgang erfolgte eine Reinigung der „Electrophoresis station“ mittels hierfür vorgesehenem, mit 800µl DEPC-H<sub>2</sub>O gefülltem Reinigungs-chip. Da die 28S:18S-Ratio nur unzureichend die tatsächliche Integrität der RNA widerzuspiegeln scheint (Auer et al., 2003), verwendet die Analysesoftware des „Experion™ Automated Electrophoresis System“ zur Qualifizierung der RNA-Samples einen Algorithmus, welcher neben der 28S- und 18S- eine weitere Region (prä-18S) zur Berechnung des „RNA quality indicators“ (RQI) heranzieht und so eine exaktere Evaluierung der RNA-Integrität ermöglicht (Denisov et al., 2008). Der RQI kann dabei Werte zwischen eins und 10 annehmen, wobei ein RQI größer sieben auf eine hohe Integrität der RNA hinweist.

#### **2.4.6 Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction**

Zur abschließenden Quantifizierung der Expressionsraten der untersuchten Gene wurde die RT-qPCR eingesetzt. Dieses hier in zwei Schritten (erster Schritt: cDNA-Synthese, siehe 2.4.3) durchgeführte Verfahren ermöglicht zeitlich aufeinander abgestimmt die automatisierte Amplifikation und Quantifizierung mittels Fluoreszenzmessung. Auf die grundsätzlichen unter 2.4.4 beschriebenen Arbeitsschritte Denaturierung, Annealing und Elongation folgt also pro Zyklus die unmittelbare Quantifizierung der cDNA. Die so erhobenen Werte können für jedes cDNA-Sample dann graphisch als Kurve dargestellt werden. Diese Kurve spiegelt in ihrem Verlauf folgende Phasen der RT-qPCR wider: Eine exponentielle Phase, welche die exponentielle Vervielfältigung der cDNA bei einem Überangebot der notwendigen Reagenzien wiedergibt, eine lineare Phase (nurmehr lineare Vervielfältigung bei zunehmender Knappheit der Reagenzien) sowie eine Plateauphase, welche den nun entstandenen Mangel an Reagenzien zum Ausdruck bringt (Yuan et al., 2006; siehe Abbildung 5). Um die Expressionsraten der untersuchten Gene in den verschiedenen cDNA-Samples (bzw. Gehirnregionen) miteinander vergleichen zu können, muss in den cDNA-Samples zunächst verständlicherweise die gleiche Ausgangsmenge an cDNA vorhanden sein, was durch den festgelgten Einsatz von 500ng RNA für die cDNA-Synthese gewährleistet ist (siehe 2.4.3). Um nun Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der entsprechenden mRNA ziehen zu können, wird pro cDNA-Sample die Anzahl der PCR-Zyklen ermittelt, nach der ein definiertes Fluoreszenzniveau erreicht ist (C<sub>q</sub>-Wert). Je geringer diese Anzahl, umso höher ist die Ausgangsmenge der mRNA und umgekehrt (Pfaffl, 2004). Die statistische Auswertung so erhaltener Absolutwerte würde nun den Nachteil einer hohen Abhängigkeit dieser Werte

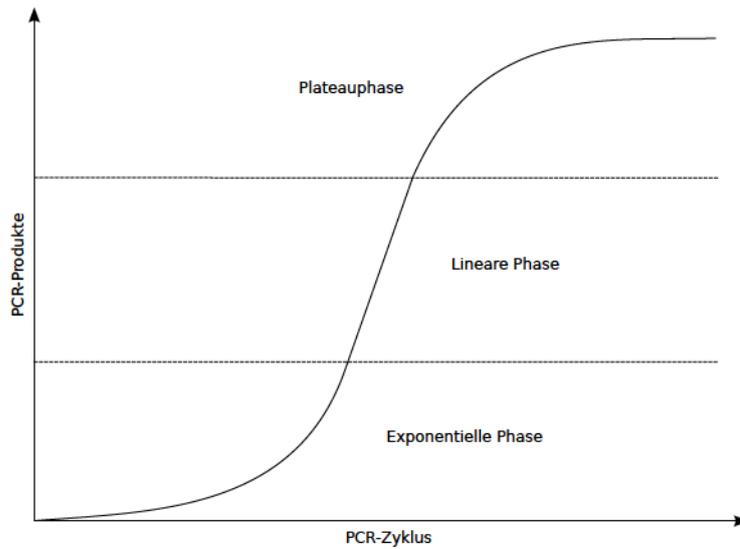


Abbildung 5: Phasen einer RT-qPCR. Modifiziert nach Yuan et al., 2006.

von RNA-Extraktionseffizienzen und Fehlern bei der cDNA-Synthese mit sich bringen. Aus diesem Grunde werden die  $C_q$ -Werte im Sinne einer Normalisierung auf  $C_q$ -Werte sogenannter Referenzgene, d.h. ubiquitär vorhandener und durch die Behandlung/Intervention nicht beeinflusster Gene, bezogen. Die zum Referenzgen normalisierte relative Quantität (NRQ), welche den relativen Expressionsunterschied zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe zum Ausdruck bringt, kann prinzipiell folgendermaßen berechnet werden ( $\Delta\Delta C_q$ -Methode; Livak und Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2004):

$$\Delta C_q = C_{qZielgen} - C_{qReferenzgen}$$

$$\Delta\Delta C_q = \Delta C_{qBehandlung} - \Delta C_{qKontrolle}$$

$$NRQ = 2^{-\Delta\Delta C_q}$$

Allerdings weist diese Methode einige Schwächen auf. Zum einen wird von einer gleichen, hundertprozentigen Effizienz während der linearen Phase von Ziel- und Referenzgen ausgegangen. Da eine hundertprozentige PCR-Effizienz, d.h. eine exakte Verdoppelung der DNA-Menge pro Zyklus, in der Realität sehr selten erreicht werden dürfte und nicht von einer exakt gleichen Effizienz von Ziel- und Referenzgen ausgegangen werden kann, müssten die Amplifizierungs-Effizienzen (E) vorher ermittelt werden und in die Berechnung der NRQ eingehen. Dieses Problem konnte durch die Entwicklung des „Effizienz-korrigierten relativen Quantifizierungsmodells“ gelöst werden (Pfaffl, 2001;  $E$  = Effizienz):

$$NRQ = \frac{(E_{Zielgen})^{\Delta Cq_{Zielgen}(Kontrolle \text{ } Behandlung)}}{(E_{Referenzgen})^{\Delta Cq_{Referenzgen}(Kontrolle \text{ } Behandlung)}}$$

Auch diese Methode weist jedoch Schwächen auf. Zum einen sieht das Effizienz-korrigierte relative Quantifizierungsmodell lediglich ein Referenzgen zur Berechnung des relativen Expressionsunterschiedes vor. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Verwendung nur eines Referenzgens eine fehlerhafte Normalisierung begünstigt (Vandesompele et al., 2002). Zum anderen bietet dieses Modell keine Möglichkeit unvermeidbare technische Variationen zwischen verschiedenen RT-qPCR-Läufen mit Hilfe (optimalerweise mehrerer) sogenannter Inter-Run-Calibratoren (IRCs), d.h. vorher zu bestimmender cDNA-Samples, welche in allen RT-qPCR-Läufen analysiert werden, rechnerisch auszugleichen.

Um sowohl mehrere Referenzgene als auch mehrere IRCs miteinbeziehen zu können, wurde die von Hellemans et al. (2007) entwickelte Methode zur Berechnung der NRQ herangezogen. Hierbei werden die Cq-Werte mit Hilfe folgender Formel in NRQs transformiert (n = Anzahl der Referenzgene r):

$$NRQ = \frac{E_{Zielgen}^{\Delta Cq_{Zielgen}(Kontrolle \text{ } Behandlung)}}{\sqrt[n]{\prod_{r=1}^n E_{Referenzgen \ r}^{\Delta Cq_{Referenzgen \ r}(Kontrolle \text{ } Behandlung)}}$$

Die NRQs können dann mittels Division durch einen aus den NRQs der IRCs errechneten Calibrierungsfaktor (CF) in CNRQs transformiert werden:

$$CNRQ = \frac{NRQ}{CF}$$

Um mehrere Referenzgene sowie deren Amplifizierungs-Effizienzen in die Berechnungen miteinbeziehen zu können, wurden zunächst die Effizienzen und hierauf die drei – unter den gegebenen Bedingungen – in ihrer Expression stabilsten einer im Labor etablierten Reihe möglicher Referenzgene bzw. Primer für diese Gene ermittelt. Die Effizienzen/Stabilitäten von Primern/Genen, welche folgende Proteine/Enzyme kodieren und auf Grund ihres ubiquitären Vorkommens als Referenzgene dienen können, wurden erhoben: Transferrinrezeptorprotein 1 (TFRC), Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT), Succinat-Dehydrogenase Untereinheit A (SDHA), TATA-bindendes Protein (TBP), 14-3-3 Protein zeta/delta (YWHAZ), Actin beta (ACTB), Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA), Phosphoglyceratkinase 1 (PGK1), Hydroxymethylbilan-Synthase (HMBS). Zu diesem Zweck wurden RT-qPCRs mit den Primern der Referenzgene (jeweils 15 zufällig ausgewählte cDNA-

Samples in je zwei Replikaten) im „CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System“ durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 1µl cDNA, sowie 9µl eines zuvor präparierten Mastermix (bestehend aus 1µl Primer, 3µl H<sub>2</sub>O und 5µl SYBR®-Green<sup>3</sup>) in die Wells von „CFX Qualification Plates“ (384 Wells) pipettiert. Außerdem wurden – zum Ausschluss von Kontamination – pro Gen ein Well mit H<sub>2</sub>O an Stelle von cDNA („No template control“, NTC) sowie ein Well mit einem cDNA-Sample ohne RT („No reverse transcriptase“, NRT, siehe 2.4.3) befüllt. Der Ablauf einer RT-qPCR gestaltete sich dabei – den Empfehlung des Primer-Herstellers entsprechend – wie folgt: Zunächst für fünf Minuten 95°C, dann in 39-facher Wiederholung 95°C für 10 Sekunden und 60°C für 30 Sekunden, hierauf für 10 Sekunden 95°C und abschließend zur Schmelzkurvenberechnung eine kontinuierliche Temperaturerhöhung (plus 0.5°C pro fünf Sekunden) von 65°C auf 95°C. Replikate mit einer Standardabweichung der C<sub>q</sub>-Werte von mehr als 0.35 wurden auf einer weiteren Platte erneut analysiert, bzw. bei Weiterbestehen dieses Kriteriums von den weiteren Schritten ausgeschlossen. Sodann erfolgte auf Basis der erhaltenen Rohdaten die Berechnung der Effizienzen mit Hilfe des Programms „LinRegPCR“ (Ramakers et al., 2003). Der diesem zugrunde liegende Algorithmus ermittelt zunächst das Fluoreszenzniveau, welches vor der Detektion einer spezifischen Amplifikation besteht (Baseline), und korrigiert die Rohdaten dementsprechend, um ein Über- oder Unterschätzen der Effizienzen zu vermeiden. Sodann wird, nach logarithmischer Transformation der Daten pro Sample, das „Window of Linearity“ (WoL) innerhalb der linearen Phase der RT-qPCR ermittelt. Dieses Fenster wird so gewählt, dass die Varianz der Amplifikationseffizienzen an vier enthaltenen Datenpunkten möglichst gering ist. Aus der Steigung einer durch diese Punkte verlaufenden Geraden wird dann die Effizienz für das aktuelle Sample und aus den Mittelwerten aller Replikate/Samples die Effizienz einer PCR mit dem jeweiligen Primer errechnet. (Ruijter et al., 2009) Die Stabilitäten der Referenzgene (Stabilitätsparameter M) wurden hierauf – unter Angabe der Effizienzen – aus den erhaltenen C<sub>q</sub>-Werten mit der Software „qBase+“ ermittelt (Hellemans et al., 2007).

Für die eigentliche Genexpressionsanalyse wurden schließlich alle hierfür ausgewählten cDNA-Samples RT-qPCRs (Ablauf wie im vorigen Absatz beschrieben) durchgeführt. Dabei wurden pro „CFX Qualification Plate“ zusätzlich zu den zu analysierenden cDNA-Samples vier IRCs (in je zwei Replikaten) sowie zwei NTCs pipettiert (jeweils 1µl cDNA bzw. H<sub>2</sub>O, 1µl Primer, 3µl H<sub>2</sub>O und 5µl SYBR®-Green). Das Pipettieren wurde hierbei teilweise von einem automatisierten Pipettiersystem („ep-

---

<sup>3</sup>„iQ™ SYBR ® Green supermix“, bestehend aus DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, SYBR ® Green I-Fluoreszenzfarbstoff

Motion 5075“), welchem ein Mastermix übergeben wurde, durchgeführt. Die oben beschriebene Regel zu Ausschluss/Wiederholung von Replikaten wurde auch hier angewendet. Nach Berechnung der Effizienzen auch der Zielgene mit Hilfe des Programms „LinRegPCR“ (s.o.) wurden – mit Hilfe des auf der oben beschriebenen Methode nach Hellemans et al. (2007) basierenden R-Pakets „EasyqpcR“ (Le Pape) – die erhaltenen C<sub>q</sub>-Werte unter Einbeziehung von errechneten Effizienzen und IRCs in CNRQs transformiert.

## 2.5 Statistik

Die statistische Analyse der mittels Verhaltenstests und RT-qPCR gewonnenen Daten wurde mit der Statistik-Programmiersprache R durchgeführt. Die Datensätze wurden dabei zunächst auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) und Varianzhomogenität (Levene-Test) getestet. Die mittels Verhaltenstests gewonnenen Daten wurden – je nach Ergebnis dieser Testungen – einer mehrfaktoriellen Varianzanalyse („Analysis of variance“, ANOVA) mit den Faktoren Geschlecht und Haltungsveringung (=Gruppe) bzw. robusteren Testverfahren nach Wilcox (2012) zugeführt. Für die Post-hoc-Analyse dieser Daten wurden der Tukey-Test und – bei Abweichung von der Normalverteilung – robuste Post-hoc Tests nach Wilcox eingesetzt. Im Falle der mittels RT-qPCR gewonnenen Daten wurde eine einfaktorische Varianzanalyse bzw. im Falle von Heteroskedastizität oder Abweichungen von der Normalverteilung eine robustere Testmethode nach Wilcox durchgeführt. Für die Post-hoc-Analyse der RT-qPCR-Daten wurde der Tukey-Test eingesetzt, bzw. – bei Abweichung von der Normalverteilung oder ungleichen Stichprobenumfängen – die robusteren Post-hoc Tests nach Wilcox verwendet. Die Ergebnisse der Wilcox-Tests, welche auf Bootstrapping und/oder (20%) gestützten Mitteln und/oder M-Schätzern beruhen und sich bei extremen Abweichungen von der Normalverteilung als robuster gegen Fehler 1. Art erwiesen haben, wurden nur bei deutlichen Abweichungen von den Ergebnissen der ANOVAs bzw. Tukey-Tests und fehlenden Voraussetzungen (Heteroskedastizität, deutliche Abweichung von der Normalverteilung) für diese Tests angegeben. Dabei wurde das größte Gewicht auf die Ergebnisse der auf Bootstrapping beruhenden Methoden gelegt (vermutlich beste Kontrolle des Fehlers 1.Art). Das Signifikanzniveau wurde auf  $p \leq 0.05$  festgelegt. Gerundet wurde auf die dritte Nachkommastelle. Zur Visualisierung der Daten wurden Säulendiagramme/Liniendiagramme aus den Mittelwerten mit Fehlerbalken (entsprechend einem Konfidenzniveau von 95%) erstellt.

## 2.6 Reagenzien

Material	Hersteller
Cd1-Mäuse	Charles River Lab. Int. Inc., Wilmington/USA
Sucrose	AppliChem, Darmstadt
Elevated Plus-Maze	TSE Systems, Bad Homburg
Open Field	TSE Systems, Bad Homburg
Light-Dark box	TSE Systems, Bad Homburg
Barnes Maze	TSE Systems, Bad Homburg
VideoMot 2-System	TSE Systems, Bad Homburg
Terralin liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Isofluran	AppliChem, Darmstadt
Isopentan	AppliChem, Darmstadt
2ml Tubes, 1.5ml Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
peqGOLD RNAPure	peqLab Biotech GmbH, Erlangen
Metallkugeln	Quiagen, Hilden
TissueLyser	Quiagen, Hilden
Chloroform	
MaXtract Tubes	Quiagen, Hilden
RNeasy MiniKit	Quiagen, Hilden
RNase-freies DNase Set	Quiagen, Hilden
Nanodrop 1000 Spectrometer	peqLab Biotech GmbH, Erlangen
iScript™cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories G.m.b.H., München
TGradient Thermal Cycler	Biometra, Göttingen
Taq-polymerase	Eurogentec, Köln
5-HTT- und PKC $\gamma$ -Primer	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
GeneRule 100bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA
Ethidiumbromid	
Bromphenol Blue-Xylene Cyanole Dye	Sigma-Aldrich, Buchs/Schweiz
TAE-Puffer	Tris- Acetat- und EDTA-Puffermix
ChemiDoc™ XRS Molecular Imager	Bio-Rad Laboratories G.m.b.H., München
Experion™ Automated Electrophoresis System	Bio-Rad Laboratories G.m.b.H., München

Material	Hersteller
Experion RNA StdSens Reagents and Supplies	Bio-Rad Laboratories G.m.b.H., München
Experion RNA Analysis Kits	Bio-Rad Laboratories G.m.b.H., München
Eppendorf Thermomixer® comfort	Eppendorf AG, Hamburg
TBP-Primer	Quiagen, Hilden
HMBS-Primer	Quiagen, Hilden
YWHAZ-Primer	Quiagen, Hilden
NPY-Primer	Quiagen, Hilden
NPYR1-Primer	metabion GmbH, Planegg
NPYR2-Primer	Quiagen, Hilden
NPYR5-Primer	Quiagen, Hilden
NPSR1-Primer	Quiagen, Hilden
CRH-Primer	Quiagen, Hilden
CRHR1-Primer	Quiagen, Hilden
CRHR2-Primer	Quiagen, Hilden
CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories G.m.b.H., München
CFX Qualification Plate	Bio-Rad Laboratories G.m.b.H., München
iQ™ SYBR (®) Green supermix	Bio-Rad Laboratories G.m.b.H., München
qbase+	Biogazelle NV, Zwijnaarde/Belgien
epMotion 5075	Eppendorf AG, Hamburg

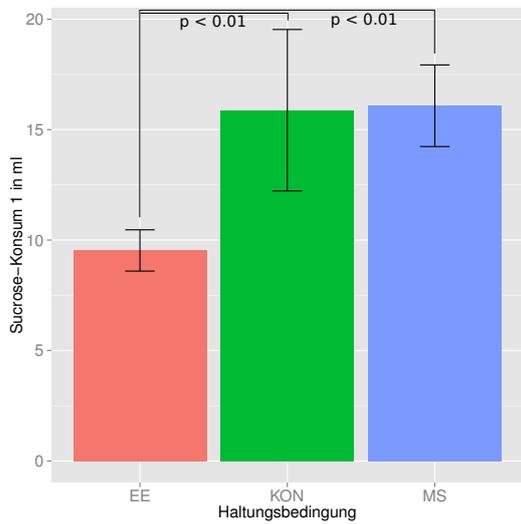
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Phänotypisierung

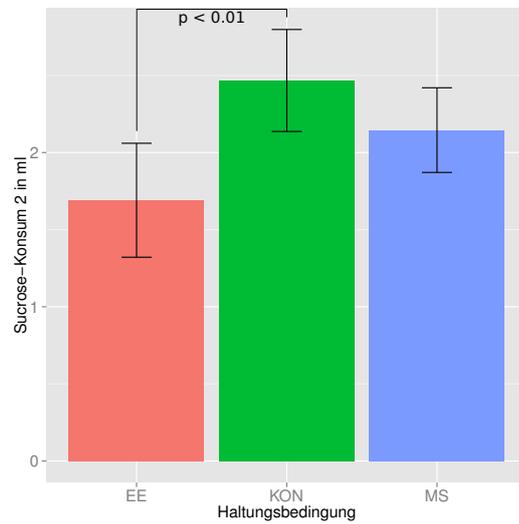
#### 3.1.1 Sucrose-Präferenz

Bei der statistischen Auswertung der Daten des ersten Sucrose-Präferenz-Tests fand sich ein signifikanter Effekt der Haltungsbedingung (Gruppe) ( $F(2, 24) = 10.965$ ,  $p < 0.001$ ), nicht jedoch von Geschlecht ( $F(1, 24) = 0.480$ ,  $p > 0.1$ ) und Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 24) = 0.006$ ,  $p > 0.5$ ) auf den Sucrose-Konsum. Die Post-hoc-Analyse ergab einen signifikanten Unterschied zwischen MS und EE ( $p < 0.01$ ) und zwischen KON und EE ( $p < 0.01$ ). Bezüglich des Wasser-Konsums fand sich lediglich ein grenzwertig signifikanter Effekt des Geschlechts ( $F(1, 24) = 6.060$ ,  $p < 0.05$ ; Wilcox:  $p > 0.1$ ). Ebenso konnte im ersten Sucrose-Präferenz-Test kein signifikanter Effekt von Haltungsbedingung ( $F(2, 24) = 3.161$ ,  $p > 0.05$ ) und Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 24) = 0.178$ ,  $p > 0.5$ ) auf die Sucrose-Präferenz detektiert werden. Allerdings fand sich ein grenzwertig signifikanter Effekt des Geschlechts auf die Sucrose-Präferenz ( $F(1, 24) = 5.693$ ,  $p < 0.05$ ), welcher jedoch bei nicht normalverteilten Daten mit Hilfe der Wilcox-Tests nicht bestätigt werden konnte ( $p > 0.1$ ).

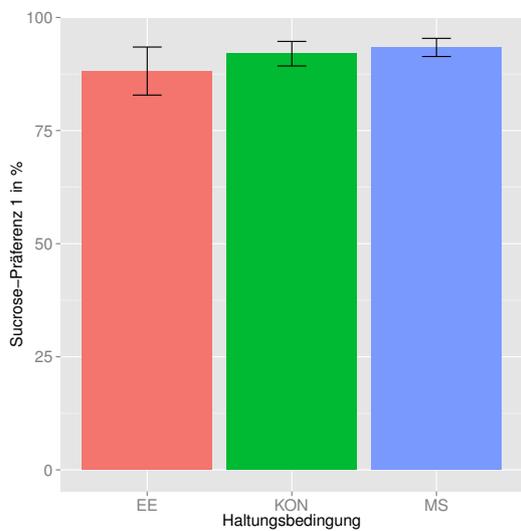
Bei der Auswertung des zweiten Sucrose-Präferenz-Tests wurden die Werte von Sucrose- und Wasser-Konsum eines Käfigs (ausgelaufene Wasserflasche) durch die jeweiligen Mittelwerte der restlichen Werte der entsprechenden Untergruppe (männlich, MS) ersetzt. Es fand sich ebenso wie im ersten Test ein signifikanter Effekt der Haltungsbedingung ( $F(2, 24) = 5.637$ ,  $p < 0.01$ ), nicht jedoch von Geschlecht ( $F(1, 24) = 0.009$ ,  $p > 0.5$ ) und Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 24) = 0.813$ ,  $p > 0.1$ ) auf den Sucrose-Konsum. Post-hoc-Analysen der nicht-normalverteilten Daten mittels Tukey- und Wilcox-Tests ergaben hier widersprüchliche Ergebnisse. Nach logarithmischer Transformation der Daten fand sich ein signifikanter Effekt der Haltungsbedingung ( $F(2, 24) = 7.443$ ,  $p < 0.01$ ) auf den Sucrose-Konsum und in der Post-hoc-Analyse ein signifikanter Unterschied zwischen KON und EE ( $p < 0.01$ ). Bezüglich des Wasser-Konsums fand sich auch hier kein signifikanter Effekt. Allerdings konnte ein signifikanter Effekt der Haltungsbedingung ( $F(2, 24) = 4.152$ ,  $p < 0.05$ ), nicht jedoch von Geschlecht ( $F(1, 24) = 1.588$ ,  $p > 0.1$ ) und Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 24) = 3.089$ ,  $p > 0.05$ ) auf die Sucrose-Präferenz detektiert werden. In der Post-hoc-Analyse fand sich dabei erneut ein signifikanter Unterschied zwischen KON und EE ( $p < 0.05$ ). Siehe Abbildung 6.



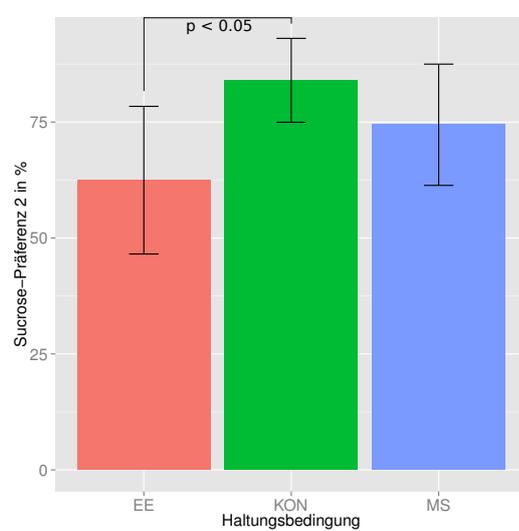
(a)



(b)



(c)



(d)

Abbildung 6: Ergebnisse der Sucrose-Präferenz-Tests. (a) Sucrose-Konsum im ersten Test, (b) Sucrose-Konsum im zweiten Test, (c) Sucrose-Präferenz im ersten Test, (d) Sucrose-Präferenz im zweiten Test.

### 3.1.2 Elevated Plus-Maze

Die statistische Auswertung der mittels Video-Mot 2-System für das EPM erhobenen Daten ergab keinen signifikanten Effekt von Handlungsbedingung (Gruppe) ( $F(2, 54) = 2.175, p > 0.05$ ), Geschlecht ( $F(1, 54) = 1.262, p > 0.1$ ) und Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 54) = 1.608, p > 0.1$ ) auf die von den Versuchstieren insgesamt zurückgelegte Strecke. Auch auf die in den offenen Armen zurückgelegte Strecke hatten Handlungsbedingung ( $F(2, 54) = 1.125, p > 0.1$ ), Geschlecht ( $F(1, 54) = 0.002, p > 0.1$ ) und Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 54) = 0.713, p > 0.05$ ) keinen signifikanten Effekt, ebenso wenig wie auf die Aufenthaltsdauer in den offenen Armen (Handlungsbedingung ( $F(2, 54) = 0.787, p > 0.1$ ), Geschlecht ( $F(1, 54) = 0.166, p > 0.5$ ), Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 54) = 0.360, p > 0.5$ )). Allerdings konnte ein signifikanter Effekt der Handlungsbedingung, nicht jedoch von Geschlecht und Gruppen-Geschlechter-Interaktion, auf die in den geschlossenen Armen zurückgelegte Strecke festgestellt werden (Handlungsbedingung ( $F(2, 54) = 4.223, p < 0.05$ ), Geschlecht ( $F(1, 54) = 0.122, p > 0.5$ ), Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 54) = 0.275, p > 0.5$ )). Die Post-hoc Analyse ergab in diesem Zusammenhang einen signifikanten Unterschied zwischen MS und EE ( $p < 0.01$ ) hinsichtlich der in den geschlossenen Armen zurückgelegten Strecke. Bezüglich der Aufenthaltsdauer in den geschlossenen Armen konnte kein signifikanter Effekt festgestellt werden (Handlungsbedingung ( $F(2, 54) = 0.784, p > 0.1$ ), Geschlecht ( $F(1, 54) = 3.006, p > 0.05$ ), Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 54) = 0.552, p > 0.1$ )). Ebenso konnte kein signifikanter Effekt auf die Eintrittshäufigkeit in geschlossene (Handlungsbedingung ( $F(2, 54) = 2.929, p > 0.05$ ), Geschlecht ( $F(1, 54) = 3.410, p > 0.05$ ), Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 54) = 0.064, p > 0.5$ )) und offene (Handlungsbedingung ( $F(2, 54) = 0.967, p > 0.1$ ), Geschlecht ( $F(1, 54) = 0.003, p > 0.1$ ), Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 54) = 0.157, p > 0.5$ )) Arme des EPM detektiert werden. Auch konnte kein signifikanter Effekt auf Rearing, Grooming sowie die Menge der Faeces-/Urin-Boli gefunden werden. Siehe Abbildungen 7 und 8.

### 3.1.3 Light-Dark Box

Bei der statistischen Auswertung der mittels LDB erhobenen Daten konnte kein signifikanter Effekt von Handlungsbedingung (Gruppe) ( $F(2, 54) = 1.090, p > 0.1$ ), Geschlecht ( $F(1, 54) = 0.899, p > 0.1$ ) und Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 54) = 0.186, p > 0.5$ ) auf die gesamte Aufenthaltsdauer der Versuchstiere im hellen Kompartiment der LDB gefunden werden. Ebenso konnte kein signifikanter Effekt von Handlungsbedingung ( $F(2, 54) = 0.304, p > 0.5$ ), Geschlecht ( $F(1, 54) = 0.272,$

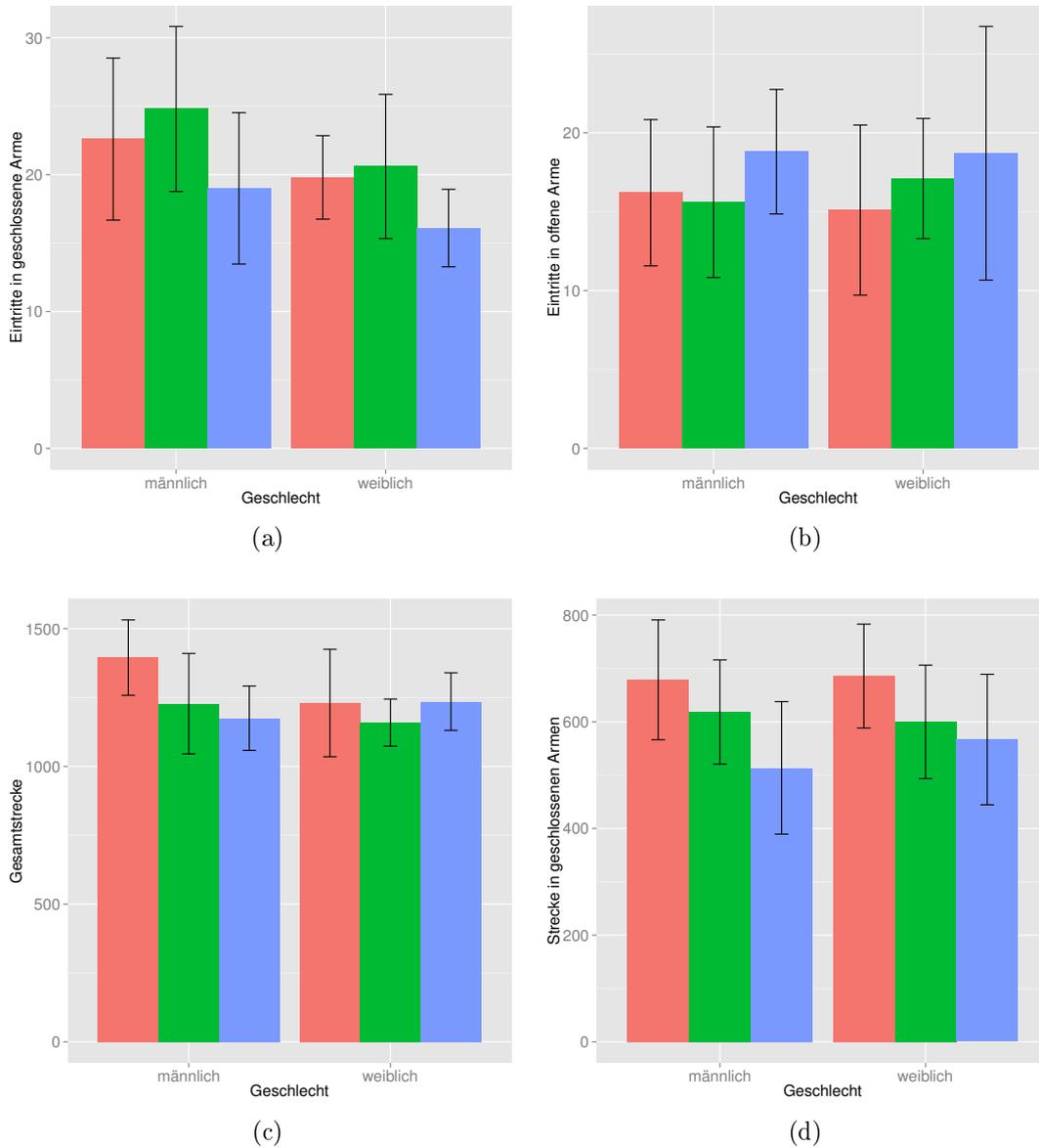


Abbildung 7: Ergebnisse der EPM-Testungen. (a) Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme des EPM, (b) Anzahl der Eintritte in die offenen Arme, (c) zurückgelegte Gesamtstrecke, (d) in den geschlossenen Armen zurückgelegte Strecke. Jeweils pro Geschlecht und Gruppe. EE = rot, MS = blau, KON = grün.

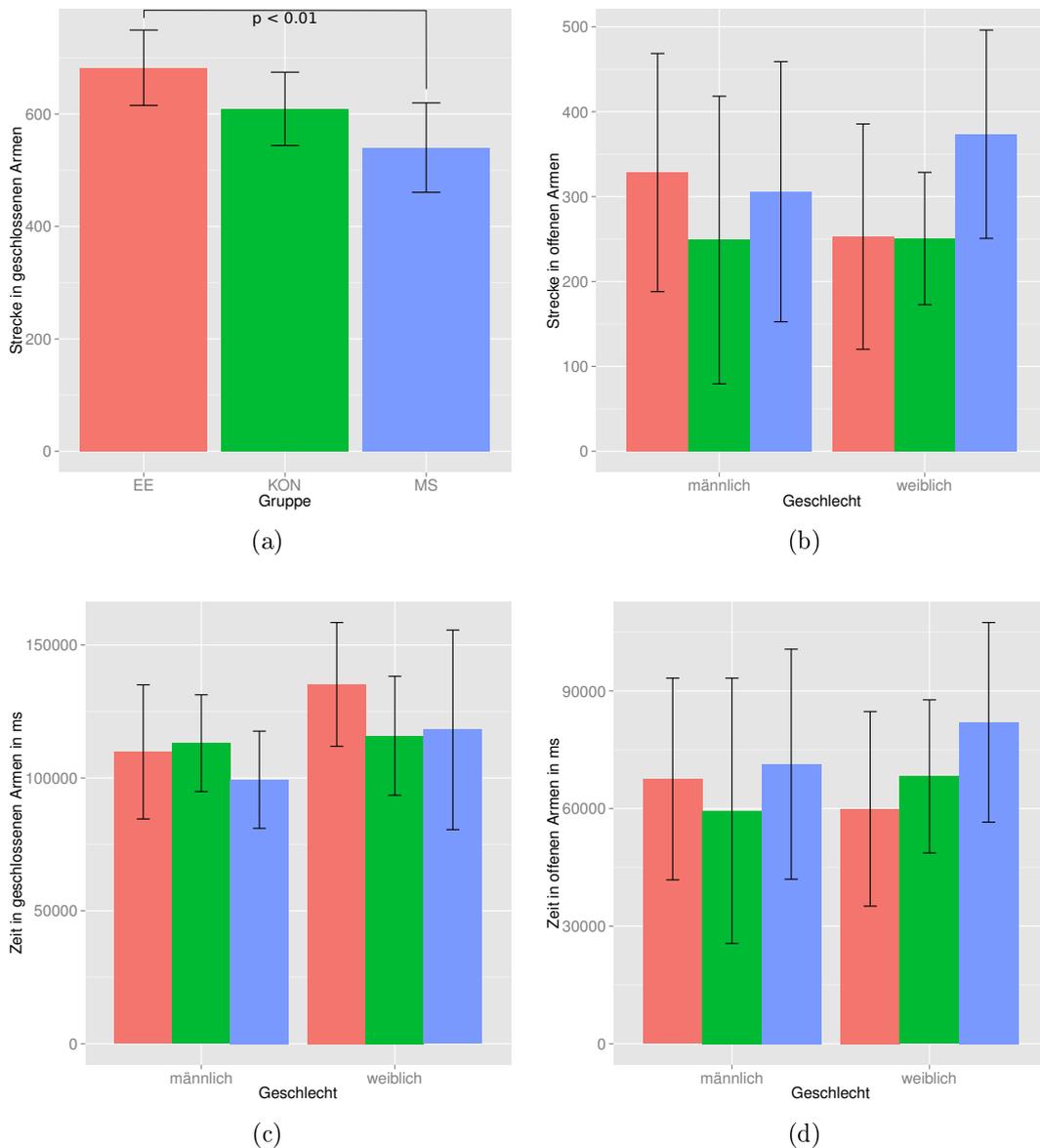


Abbildung 8: Ergebnisse der EPM-Testungen (Fortsetzung). (a) In den geschlossenen Armen zurückgelegte Strecke - geschlechterübergreifend, (b) in den offenen Armen zurückgelegte Strecke, (c) Aufenthaltsdauer in den geschlossenen Armen, (d) Aufenthaltsdauer in den offenen Armen. Abbildungen (b), (c) und (d) jeweils pro Geschlecht und Gruppe. EE = rot, MS = blau, KON = grün.

$p > 0.5$ ) und Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 54) = 0.487, p > 0.5$ ) auf die Anzahl der Transitionen zwischen den Kompartimenten festgestellt werden. Auch auf die Zeitdauer bis zum erstmaligen offensichtlichen Blick des Tiers in das helle Kompartiment konnte kein signifikanter Effekt gefunden werden (Haltungsbedingung:  $F(2, 54) = 1.251, p > 0.1$ ; Geschlecht:  $F(1, 54) = 0.220, p > 0.5$ ; Gruppen-Geschlechter-Interaktion:  $F(2, 54) = 1.405, p > 0.1$ ), ebenso wenig wie auf den erstmaligen vollumfänglichen Eintritt des Versuchstiers in das helle Kompartiment (Haltungsbedingung:  $F(2, 54) = 2.011, p > 0.1$ ; Geschlecht:  $F(1, 54) = 0.117, p > 0.5$ ; Gruppen-Geschlechter-Interaktion:  $F(2, 54) = 0.808, p > 0.1$ ). Siehe Abbildung 9.

### 3.1.4 Open Field

Die statistische Auswertung der mittels OF erhobenen Daten erbrachte einen signifikanten Effekt von Geschlecht ( $F(2, 54) = 4.944, p < 0.05$ ) und Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 54) = 7.808, p < 0.01$ ), nicht jedoch der Haltungsbedingung (Gruppe) ( $F(2, 54) = 1.629, p > 0.1$ ) auf die insgesamt zurückgelegte Strecke der Versuchstiere. In der Post-hoc Analyse fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen KON und EE der weiblichen Subgruppe ( $p < 0.01$ ). Hinsichtlich der Gesamtzahl an Eintritten in den zentralen Bereich des OF konnte ein signifikanter Effekt von Haltungsbedingung ( $F(2, 54) = 3.782, p < 0.05^*$ ), Geschlecht ( $F(1, 54) = 11.368, p < 0.01$ ) und Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 54) = 5.734, p < 0.01$ ) gefunden werden. Die Post-hoc Analyse ergab hier einen signifikanten Unterschied zwischen KON und EE ( $p < 0.05^*$ ) sowie in der Gruppen-Geschlechter-Interaktion zwischen KON und EE der weiblichen Subgruppe ( $p < 0.01$ ). Auch auf die im zentralen Bereich zurückgelegte Strecke hatten Haltungsbedingung ( $F(2, 54) = 3.416, p < 0.05^*$ ), Geschlecht ( $F(1, 54) = 9.888, p < 0.01$ ) und Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 54) = 5.729, p < 0.05$ ) einen signifikanten Effekt. In der Post-hoc Analyse fand sich hier ein signifikanter Unterschied zwischen KON und EE ( $p < 0.01^*$ ) sowie zwischen MS und EE ( $p < 0.05^*$ ) der weiblichen Subgruppe. Ebenso hatten Haltungsbedingung ( $F(2, 54) = 4.069, p < 0.05$ ), Geschlecht ( $F(1, 54) = 9.227, p < 0.01$ ) und Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 54) = 3.792, p < 0.05^*$ ) einen signifikanten Effekt auf die Aufenthaltsdauer im zentralen Bereich. Hier ergab die Post-hoc Analyse einen signifikanten Unterschied zwischen KON und EE ( $p < 0.05^*$ ) sowie zwischen MS und EE ( $p < 0.05^*$ ) wie auch in der weiblichen Subgruppe (KON und EE:  $p < 0.01$ ; MS und EE:  $p < 0.05^*$ ). Diese Effekte und Unterschiede bestanden bis auf die mit \* gekennzeichneten auch dann, wenn die entsprechenden Messwerte eines Versuchstiers, welches den zentralen Bereich nie

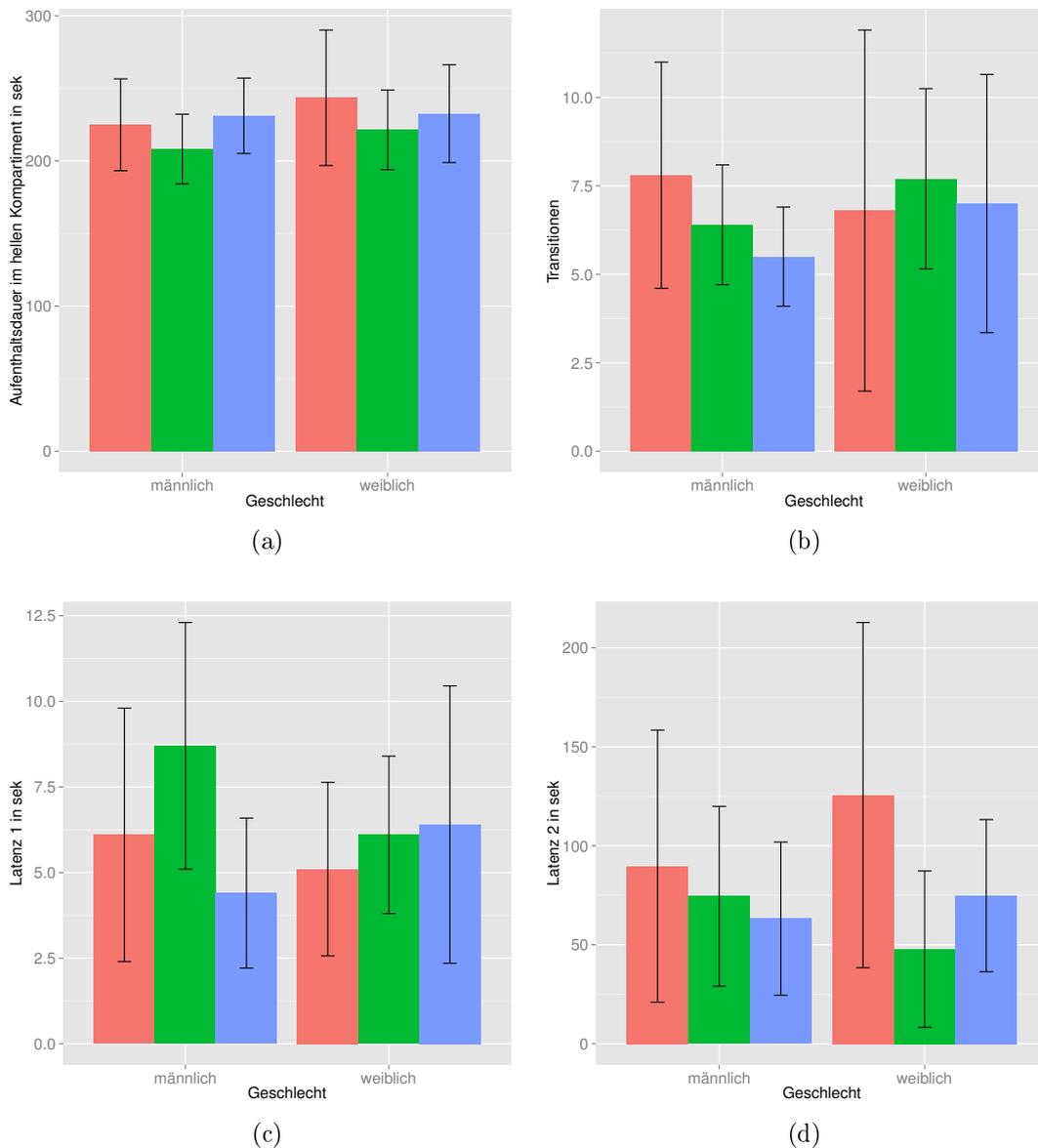


Abbildung 9: Ergebnisse der LDB-Testungen. (a) Aufenthaltsdauer im hellen Kompartiment (in Sekunden), (b) Anzahl der Transitionen, (c) Zeitdauer bis zum erstmaligen offensichtlichen Blick des Tiers in das helle Kompartiment (Latenz 1), (d) Zeitdauer bis zum erstmaligen vollumfänglichen Eintritt des Versuchstiers in das helle Kompartiment (Latenz 2). EE = rot, MS = blau, KON = grün.

betreten hatte, durch die Mittelwerte der entsprechenden Gruppe (weiblich, EE) ersetzt wurden. Siehe Abbildung 10.

Um nun weiter zu eruieren, wann im 30-minütigen Versuchsablauf Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen, wurde zusätzlich eine geschlechtergetrennte Auswertung der Daten in sechs fünf-Minuten Intervallen vorgenommen.

Im ersten Intervall (1.-5. Minute) fand sich ein signifikanter Gruppen-Geschlechter-Interaktionseffekt auf die insgesamt zurückgelegte Strecke ( $F(2, 54) = 6.036, p < 0.01$ ) und in der Post-hoc Analyse ein signifikanter Unterschied zwischen KON und EE der weiblichen Subgruppe ( $p < 0.01$ ). Weiterhin konnte ein signifikanter Effekt von Haltungsbedingung ( $F(2, 54) = 4.569, p < 0.05$ ) und Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 54) = 5.006, p < 0.05$ ) auf die Gesamtzahl an Eintritten in den zentralen Bereich des OF festgestellt werden. Die Post-hoc Analyse ergab hier einen signifikanten Unterschied zwischen MS und EE ( $p < 0.05$ ) sowie in der weiblichen Subgruppe zwischen KON und EE ( $p < 0.01$ ) sowie zwischen MS und EE ( $p < 0.01$ ). Außerdem fand sich ein signifikanter Gruppen-Geschlechter-Interaktionseffekt auf die im zentralen Bereich zurückgelegte Strecke ( $F(2, 54) = 4.560, p < 0.05$ ) und in der Post-hoc Analyse ein signifikanter Unterschied zwischen KON und EE ( $p < 0.05$ ) sowie MS und EE ( $p < 0.05$ ) der weiblichen Subgruppe.

Im zweiten fünf-Minuten-Intervall (6.-10. Minute) fand sich ebenso ein signifikanter Gruppen-Geschlechter-Interaktionseffekt auf die insgesamt zurückgelegte Strecke ( $F(2, 54) = 5.876, p < 0.01$ ) und in der Post-hoc Analyse ein signifikanter Unterschied zwischen KON und EE der weiblichen Subgruppe ( $p < 0.05$ ).

Im dritten fünf-Minuten-Intervall (11.-15. Minute) konnte ein signifikanter Effekt von Geschlecht ( $F(1, 54) = 10.892, p < 0.01$ ) und Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 54) = 3.626, p < 0.05$ ) auf die Gesamtzahl an Eintritten in den zentralen Bereich des OF festgestellt werden. Die Post-hoc Analyse ergab hier einen signifikanten Unterschied zwischen KON und EE ( $p < 0.05$ ) in der weiblichen Subgruppe.

Im vierten fünf-Minuten-Intervall (16.-20. Minute) fand sich ein signifikanter Gruppen-Geschlechter-Interaktionseffekt auf die insgesamt zurückgelegte Strecke ( $F(2, 54) = 5.647, p < 0.01$ ) und in der Post-hoc Analyse ein signifikanter Unterschied zwischen KON und EE der weiblichen Subgruppe ( $p < 0.01$ ). Ebenso fand sich ein signifikanter Effekt der Haltungsbedingung auf die Gesamtzahl an Eintritten in den zentralen Bereich ( $F(2, 54) = 5.071, p < 0.01$ ; Post-hoc Analyse: signifikanter Unterschied zwischen KON und EE ( $p < 0.01$ )), auf die im zentralen Bereich zurückgelegte Strecke ( $F(2, 54) = 5.337, p < 0.01$ ; Post-hoc Analyse: signifikanter Unterschied zwischen KON und EE ( $p < 0.01$ )) und auf die Aufenthaltsdauer im zentralen Bereich ( $F(2, 54) = 4.724, p < 0.05$ ; Post-hoc Analyse: signifikanter Unterschied zwischen

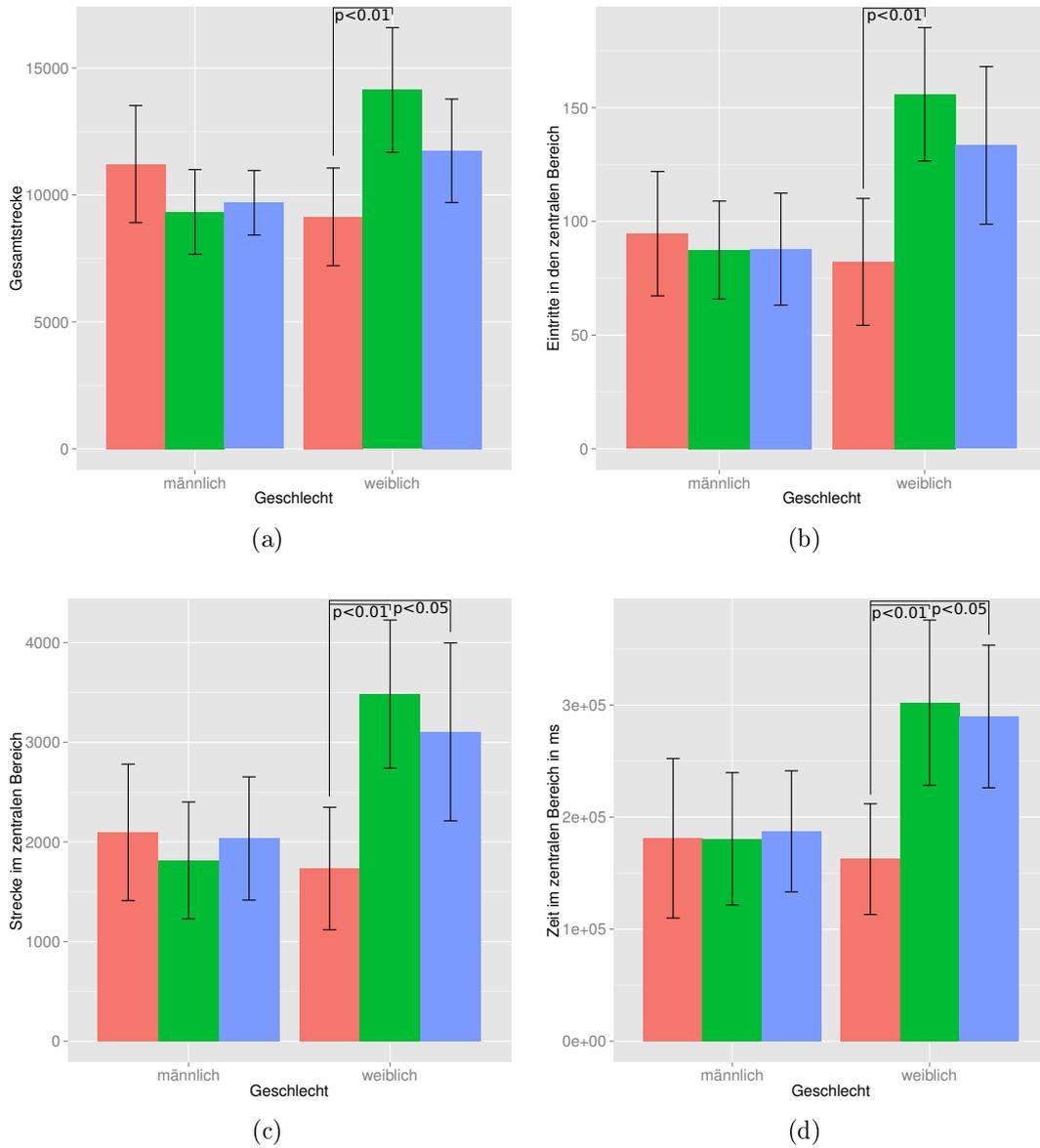


Abbildung 10: Ergebnisse der Open Field-Tests. (a) Zurückgelegte Gesamtstrecke, (b) Anzahl der Eintritte in den zentralen Bereich, (c) zurückgelegte Strecke im zentralen Bereich, (d) Aufenthaltsdauer im zentralen Bereich. EE = rot, MS = blau, KON = grün.

KON und EE ( $p < 0.01$ )).

Im fünften fünf-Minuten-Intervall (21.-25. Minute) fanden sich keine erwähnenswerten signifikanten Effekte/Unterschiede.

Abschließend fand sich im sechsten fünf-Minuten-Intervall (26.-30. Minute) ein signifikanter Gruppen-Geschlechter-Interaktionseffekt auf die insgesamt zurückgelegte Strecke ( $F(2, 54) = 3.647, p < 0.05$ ) und in der Post-hoc Analyse ein signifikanter Unterschied zwischen KON und EE der weiblichen Subgruppe ( $p < 0.05$ ). Siehe Abbildungen 11 und 12.

### 3.1.5 Barnes Maze

Die statistische Auswertung des ersten Barnes Maze-Teststtags (jeweils vier Testungen pro Tier) erbrachte einen signifikanten Effekt von Haltungsbedingung (Gruppe) ( $F(2, 234) = 3.972, p < 0.05$ ), nicht jedoch Geschlecht ( $F(1, 234) = 0.803, p > 0.1$ ) und Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 234) = 0.253, p > 0.5$ ) auf die Zeitdauer bis zum Eintritt in die Escape-Box. In der Post-hoc Analyse fand sich dabei ein signifikanter Unterschied zwischen MS und EE ( $p < 0.01$ ) sowie zwischen KON und EE ( $p < 0.05$ ). Weiterhin fand sich ein signifikanter Effekt von Haltungsbedingung ( $F(2, 234) = 3.249, p < 0.05$ ) und Geschlecht ( $F(1, 234) = 8.890, p < 0.01$ ), nicht jedoch Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 234) = 1.624, p > 0.1$ ) auf die Geschwindigkeit der Versuchstiere. Die Post-hoc Analyse ergab hier einen signifikanten Unterschied zwischen KON und EE ( $p < 0.05$ ) sowie zwischen MS und EE ( $p < 0.01$ ). Es konnte jedoch kein signifikanter Effekt auf die zurückgelegte Strecke gefunden werden. Siehe Abbildung 13.

Die Auswertung des zweiten Teststtags (jeweils drei Testungen pro Tier) erbrachte einen signifikanten Effekt der Haltungsbedingung ( $F(2, 174) = 3.542, p < 0.05$ ), nicht jedoch von Geschlecht ( $F(1, 174) = 1.346, p > 0.1$ ) und Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 174) = 1.626, p > 0.1$ ) auf die Zeitdauer bis zum Eintritt in die Escape-Box. In der Post-hoc Analyse fand sich dabei ein signifikanter Unterschied zwischen MS und EE ( $p < 0.05$ ). Weiterhin fanden sich keine signifikanten Effekte auf Strecke oder Geschwindigkeit. Siehe Abbildung 14.

Am dritten Testtag (jeweils drei Testungen pro Tier) fanden sich keine signifikanten Effekte.

Die Auswertung des vierten Teststtags (erster Tag nach Positionsänderung der Escape-Box, jeweils vier Testungen pro Tier) erbrachte einen signifikanten Effekt der Haltungsbedingung ( $F(2, 234) = 11.433, p < 0.001$ ), nicht jedoch von Geschlecht ( $F(1, 234) = 0.008, p > 0.5$ ) und Gruppen-Geschlechter-Interaktion ( $F(2, 234) = 1.308, p > 0.1$ ) auf die Zeitdauer bis zum Eintritt in die Escape-Box. In der Post-hoc

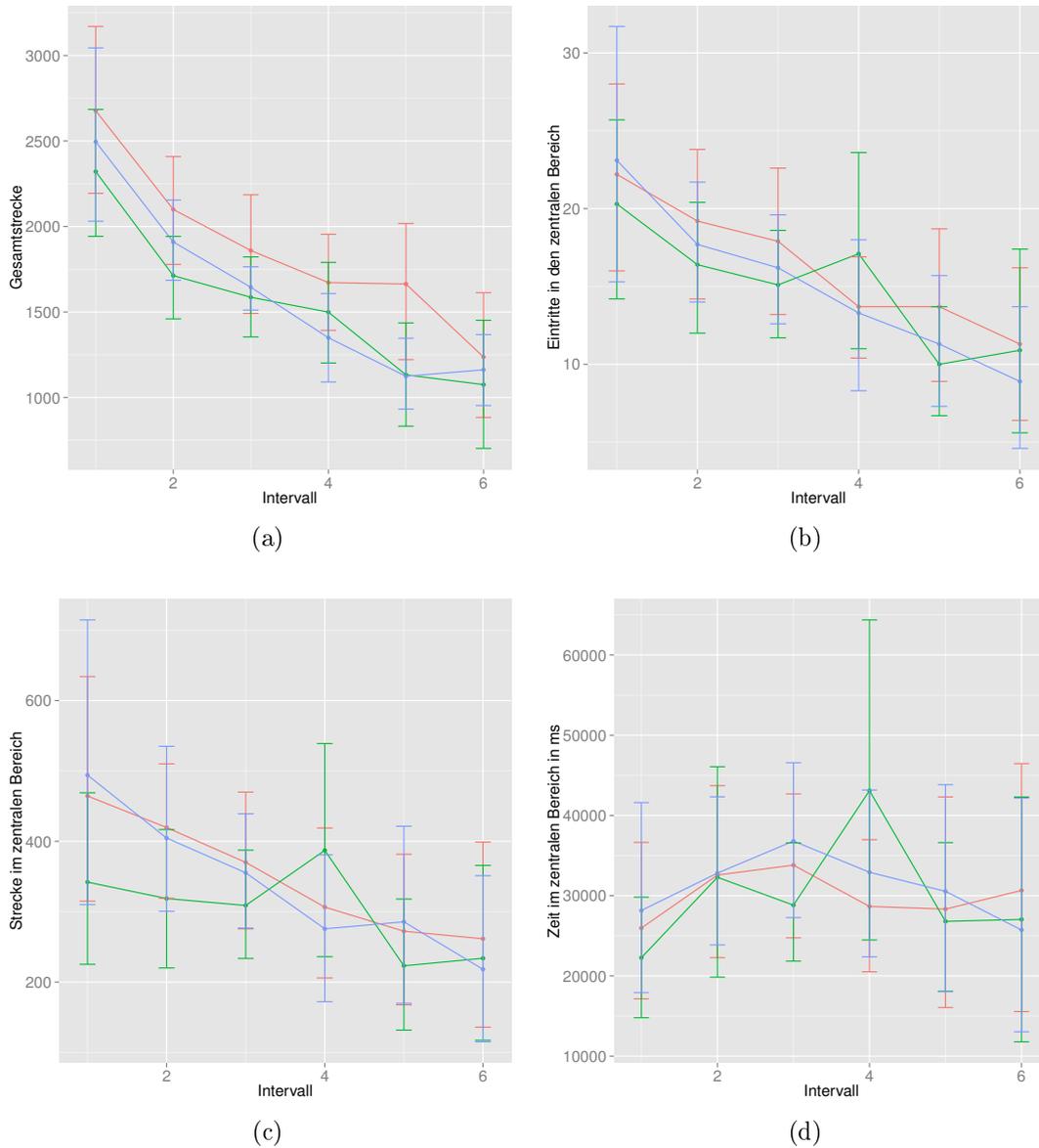


Abbildung 11: Verlauf der Open Field-Tests (männliche Versuchstiere) in fünfminuten Intervallen. (a) Zurückgelegte Gesamtstrecke, (b) Anzahl der Eintritte in den zentralen Bereich, (c) zurückgelegte Strecke im zentralen Bereich, (d) Aufenthaltsdauer im zentralen Bereich. EE = rot, MS = blau, KON = grün.

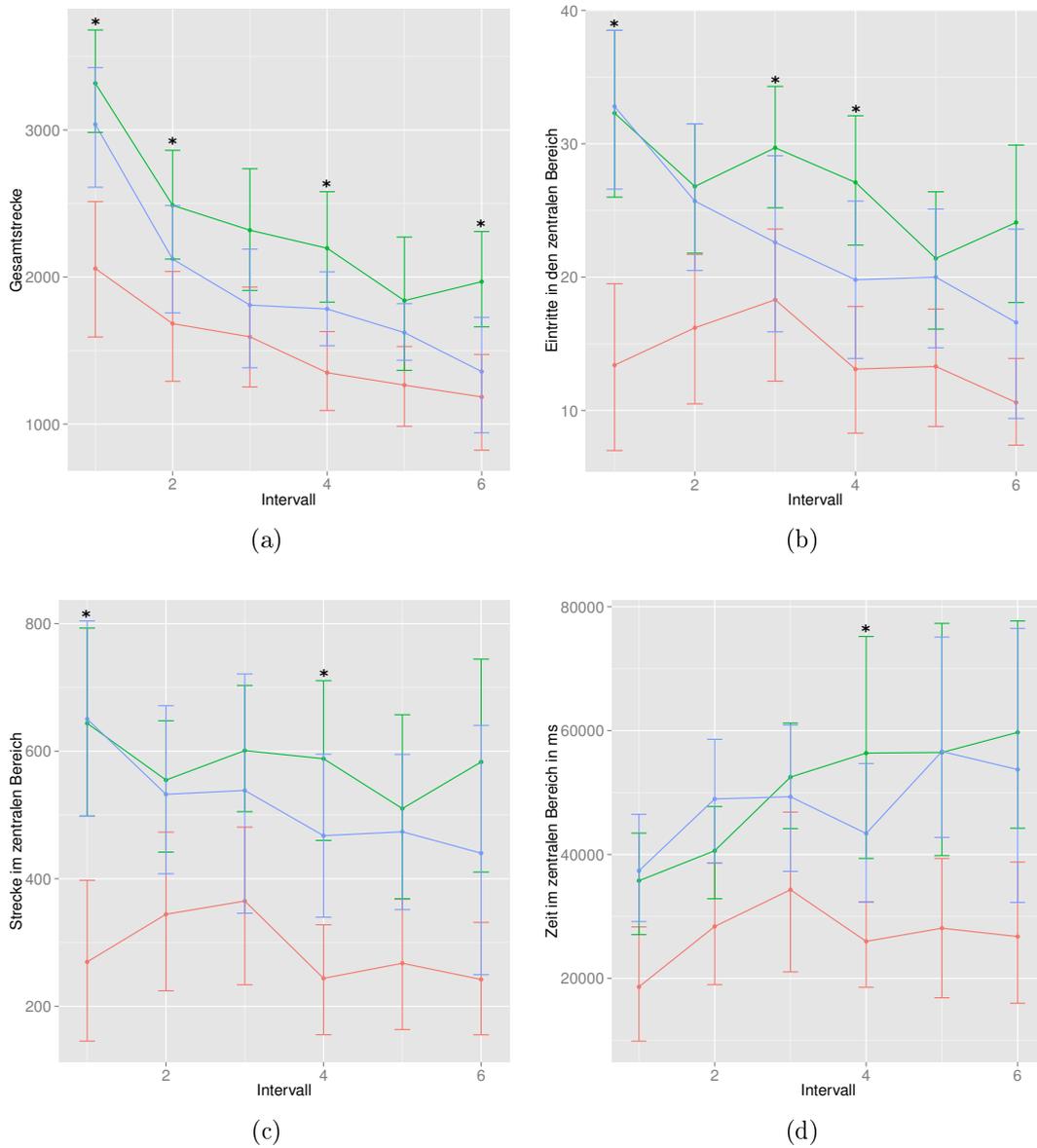


Abbildung 12: Verlauf der Open Field-Tests (weibliche Versuchstiere) in fünfminuten Intervallen. Intervalle mit signifikanten Resultaten sind mit \* gekennzeichnet (siehe Text). (a) Zurückgelegte Gesamtstrecke, (b) Anzahl der Eintritte in den zentralen Bereich, (c) zurückgelegte Strecke im zentralen Bereich, (d) Aufenthaltsdauer im zentralen Bereich. EE = rot, MS = blau, KON = grün.

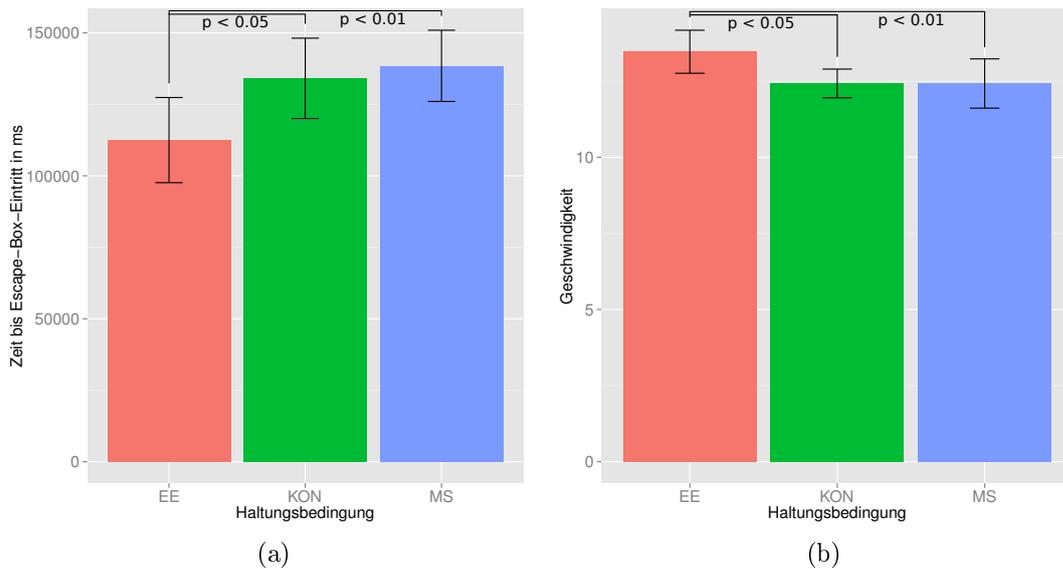
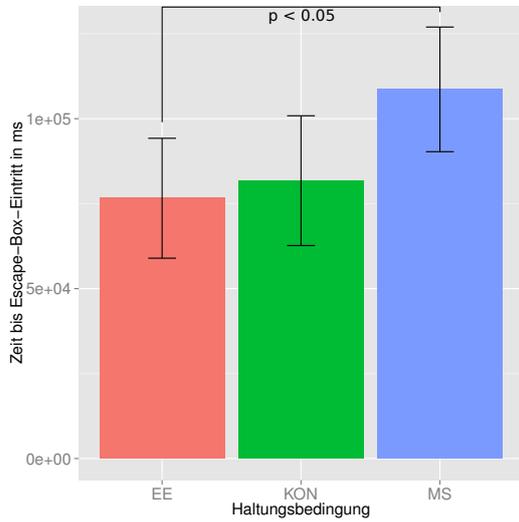


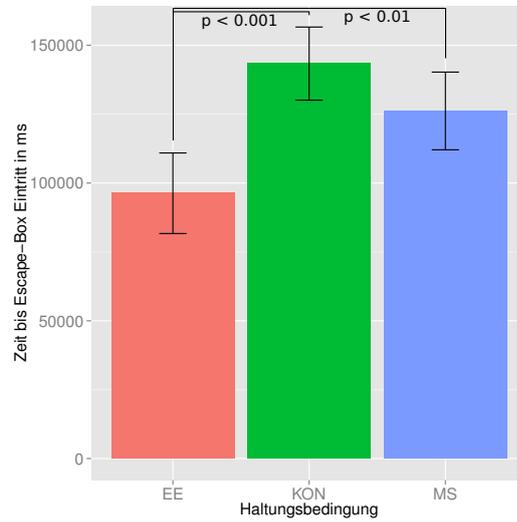
Abbildung 13: Ergebnisse Barnes Maze-Teststag 1. (a) Zeit bis zum Eintritt in die Escape-Box, (b) Geschwindigkeit der Versuchstiere. EE = rot, MS = blau, KON = grün.

Analyse fand sich dabei ein signifikanter Unterschied zwischen KON und EE ( $p < 0.001$ ) sowie zwischen MS und EE ( $p < 0.01$ ). Außerdem ließ sich ein signifikanter Effekt der Haltungsbedingung ( $F(2, 234) = 5.683, p < 0.01$ ) auf die Geschwindigkeit feststellen und in der Post-hoc Analyse ein signifikanter Unterschied zwischen KON und EE ( $p < 0.01$ ) wie auch zwischen MS und EE ( $p < 0.01$ ). Genauso fand sich ein signifikanter Effekt der Haltungsbedingung ( $F(2, 234) = 3.842, p < 0.05$ ) auf die zurückgelegte Strecke und in der Post-hoc Analyse wiederum ein signifikanter Unterschied zwischen KON und EE ( $p < 0.05$ ). Siehe Abbildung 14.

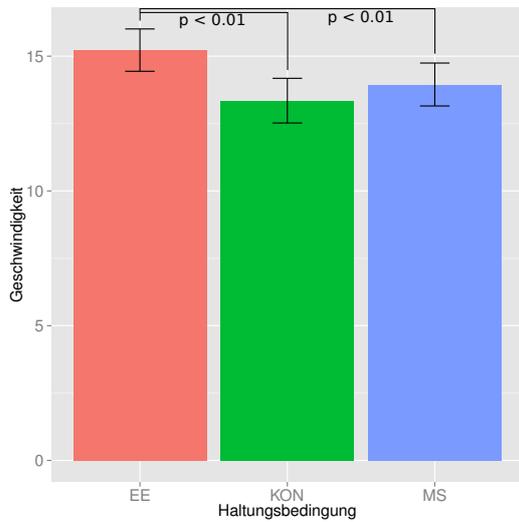
Am fünften Testtag (jeweils drei Testungen pro Tier) fand sich ein signifikanter Effekt der Haltungsbedingung ( $F(2, 174) = 7.727, p < 0.01$ ) auf die Zeitdauer bis zum Eintritt in die Escape-Box. Die Post-hoc Analyse ergab hier einen signifikanten Unterschied zwischen KON und EE ( $p < 0.01$ ) sowie zwischen MS und EE ( $p < 0.05$ ). Ebenso fand sich ein signifikanter Effekt der Haltungsbedingung (nach logarithmischer Transformation wegen Heteroskedastizität:  $F(2, 174) = 6.567, p < 0.01$ ) auf die Geschwindigkeit und in der Post-hoc Analyse ein signifikanter Unterschied zwischen KON und EE ( $p < 0.05$ ) sowie zwischen MS und EE ( $p < 0.05$ ). Abschließend ließ sich ein signifikanter Effekt der Haltungsbedingung ( $F(2, 174) = 3.568, p < 0.05$ ) auf die zurückgelegte Strecke und in der Post-hoc Analyse ein signifikanter Unterschied zwischen KON und EE ( $p < 0.05$ ) feststellen. Siehe Abbildung 15.



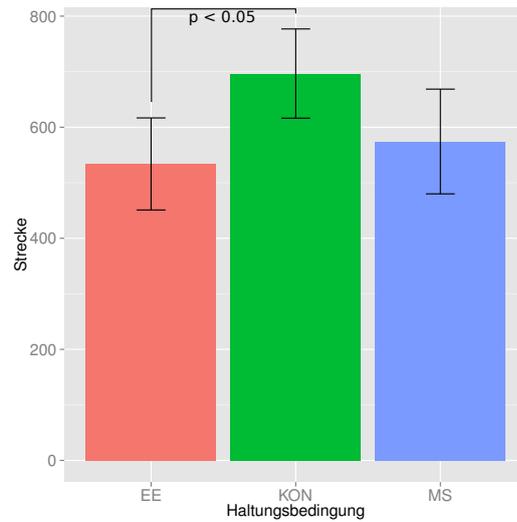
(a)



(b)



(c)



(d)

Abbildung 14: Ergebnisse Barnes Maze. (a) Zeit bis zum Eintritt in die Escape-Box am Testtag 2, (b) Zeit bis zum Eintritt in die Escape-Box am Testtag 4, (c) Geschwindigkeit der Versuchstiere am Testtag 4, (d) Zurückgelegte Strecke am Testtag 4. EE = rot, MS = blau, KON = grün.

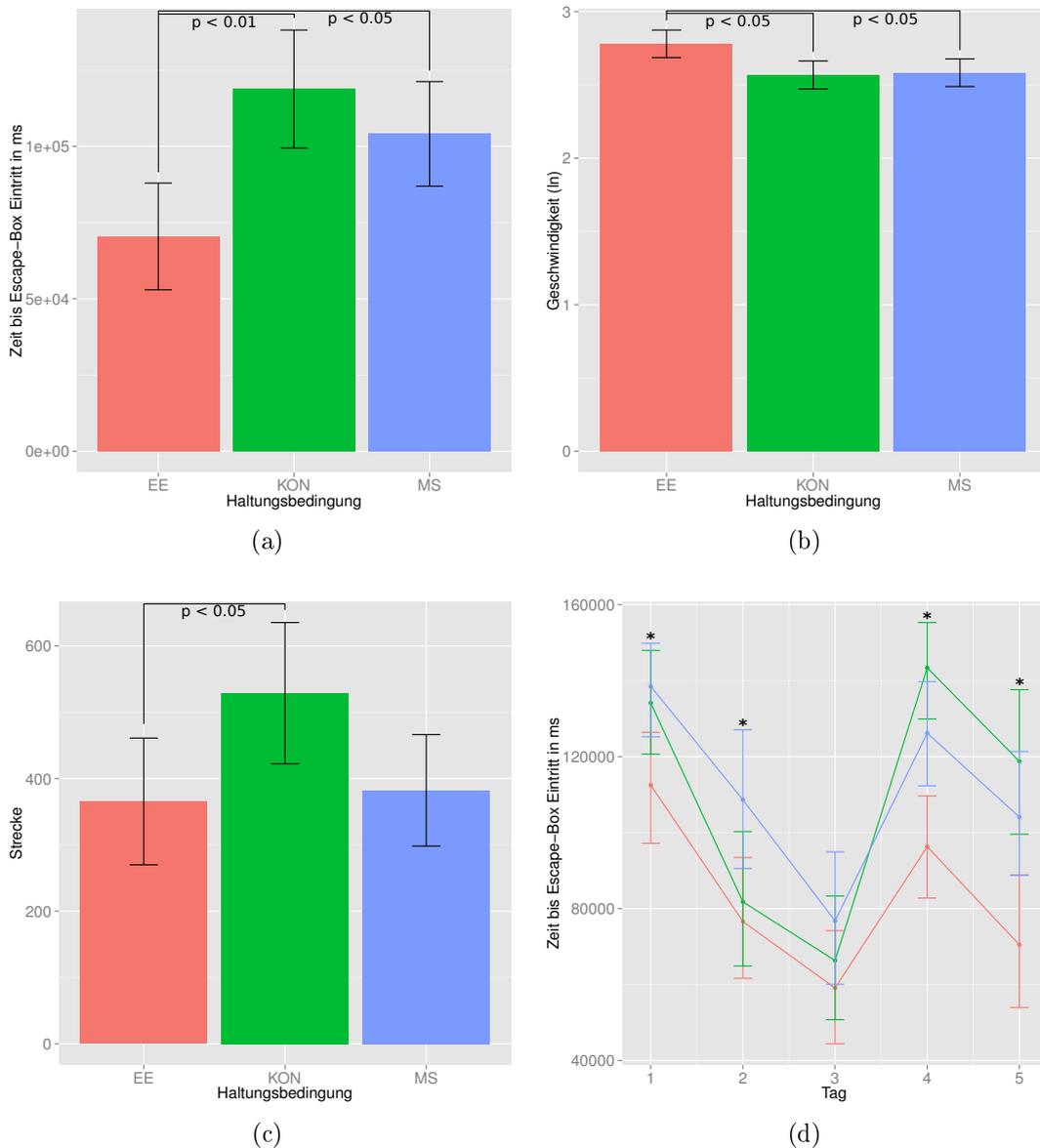
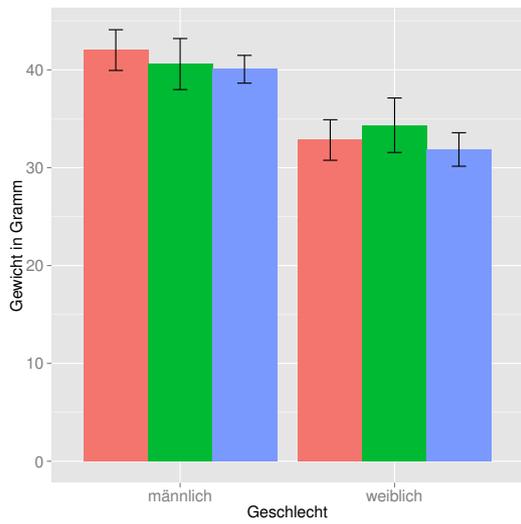


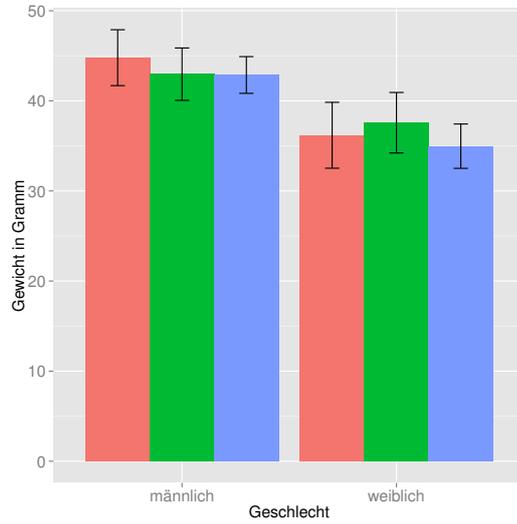
Abbildung 15: Ergebnisse Barnes Maze. (a) Zeit bis zum Eintritt in die Escape-Box am Testtag 5, (b) Geschwindigkeit der Versuchstiere am Testtag 5, (c) zurückgelegte Strecke am Testtag 5, (d) Verlauf der Zeit bis Escape-Box-Eintritt über die fünf Testtage, Tage mit signifikanten Gruppenunterschieden sind dabei mit \* gekennzeichnet (siehe Text). EE = rot, MS = blau, KON = grün.

### 3.1.6 Gewichtsverlauf

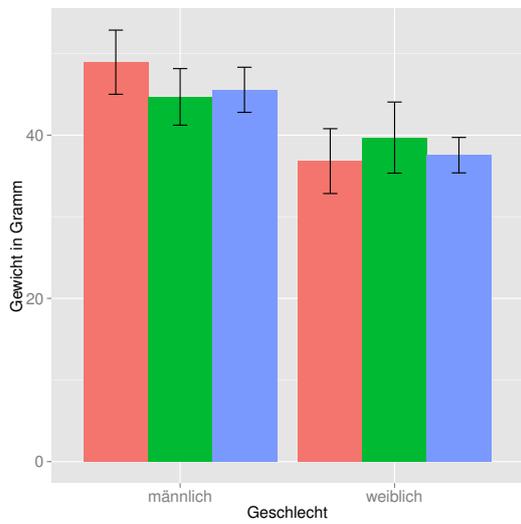
Die statistische Auswertung der drei Gewichtsmessungen der Versuchstiere erbrachte keinen signifikanten Effekt der Haltungsbedingung auf das Gewicht der Versuchstiere: Gewichtsmessung im Alter von 10 Wochen:  $F(2, 54) = 1.606$ ,  $p > 0.1$ ; Gewichtsmessung im Alter von 14 Wochen  $F(2, 54) = 0.833$ ,  $p > 0.1$ ; Gewichtsmessung im Alter von 19 Wochen  $F(2, 54) = 0.361$ ,  $p > 0.5$ . Siehe Abbildung 16.



(a)



(b)



(c)

Abbildung 16: Ergebnisse der Gewichtsmessungen. Alter der Versuchstiere: (a) 10 Wochen, (b) 14 Wochen, (c) 19 Wochen. EE = rot, MS = blau, KON = grün.

## 3.2 Genexpressionsanalyse

Zunächst sollen die wesentlichen Ergebnisse der Vorarbeiten kurz dargestellt werden. Nach Abschluss der RNA-Extraktion und Ausschluss aller ungeeigneten RNA-Samples (260/280-Ratio  $\leq 1.9$ , 260/230-Ratio  $\leq 1.6$ ) lag der Mittelwert der spektrometrisch erhobenen 260/280-Rationes bzw. 260/230-Rationes der übrigen 148 RNA-Samples bei 2.082 (Minimum 2.0, Maximum 2.2) bzw. 2.122 (Minimum 1.61, Maximum 2.37; siehe 2.4.2). Da eine zu geringe Anzahl von Samples der Region Nucleus accumbens den vorgenannten Regeln entsprach, wurde diese Region von den weiteren Schritten ausgenommen.

Die zum Ausschluss von Verunreinigung der cDNA-Samples mit genomischer DNA durchgeführten PCRs mit Primern für Introns des 5-HTT-Gens (siehe 2.4.4) erbrachten folgende Auffälligkeit: Während sich in allen übrigen cDNA-PCRs sowie den Kontrollen ohne Nukleotide/Polymerase/cDNA keine Hinweise auf Verunreinigung ergaben, konnten in PCRs mit cDNAs, welche der Gehirnregion Raphe dorsalis zuzuordnen waren, signifikante Banden zwischen 200 und 300bp wie in der Positivkontrolle detektiert werden (erwartetes Produkt bei 225bp). Da PCRs dieser cDNAs mit Primern für das *PKC $\gamma$* -Gen kein auffälliges Bandenmuster zeigten, wurde jedoch nicht von einer Verunreinigung der entsprechenden cDNA-Samples ausgegangen. Stattdessen dürfte eine hohe Transkriptionsrate des in der Raphe dorsalis natürlicherweise vorkommenden *5-HTT*-Gens (Bengel et al., 1997) und somit ein hoher Spiegel an 5-HTT-prä-mRNA ursächlich sein. Im Gegensatz zu mRNA enthält prä-mRNA Introns. Prä-mRNA wird außerdem im Rahmen der RNA-Extraktion nicht zerstört und somit bei der cDNA-Synthese in die cDNA eingebaut. Dies dürfte für die Detektion der beschriebenen Banden ursächlich sein.

Die mit Hilfe des „Experion™ Automated Electrophoresis System“ ermittelten RQIs (siehe 2.4.5) der RNA-Samples beliefen sich zwischen sieben und zehn. Dies weist auf eine hohe Integrität der zur cDNA-Synthese eingesetzten RNA hin. Die zusätzlich durchgeführten Auftrennungen einiger RNA-Samples mittels Agarose-Gel-Elektrophorese zeigten keine wesentlichen Abweichungen von den vom Experion™-System erstellten Bandenmustern.

Die Berechnung der Amplifikationseffizienzen der drei von „qBase+“ als am stabilsten identifizierten Referenzgene erbrachte folgende Ergebnisse (jeweiliger M-Wert in Klammern): *YWHAZ* 1.816 (0.256), *HMBS* 1.880 (0.339), *TBP* 1.851 (0.291). Folgende Effizienzen wurden für die Zielgene ermittelt: *NPY* 1.77, *NPYR1* 1.79, *NPYR2* 1.82, *NPYR5* 1.79, *NPSR1* 1.84, *CRH* 1.904, *CRHR1* 1.846, *CRHR2* 1.835.

### 3.2.1 NPY-System

Es konnte kein signifikanter Effekt der Haltungsbedingung (Gruppe) auf die Expressionsrate von *NPY* in den untersuchten Regionen festgestellt werden: Amygdala  $F(2, 19) = 0.258$ ,  $p > 0.5$ ; Frontalcortex  $F(2, 23) = 1.685$ ,  $p > 0.1$ ; Striatum  $F(2, 25) = 1.043$ ,  $p > 0.1$ ; Hippocampus  $F(2, 25) = 0.37$ ,  $p > 0.5$ ; dorsale Nuclei raphes  $F(2, 19) = 0.869$ ,  $p > 0.1$ ; Hypothalamus  $F(2, 19) = 1$ ,  $p > 0.1$ . Siehe Abbildung 17.

Ebenso konnte kein signifikanter Effekt der Haltungsbedingung auf die Expressionsrate des *NPYR1* in ebendiesen Regionen festgestellt werden: Amygdala  $F(2, 19) = 1.364$ ,  $p > 0.1$ ; Frontalcortex  $F(2, 23) = 0.975$ ,  $p > 0.1$ ; Striatum  $F(2, 24) = 2.388$ ,  $p > 0.1$ ; Hippocampus  $F(2, 25) = 0.618$ ,  $p > 0.5$ ; dorsale Nuclei raphes  $F(2, 18) = 1.391$ ,  $p > 0.1$ ; Hypothalamus  $F(2, 18) = 0.797$ ,  $p > 0.1$ . Siehe Abbildung 18.

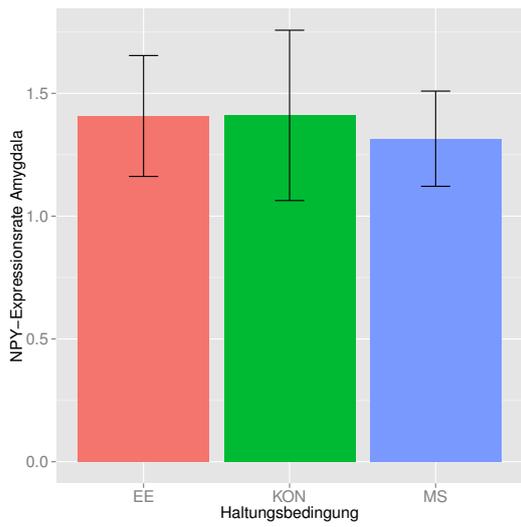
Auch auf die Expressionsrate des *NPYR2* konnte kein signifikanter Effekt der Haltungsbedingung detektiert werden: Amygdala  $F(2, 19) = 0.008$ ,  $p > 0.5$ ; Frontalcortex  $F(2, 21) = 1.203$ ,  $p > 0.1$ ; Striatum  $F(2, 25) = 2.742$ ,  $p > 0.05$ ; Hippocampus  $F(2, 25) = 0.173$ ,  $p > 0.5$ ; dorsale Nuclei raphes  $F(2, 17) = 1.623$ ,  $p > 0.1$ ; Hypothalamus  $F(2, 19) = 0.019$ ,  $p > 0.5$ . Siehe Abbildung 19.

Abschließend konnte ebenso kein signifikanter Effekt der Haltungsbedingung auf die Expressionsrate des *NPYR5* festgestellt werden: Amygdala  $F(2, 18) = 1.255$ ,  $p > 0.1$ ; Frontalcortex  $F(2, 19) = 2.459$ ,  $p > 0.1$ ; Striatum  $F(2, 23) = 0.304$ ,  $p > 0.1$ ; Hippocampus  $F(2, 24) = 0.483$ ,  $p > 0.5$ ; dorsale Nuclei raphes  $F(2, 18) = 0.053$ ,  $p > 0.5$ ; Hypothalamus  $F(2, 19) = 0.379$ ,  $p > 0.5$ . Siehe Abbildung 20.

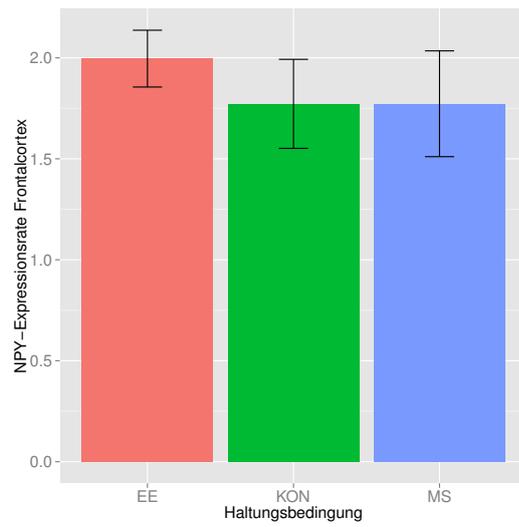
### 3.2.2 CRH, CRHR1 und CRHR2

Es konnte ein signifikanter Effekt der Haltungsbedingung (Gruppe) auf die Expression von *CRH* in der Amygdala ( $F(2, 19) = 10.68$ ,  $p < 0.001$ ) festgestellt werden. Die Post-hoc-Analyse ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen MS und KON ( $p < 0.001$ ) sowie zwischen EE und KON ( $p < 0.01$ ). Ebenso fand sich ein signifikanter Effekt der Haltungsbedingung auf die Expression von *CRH* im Frontalcortex ( $F(2, 23) = 3.445$ ,  $p < 0.05$ ). Hier ergab die Post-hoc-Analyse einen signifikanten Unterschied zwischen MS und EE ( $p < 0.05$ ) sowie zwischen KON und EE ( $p < 0.05$ ). Kein signifikanter Effekt fand sich in Hippocampus ( $F(2, 25) = 0.117$ ,  $p > 0.5$ ), Hypothalamus ( $F(2, 18) = 2.285$ ,  $p > 0.05$ ), dorsalen Nuclei raphes ( $F(2, 19) = 0.736$ ,  $p > 0.05$ ) und Striatum ( $F(2, 25) = 0.138$ ,  $p > 0.5$ ). Siehe Tabelle 1a für die numerische Verteilung der Samples und Abbildung 21.

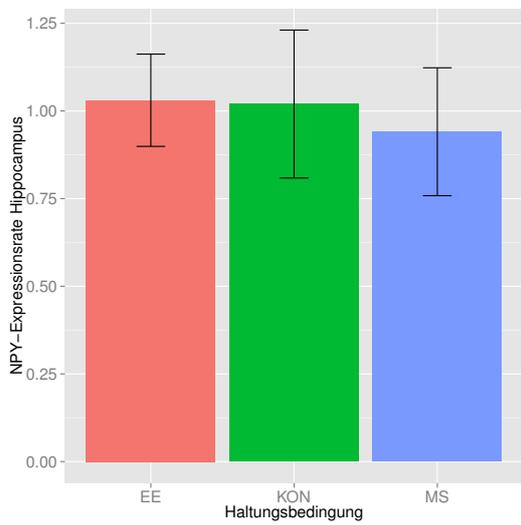
Auch auf die Expression des *CRHR1* in der Amygdala wurde ein signifikanter Effekt der Haltungsbedingung gefunden ( $F(2, 19) = 7.613$ ,  $p < 0.01$ ). Auch hier



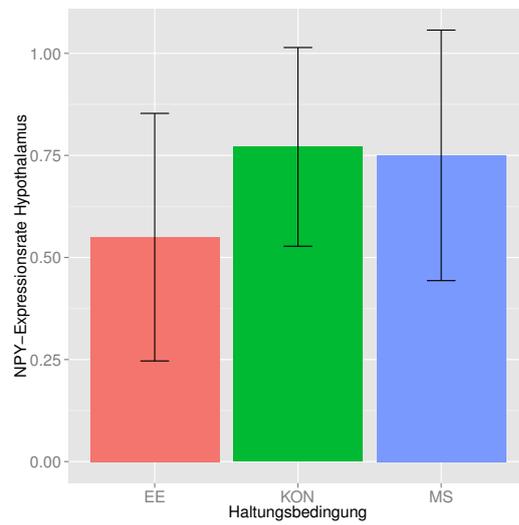
(a) Amygdala



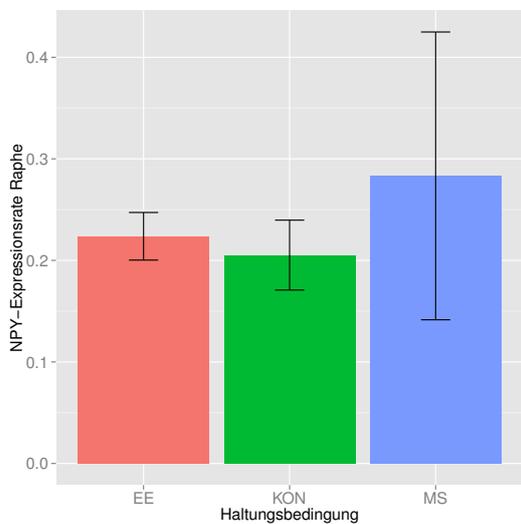
(b) Frontalcortex



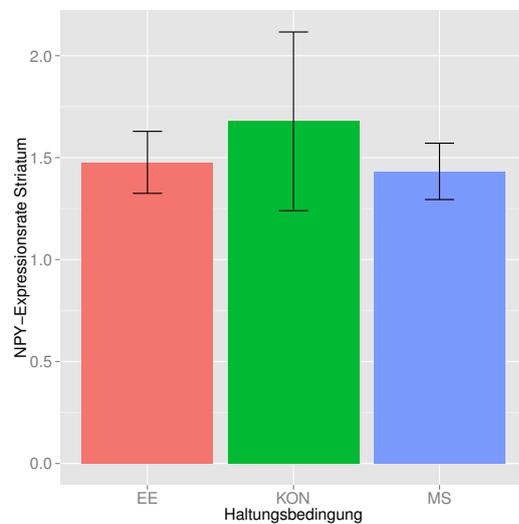
(c) Hippocampus



(d) Hypothalamus

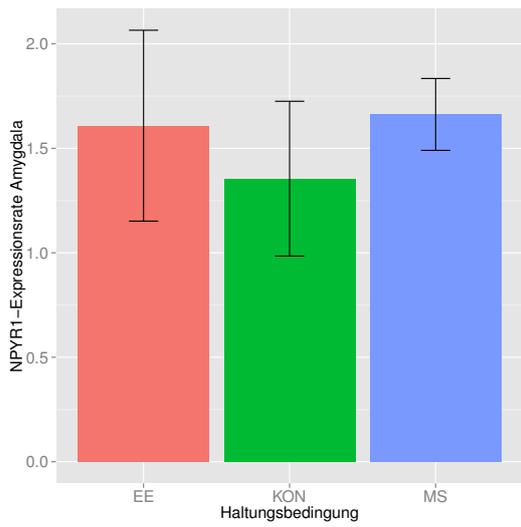


(e) Dorsale Nuclei raphe

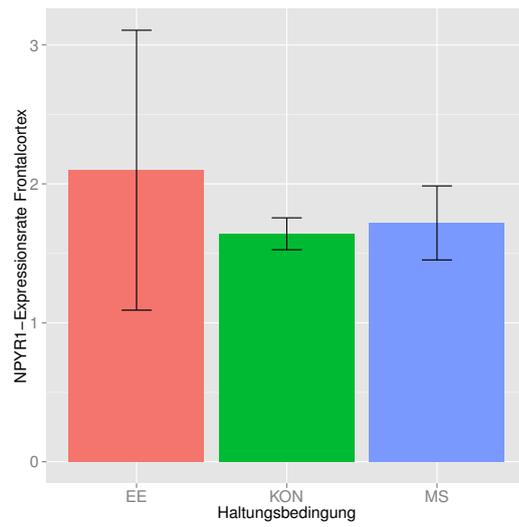


(f) Striatum

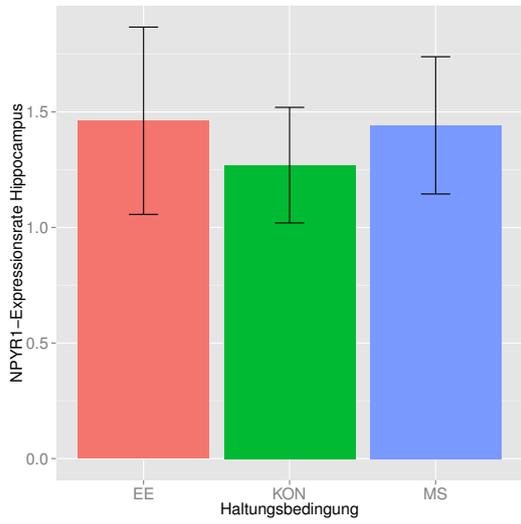
Abbildung 17: *NPY*-Expressionsraten in den untersuchten Regionen.



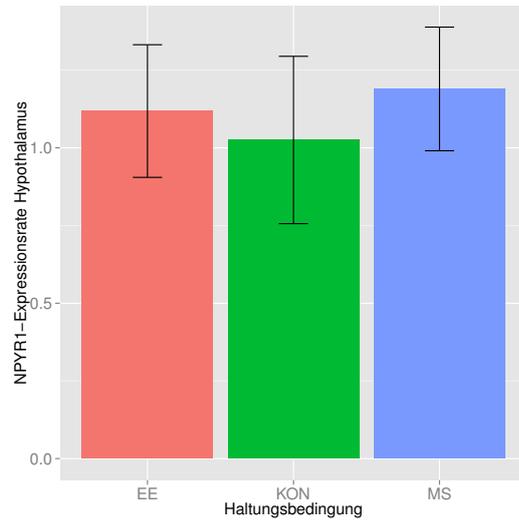
(a) Amygdala



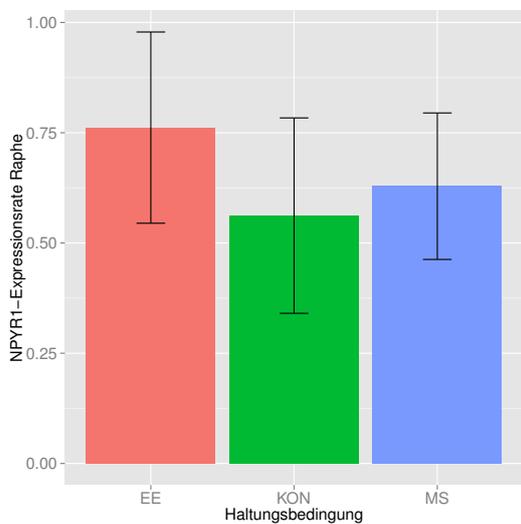
(b) Frontalcortex



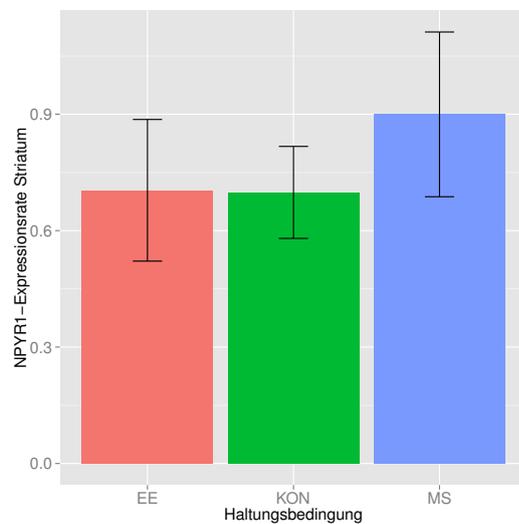
(c) Hippocampus



(d) Hypothalamus

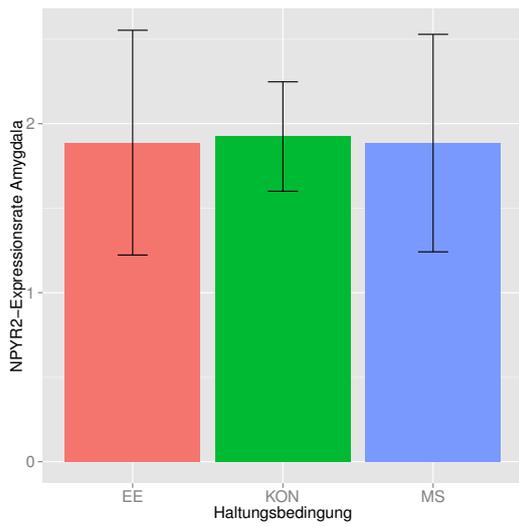


(e) Dorsale Nuclei raphe

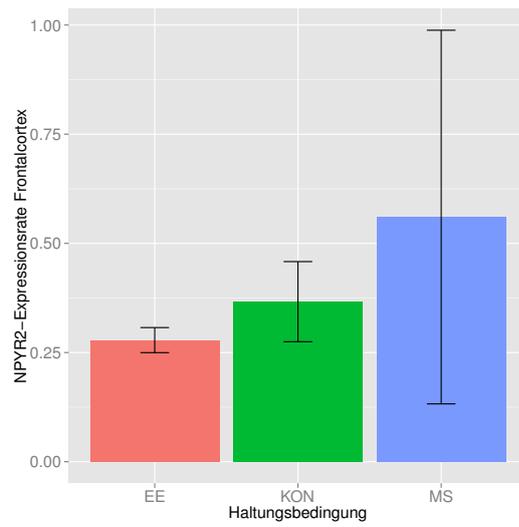


(f) Striatum

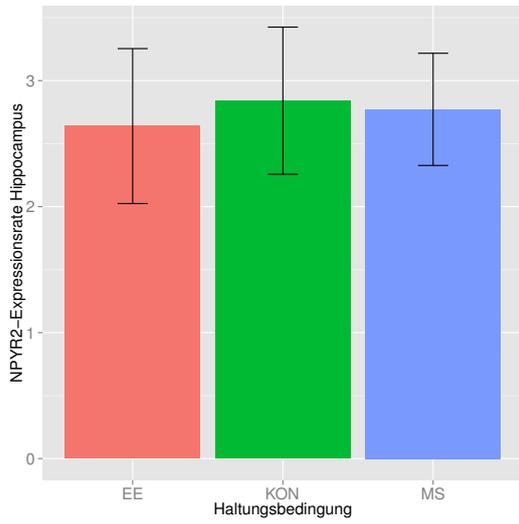
Abbildung 18: *NPYR1*-Expressionsraten in den untersuchten Regionen.



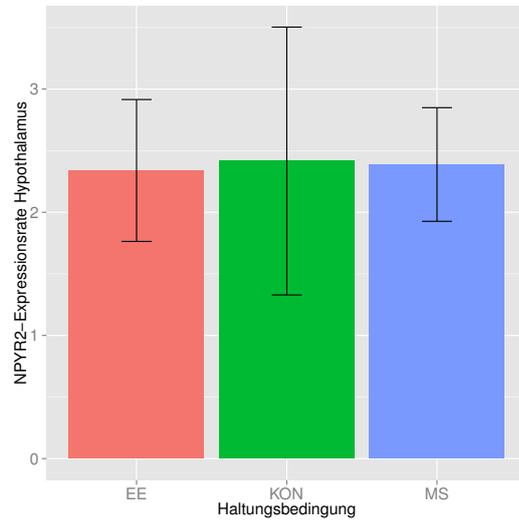
(a) Amygdala



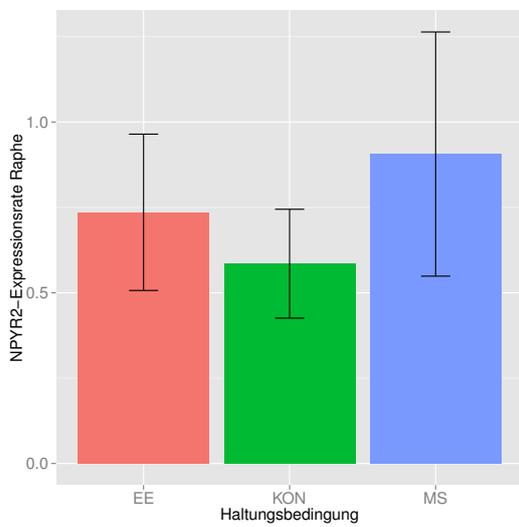
(b) Frontalcortex



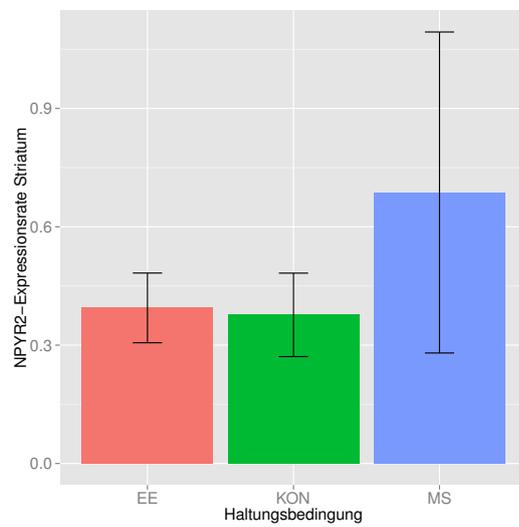
(c) Hippocampus



(d) Hypothalamus

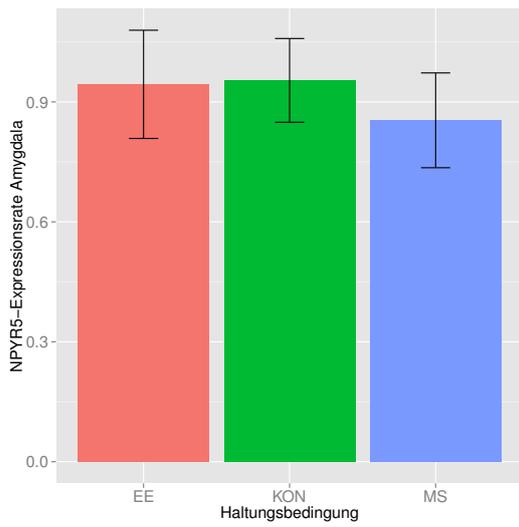


(e) Dorsale Nuclei raphe

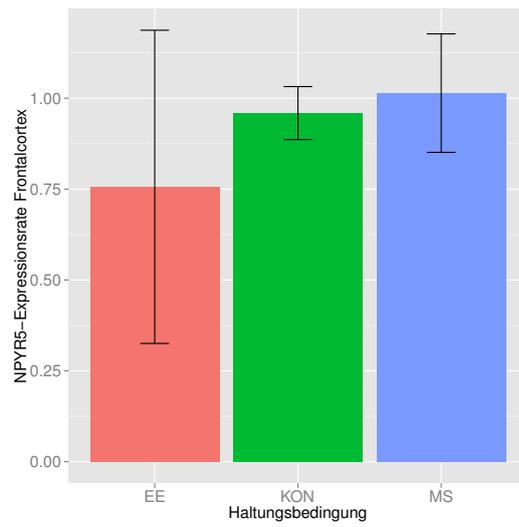


(f) Striatum

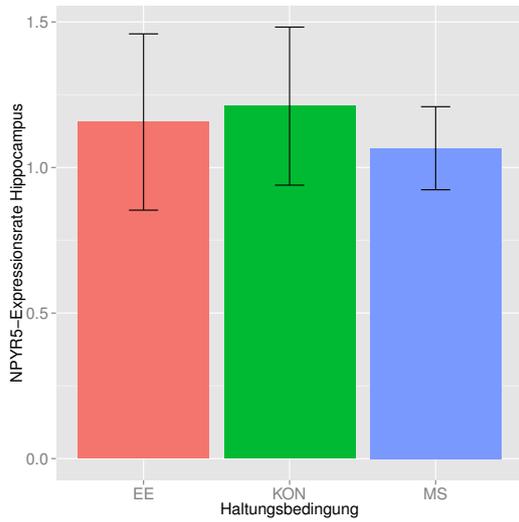
Abbildung 19: *NPYR2*-Expressionsraten in den untersuchten Regionen.



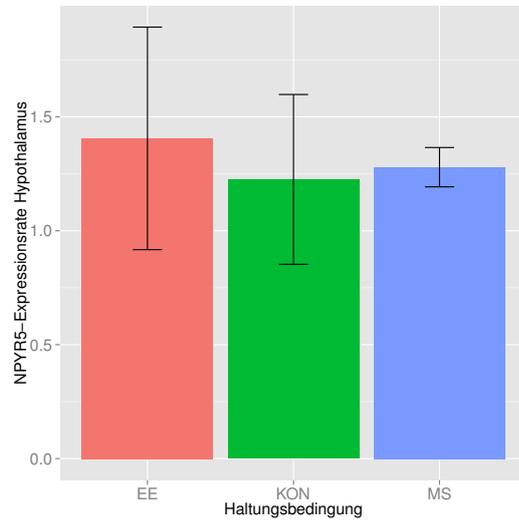
(a) Amygdala



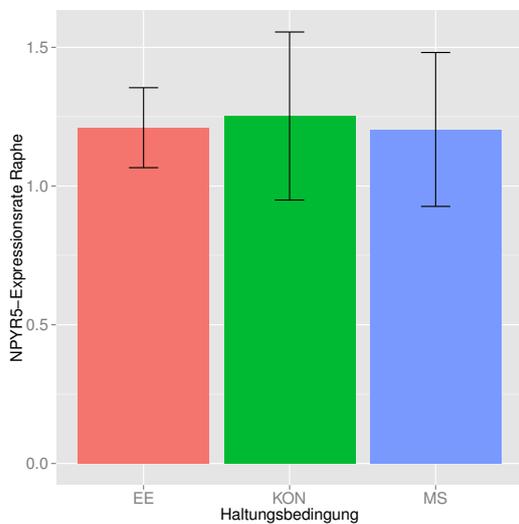
(b) Frontalcortex



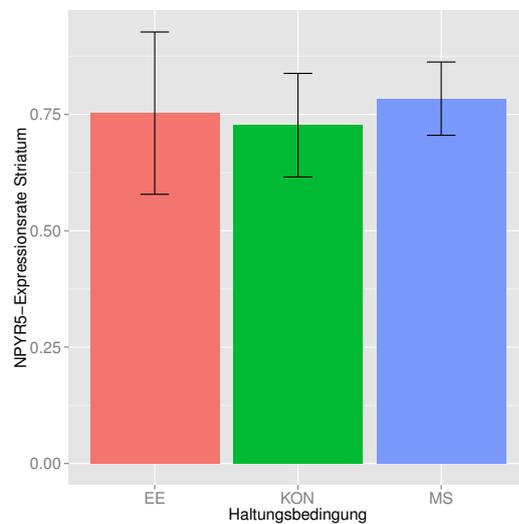
(c) Hippocampus



(d) Hypothalamus

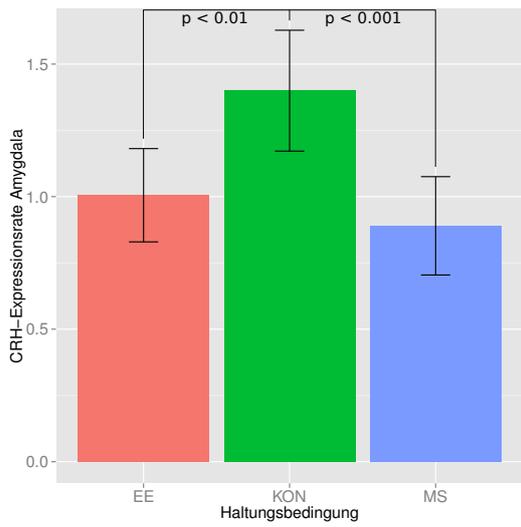


(e) Dorsale Nuclei raphe

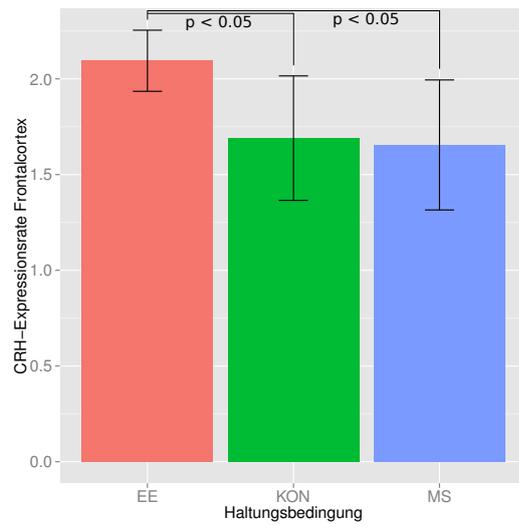


(f) Striatum

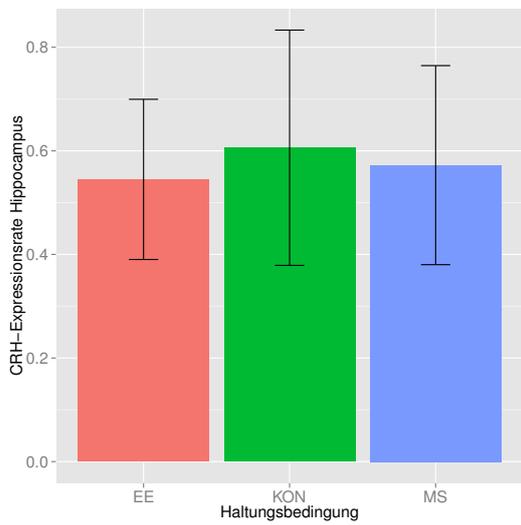
Abbildung 20: *NPYR5*-Expressionsraten in den untersuchten Regionen.



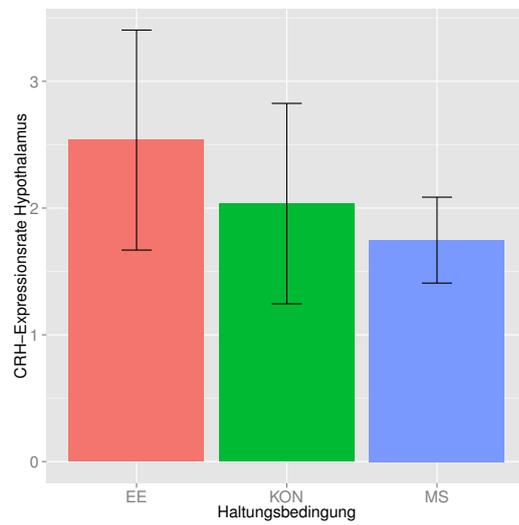
(a) Amygdala



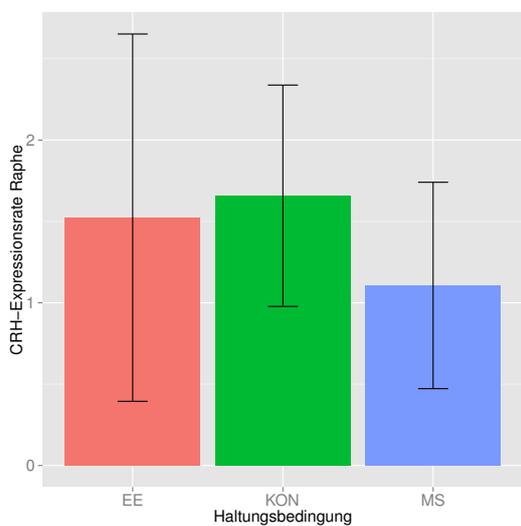
(b) Frontalcortex



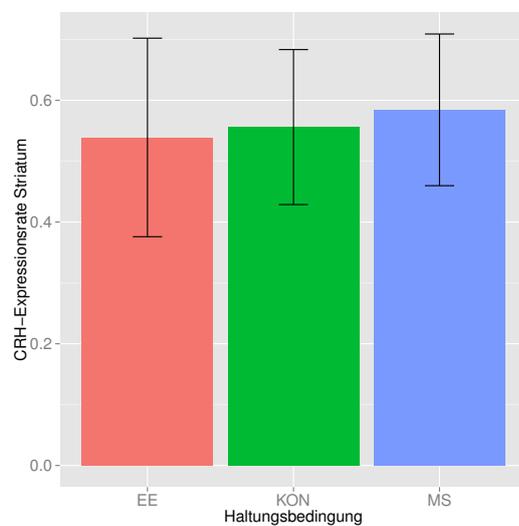
(c) Hippocampus



(d) Hypothalamus



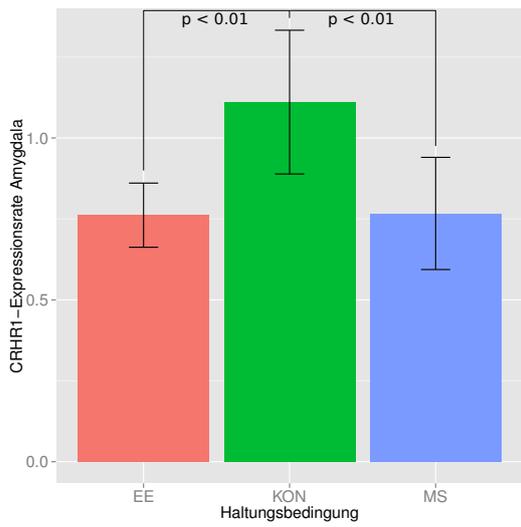
(e) Dorsale Nuclei raphe



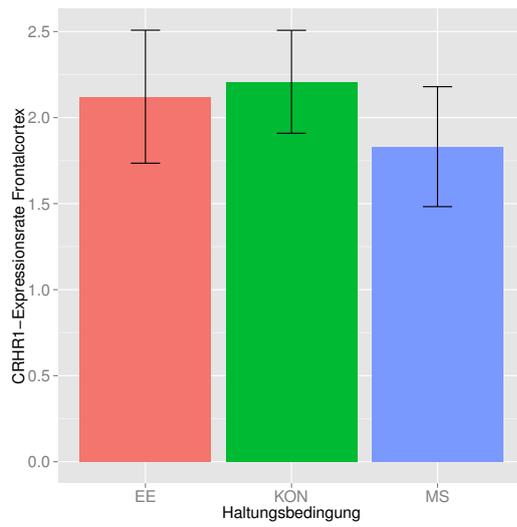
(f) Striatum

Abbildung 21: *CRH*-Expressionsraten in den untersuchten Regionen.

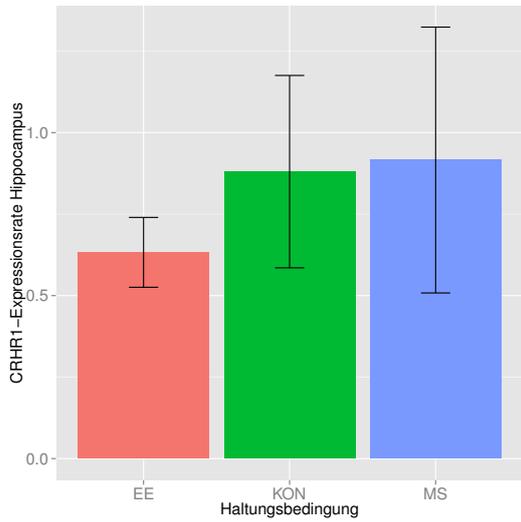




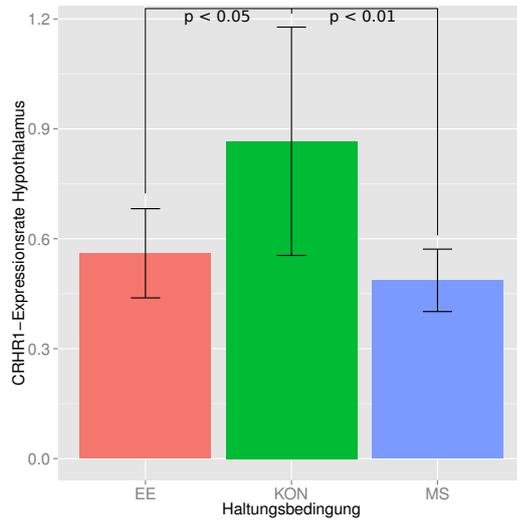
(a) Amygdala



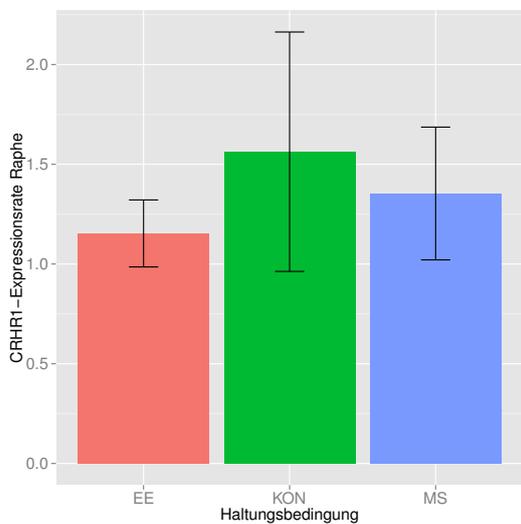
(b) Frontalcortex



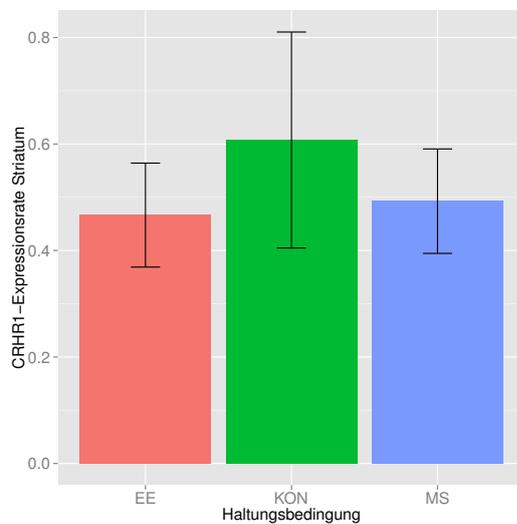
(c) Hippocampus



(d) Hypothalamus

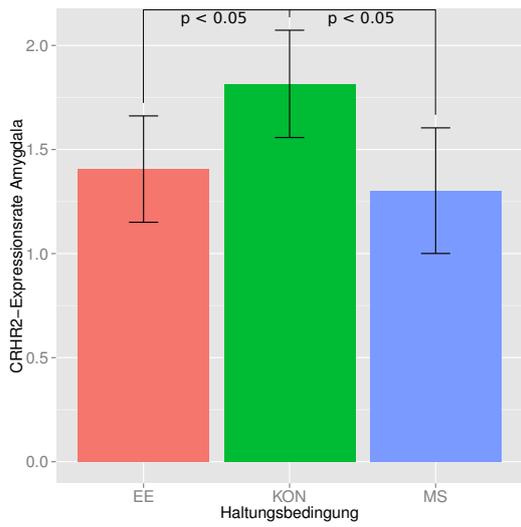


(e) Dorsale Nuclei raphe

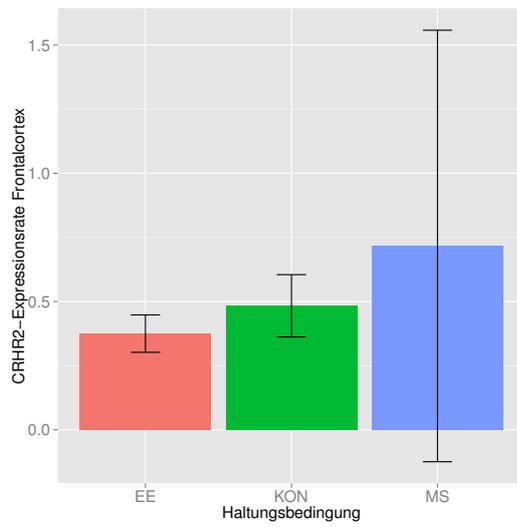


(f) Striatum

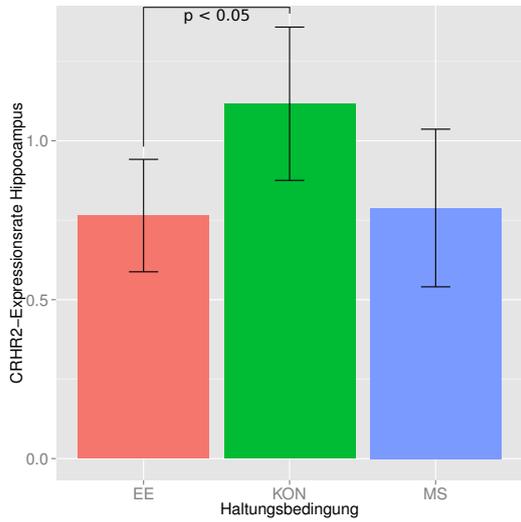
Abbildung 22: *CRHR1*-Expressionsraten in den untersuchten Regionen.



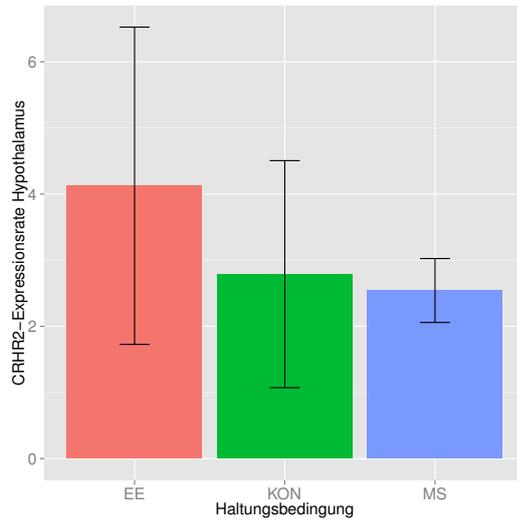
(a) Amygdala



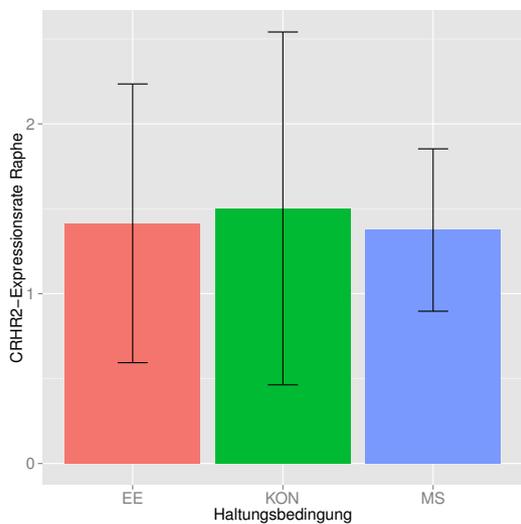
(b) Frontalcortex



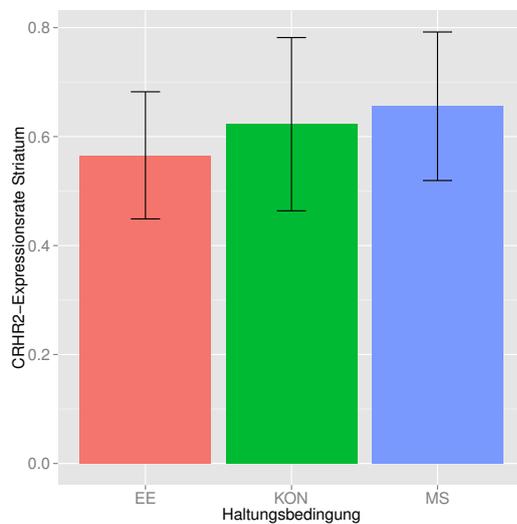
(c) Hippocampus



(d) Hypothalamus



(e) Dorsale Nuclei raphe



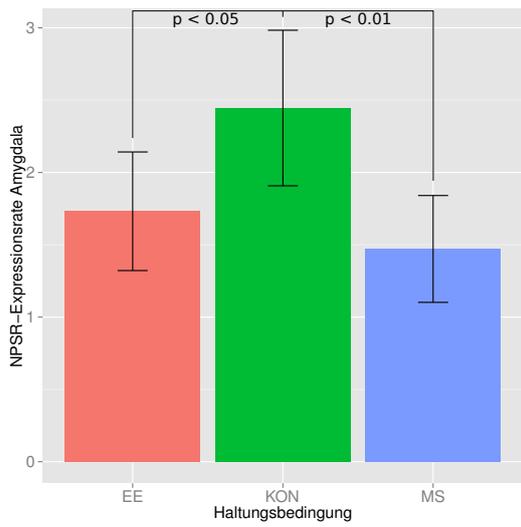
(f) Striatum

Abbildung 23: *CRHR2*-Expressionsraten in den untersuchten Regionen.

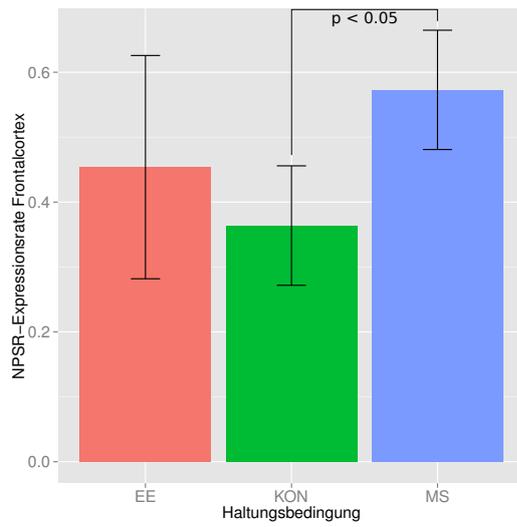
Region	KON	MS	EE
FC	8	9	8
AM	7	8	7
NR	6	9	7
ST	10	9	9
HY	6	8	8
HI	10	10	8

Tabelle 2: Verteilung der Samples für die *NPSR1*-Expressionsanalyse.

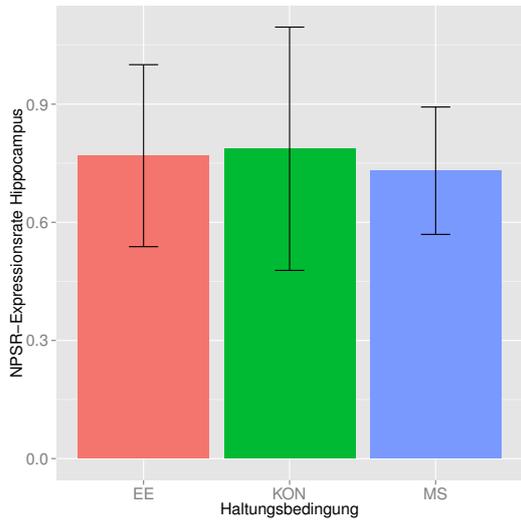
sion des *NPSR1* im Frontalcortex hatte die Haltungsbedingung einen signifikanten Effekt ( $F(2, 22) = 4.162$ ,  $p < 0.05$ ). Auch hier ergab die Post-hoc-Analyse einen signifikanten Unterschied zwischen MS und KON ( $p < 0.05$ ). Ebenso fand sich im Hypothalamus ein signifikanter Effekt ( $F(2, 19) = 4.409$ ,  $p < 0.05$ ); hier bestand der signifikante Unterschied jedoch zwischen EE und KON ( $p < 0.01$ ). Ein signifikanter Effekt der Haltungsbedingung auf die Expression des *NPSR1* fand sich auch in den dorsalen Nuclei raphes nach logarithmischer Transformation der zunächst nicht normalverteilten CNRQ-Werte ( $F(2, 19) = 4.266$ ,  $p < 0.05$ ). Hier ergab die Post-hoc-Analyse einen signifikanten Unterschied wiederum zwischen MS und KON ( $p < 0.05$ ) sowie zwischen EE und MS ( $p < 0.01$ ). Kein signifikanter Effekt konnte in Striatum ( $F(2, 25) = 0.087$ ,  $p > 0.5$ ) und Hippocampus ( $F(2, 25) = 0.075$ ,  $p > 0.5$ ) festgestellt werden. Siehe Tabelle 2 für die numerische Verteilung der Samples und Abbildung 24.



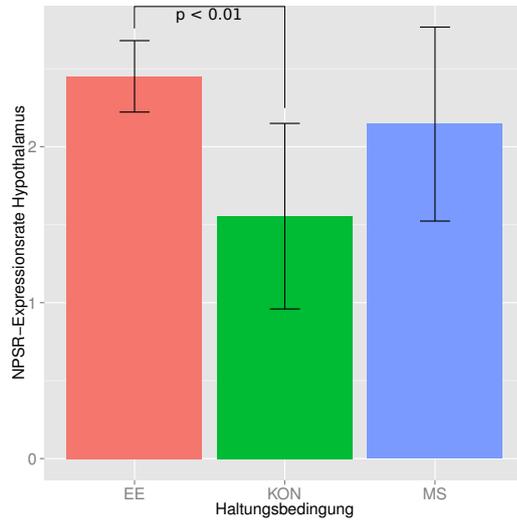
(a) Amygdala



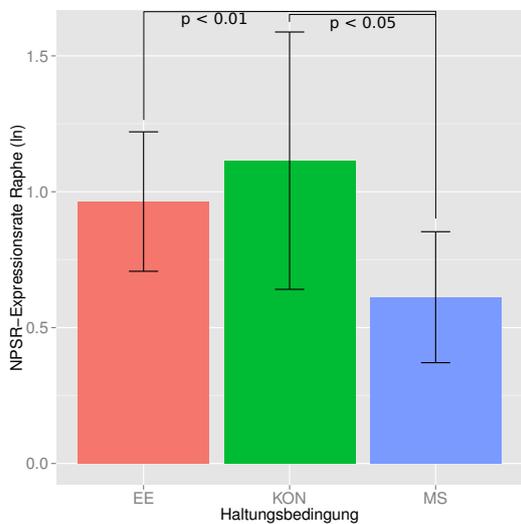
(b) Frontalcortex



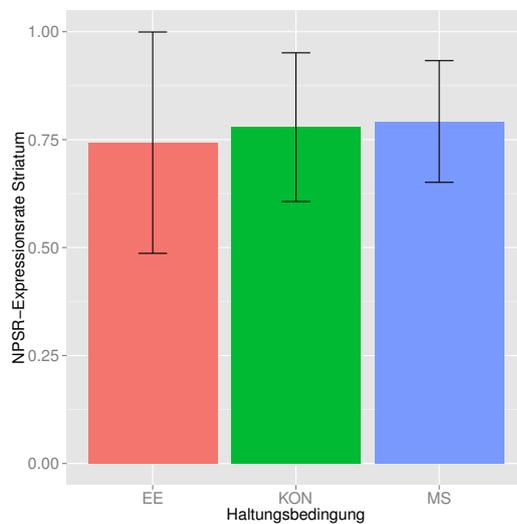
(c) Hippocampus



(d) Hypothalamus



(e) Dorsale Nuclei raphe



(f) Striatum

Abbildung 24: *NPSR1*-Expressionsraten in den untersuchten Regionen.

## 4 Diskussion

Die wesentlichen Resultate zunächst im Überblick:

- Sucrose-Präferenz-Test: EE-Tiere mit signifikant geringerem Sucrose-Konsum als MS- und KON-Tiere im ersten Test; signifikant geringere Sucrose-Konsum/Sucrose-Präferenz der EE-Tiere als der KON-Tiere, nicht jedoch der MS-Tiere im zweiten Test
- Open Field: Weibliche EE-Tiere mit signifikant geringerer Gesamtstrecke / weniger Eintritten in zentralen Bereich / kürzerer Aufenthaltsdauer im zentralen Bereich
- Barnes Maze: EE-Tiere benötigen signifikant weniger Zeit um in die Escape-Box zu „entkommen“
- *CRH*-Expressionsrate (Amygdala) in EE- und MS-Tieren signifikant geringer als in Tieren der Standardhaltungsgruppe
- *CRH*-Expressionsrate (Frontalcortex) in EE-Tieren signifikant höher als in MS- und KON-Tieren
- *CRHR1*-Expressionsrate (Amygdala und Hypothalamus) in EE- und MS-Tieren signifikant geringer als in Tieren der Standardhaltungsgruppe
- *CRHR2*-Expressionsrate (Amygdala) in EE- und MS-Tieren signifikant geringer als in Tieren der Standardhaltungsgruppe
- Keine Auswirkungen der Haltungsbedingung auf das NPY-System
- *NPSR1*-Expressionsrate (Amygdala) in EE- und MS-Tieren signifikant geringer als in Tieren der Standardhaltungsgruppe
- *NPSR1*-Expressionsrate (Frontalcortex) in MS-Tieren signifikant höher als in Tieren der Standardhaltungsgruppe
- *NPSR1*-Expressionsrate (Hypothalamus) in EE-Tieren signifikant höher als in Tieren der Standardhaltungsgruppe
- *NPSR1*-Expressionsrate (dorsale Nuclei raphes) in MS-Tieren signifikant geringer als in EE- und KON-Tieren

Die Ergebnisse der Phänotypisierungstests zeichnen im Einzelnen folgendes Bild: Einerseits weist die Analyse der Sucrose-Präferenz-Tests mit (geschlechterübergreifend) signifikant geringerem Sucrose-Konsum der EE-Tiere als der MS- und KON-Tiere im ersten Test (Abb. 6a) sowie signifikant geringerem Sucrose-Konsum/Sucrose-Präferenz der EE-Tiere als der KON-Tiere, nicht jedoch der MS-Tiere im zweiten Test (Abb. 6b, d), auf einen negativen Effekt von EE auf Anhedonie und Depressivität hin. Dies steht in Übereinstimmung mit bisherigen Studien (z.B. Llorens-Martín et al., 2007; Xu et al., 2009). Andererseits fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Haltungsbedingungen MS und KON. Diese Resultate sind insofern bemerkenswert, da ein signifikanter Unterschied zwischen EE und MS im ersten Sucrose-Präferenz-Test im zweiten Test (nach den sonstigen Verhaltenstestungen) nicht mehr besteht. Dies mag als Hinweis darauf gelten, dass die durch aversivere frühkindliche Haltungsbedingungen auf widrigere Umweltbedingungen „programmierten“ MS-Tiere zum Zeitpunkt des ersten Tests schlicht „unterfordert“ waren und erst durch die weiteren Verhaltenstests adäquat stimuliert wurden. Weiterhin scheinen Standardhaltungsbedingungen die Bedürfnisse der Tiere grundsätzlich am wenigsten zu befriedigen.

Die Analyse der EPM-Tests lässt hingegen keinen klaren Schluss zu. Zwar legten die EE-Tiere eine signifikant längere Strecke in den geschlossenen Armen des EPM zurück als die MS-Tiere (Abb. 7e), jedoch fanden sich in anderen wesentlichen Punkten (Aufenthaltszeiten, Eintritte/Wiedereintritte in offene/geschlossene Arme) keine signifikanten Unterschiede. Den genannten signifikanten Unterschied als Indikator für höhere Ängstlichkeit der EE-Tiere zu werten, ginge also vermutlich zu weit, insbesondere, da eine möglicherweise etwas höhere Geschwindigkeit der EE-Tiere – wie sie im BM (s.u.) festgestellt werden konnte – eine naheliegendere Erklärungsoption wäre. Auch konnten bisherige Untersuchungen eine verminderte Ängstlichkeit von EE-Versuchstieren im EPM zeigen (z.B. Galani et al., 2007; Chapillon et al., 1999). Hinsichtlich der Effekte von MS auf das Verhalten von Mäusen verschiedener Stämme im EPM kommen frühere Studien zu widersprüchlichen Ergebnissen (z.B. Romeo et al., 2003; Fabricius et al., 2008). An männlichen Cd1-Mäusen konnte jedoch ein verstärktes Explorationsverhalten im EPM nach MS gezeigt werden (Venerosi et al., 2003). Sollte der genannten Auffälligkeit (Strecke in den geschlossenen Armen) tatsächlich eine vermehrte Ängstlichkeit der EE-Tiere entsprechen, so wäre dies durchaus überraschend. Die weniger ängstlichen Tiere der Gruppen MS und KON wären dann – bei objektiv aversiveren frühkindlichen Umweltbedingungen – möglicherweise als resilienter anzusehen als die Tiere der Gruppe EE.

Die analysierende Betrachtung der OF-Tests lässt den Schluss zu, dass sich die unterschiedlichen Haltungsbedingungen hier lediglich auf das Verhalten der weiblichen, nicht jedoch der männlichen Versuchstiere auswirken. In diesem Sinne legten die weiblichen EE-Tiere im OF eine signifikant geringere Gesamtstrecke zurück (Abb. 10a) und traten dabei signifikant seltener in den zentralen Bereich ein als die weiblichen KON-Tiere (Abb. 10b). Weiterhin bewerkstelligten sie dabei eine signifikant geringere Strecke (Abb. 10c) und verbrachten signifikant weniger Zeit im zentralen Bereich des OF als weibliche KON- und MS-Tiere (Abb. 10d). Dies lässt den Schluss zu, dass sich EE negativ auf das Explorationsverhalten und positiv auf die Ängstlichkeit von weiblichen Cd1-Mäusen auswirken kann. Die Schlussfolgerung wird jedoch durch das extreme Verhalten eines weiblichen EE-Tiers (keine Eintritte in den zentralen Bereich, geringe Lokomotion) begünstigt und in ihrer Aussagekraft eingeschränkt (siehe 3.1.4.). Die hier gewonnenen Erkenntnisse stehen im Widerspruch zu früheren Studien, welche (geschlechterübergreifend) einen positiven Effekt von EE auf das Explorationsverhalten von Mäusen im OF nachweisen konnten (z.B. Kazlauckas et al., 2011; Kobilko et al., 2011). Es konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen MS und KON gefunden werden. Auch bisherige Untersuchungen kommen hinsichtlich der Konsequenzen von MS auf das Verhalten von Mäusen verschiedener Stämme im OF zu widersprüchlichen Ergebnissen (z.B. Romeo et al., 2003; Savignac et al., 2011). Auch die Resultate des OF sind also durchaus bemerkenswert. Schließlich können sie als Hinweis darauf gelten, dass die weiblichen Versuchstiere der Gruppen MS und insbesondere KON weniger ängstlich und somit möglicherweise resilienter als die weiblichen EE-Tiere sind.

Die Analyse der BM-Daten weist – in Übereinstimmung mit früheren Studien (z.B. Leggio et al., 2005; Huang et al., 2007) – grundsätzlich auf ein besseres Lernvermögen und räumliches Gedächtnis der EE-Tiere hin. An nahezu allen Testtagen (außer Tag 3) benötigten diese Tiere signifikant weniger Zeit um in die Escape-Box zu „entkommen“ als die Tiere der Gruppe MS, an den Tagen 1, 4 und 5 außerdem auch als die Tiere der Standardhaltungsgruppe (Abb. 13a, 14a, b, 15a). Allerdings agierten die EE-Tiere an den Tagen 1, 4 und 5 mit einer signifikant höheren Geschwindigkeit als die MS-Tiere und als die Tiere der Standardhaltungsgruppe (Abb. 13b, 14c, 15b). Es ist deshalb nicht grundsätzlich auszuschließen, dass sich die Tiere der drei Haltungsgruppen zum Finden der Escape-Box der selben – beispielsweise seriellen – Suchstrategie bedienen, was – von den EE-Tieren mit höherer Geschwindigkeit vollzogen – zu besseren Resultaten dieser Gruppe führte. Allerdings legten die EE-Tiere an Tag 4 und 5 zum Erreichen des Ziels eine signifikant kürzere Strecke zurück als die Tiere der Standardhaltungsgruppe (Abb. 14d, 15c), was die im letzten Satz

aufgestellte Hypothese zumindest nicht stützt. Zwischen den Gruppen MS und KON konnten – in Übereinstimmung mit bisherigen Untersuchungen an Versuchstieren anderer Mausstämmen (z.B. Fabricius et al., 2008) – keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Keine signifikanten Effekte von Haltungsbedingungen und/oder Geschlecht fanden sich bei der Analyse der LDB-Tests. Klare Auswirkungen auf die Ängstlichkeit der Tiere scheinen die jeweiligen Haltungsbedingungen also nicht zu haben. Dies steht in Übereinstimmung mit einer früheren Arbeit, in welcher keine Effekte von MS auf das Verhalten von Versuchstieren diverser Mausstämmen in der LDB gefunden werden konnten (Millstein und Holmes, 2007).

In den Amygdalae der EE- und MS-Tiere konnte eine signifikant geringere Expressionsrate des *CRH* detektiert werden als in den Amygdalae der Standardhaltungsgruppe (Abb. 21a). Zwischen den Gruppen EE und MS fand sich hingegen kein signifikanter Unterschied. CRH wird in den Amygdalae im Rahmen der Stressantwort freigesetzt (Gray und Bingaman, 1996). Möglicherweise ist das hier gefundene Ergebnis also Ausdruck einer besseren Stressresilienz der Tiere der Haltungsgruppen EE und MS, die auf den akuten Stress der Manipulationen vor Dekapitation (siehe 2.4.1) mit einer geringeren Aktivierung des Stress-Systems reagieren. Der nicht-signifikante Unterschied zwischen EE und MS ist insofern bemerkenswert, da diese Haltungsbedingungen – trotz ihrer objektiv unterschiedlichen Aversivität – im vorliegenden Fall offenbar in gleichem Maße Stress-Resilienz fördern. Allerdings scheint dies nicht grundsätzlich der Fall zu sein, wie der gefundene signifikante Unterschied der *CRH*-Expressionsrate zwischen EE und MS im Frontalcortex zeigt (Abb. 21b).

Die Anxiogenität des CRH wird durch *CRHR1* vermittelt (Contarino et al. 1999; Müller und Wurst, 2004). Im vorliegenden Fall konnte eine signifikant geringere Expressionsrate des *CRHR1* in den Amygdalae und in Hypothalamus von MS- und EE-Tieren als von KON-Tieren festgestellt werden (Abb. 22a, d). Wiederum fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen EE und MS. Beides weist grundsätzlich auf eine signifikant bessere Stressresilienz der Tiere der Haltungsgruppen EE und MS als der Tiere der Standardhaltungsgruppe hin. Im Falle der MS-Tiere steht dies im Widerspruch zu früheren Studien, welche einen positiven Effekt von MS auf die Expressionsrate des *CRHR1* in Hypothalamus bzw. Amygdalae zeigen konnten (z.B. O'Malley et al., 2011).

Die Bedeutung des *CRHR2* ist weniger klar (Carrasco und Van de Kar, 2003; siehe 1.1). Im vorliegenden Fall konnte wiederum eine signifikant geringere Expressionsrate des *CRHR2* in den Amygdalae von MS- und EE-Tieren als von KON-Tieren festgestellt werden (Abb. 23a). Außerdem fand sich eine signifikant geringere Expres-

sionsrate in EE- als KON-Tieren im Hippocampus (Abb. 23c). Die Interpretation dieser Resultate fällt auf Grund der unklaren Bedeutung des *CRHR2* schwer. Falls der *CRHR2* jedoch anxiolytische Eigenschaften haben sollte (wie die Erkenntnisse von z.B. Kishimoto et al. (2000) nahelegen), so könnte die geringere Expression des *CRHR2* die o.g. geringere Expression des *CRHR1* hinsichtlich der jeweiligen Konsequenzen ausgleichen.

Weiterhin konnten – im Widerspruch zu früheren Untersuchungen an Ratten (z.B. Jiménez-Vasquez et al., 2001) – keine Auswirkungen der Haltungsbedingung auf das NPY-System gefunden werden. Dies deckt sich mit den nicht-signifikanten Unterschieden der Körpergewichte an den drei Messtagen, da das NPY vor allem als potentes Orexigen angesehen wird (Redrobe et al., 2002).

Das NPS gilt als potentes Anxiolytikum (Xu et al., 2004). Dementsprechend können die Expressionsraten des *NPSR1* die grundsätzliche Ängstlichkeit von Versuchstieren mitbestimmen. Im vorliegenden Fall konnte eine signifikant geringere Expressionsrate des *NPSR1* in den Amygdalae von MS- und EE-Tieren als von KON-Tieren festgestellt werden (Abb. 24a). Weiterhin fanden sich signifikante Unterschiede in Frontalcortex (MS > KON, Abb. 24b) und Hypothalamus (EE > KON, Abb. 24d). In den dorsalen Nuclei raphes konnte eine signifikant geringere Expressionsrate des *NPSR1* in MS-Tieren als EE- und KON-Tieren detektiert werden (Abb. 24e). Da die exakte Physiologie des NPS-Systems nur unzureichend aufgeklärt ist, fällt eine Interpretation dieser Resultate schwer. Jedoch mag die signifikant geringere Expressionsrate des *NPSR1* in den Amygdalae von MS- und EE-Tieren zumindest als Hinweis auf eine geringere Ängstlichkeit dieser Tiere gelten. Interessant ist hierbei wiederum, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen EE und MS bestehen. Die entsprechenden Haltungsbedingungen scheinen sich also in diesem Fall - obwohl objektiv unterschiedlich aversiv - im Wesentlichen gleichsinnig auf das NPS-System auszuwirken.

Da also diverse signifikante Unterschiede der Expressionsraten von CRH-System und *NPSR1* zwischen den drei Haltungsgruppen gefunden werden konnten, darf ein Effekt der Haltungsbedingung auf die Neurobiologie der Versuchstiere entsprechend einer frühkindlichen „Programmierung“ (s.o.) angenommen werden. Dies unterstreicht auch die Bedeutung der Haltungsbedingung für Tierversuche allgemein. Jedoch fanden sich bei der Auswertung der Verhaltenstests – abgesehen von mittels BM detektierten besserem Lernvermögen und räumlichem Gedächtnis der EE-Tiere – kein klares Korrelat bzw. widersprüchliche Ergebnisse. Die Aussagekraft dieser Erkenntnis wird einerseits durch die deutlich verschiedenen Lebensalter der Tiere bei Dekapitation/Gehirnentnahme bzw. Verhaltenstestungen eingeschränkt und könn-

te andererseits auf verschiedene Spezifika der Methodik zurückzuführen sein. Zum einen wurden in der Haltungsgruppe EE Käfige der selben Größe wie in den Gruppen MS und KON eingesetzt. Da die Auswirkungen von EE in bedeutendem Umfang auf eine durch Käfiggröße verstärkte Lokomotion der Versuchstiere zurückzuführen sein könnten (van Praag et al., 2000; Kobilko et al., 2011), mag dies die Effekte von EE eingeschränkt haben. Andererseits wurden vor dem Absetzen der Tiere aller Gruppen, also auch der MS-Tiere während der MS-Phase, jeweils zwei Muttertiere mit Nachkommenschaft pro Käfig gehalten. Da sich MS und maternales Fürsorgeverhalten entgegengesetzt auf die Nachkommen auszuwirken scheinen (Macrì et al., 2008), könnte sich die Anwesenheit zweier Muttertiere und ein damit unter Umständen verstärktes/verlängertes maternales Fürsorgeverhalten „positiv“ – im Sinne einer Abschwächung der MS-Folgen – auf die Nachkommenschaft ausgewirkt haben. Ferner kann bei einer Haltung der Versuchstiere in Zweiergruppen von einem Einfluss der sozialen Interaktion auf die CRH-Systeme der Tiere ausgegangen werden (DeVries et al., 2003). Es darf angenommen werden, dass entsprechende Modifikationen der Methodik zu deutlicheren Ergebnissen, insbesondere der Phänotypisierung, geführt hätten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich unterschiedlich aversive Haltungsbedingungen auf die Stress-Resilienz durchaus auswirken können. Dies konnte im vorliegenden Fall mittels Genexpressionsanalysen hierfür relevanter Hormonsysteme gezeigt werden. Natürlich ist die Übertragbarkeit dieser Resultate auf den Menschen aus verschiedenen Gründen beschränkt. Jedoch kann davon ausgegangen werden, dass eine entsprechende frühkindliche „Programmierung“ auch im Menschen möglich ist. Weitere Forschungsbemühungen, welche Präventionsstrategien für den Menschen begründen könnten, sind auf diesem Gebiet also unbedingt erforderlich.

## 5 Zusammenfassung

In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Umweltbedingungen im frühen Lebensalter einerseits die Entwicklung von Resilienz, d.h. Widerstandsfähigkeit gegenüber Stressoren, andererseits aber auch die Entwicklung physischer und psychischer Erkrankungen im weiteren Lebensverlauf beeinflussen können (McCaughey et al., 1997; Heim und Nemeroff, 1999; Nemeroff, 2004; Susman, 2006). Dabei wird angenommen, dass sich sowohl dezidiert positive als auch in Maßen aversive Umweltbedingungen mit rezidivierender Stressbelastung günstig auf die Resilienz im späteren Leben auswirken können. Auf neurobiologischer Ebene scheinen dabei das CRH und seine Rezeptoren (CRHR1 und CRHR2), das NPY-System sowie das NPS-System (insbesondere NPS-Rezeptor) eine besondere Rolle zu spielen. Jedoch sind die exakten Zusammenhänge und neurobiologischen Grundlagen weiterhin nur unzureichend aufgeklärt. Dies ist insbesondere insofern bedauernd, da weiterer Erkenntnisgewinn auf diesem Gebiet möglicherweise Präventionsstrategien und Therapieoptionen für den Menschen begründen könnte. Um die Auswirkung der Umweltbedingungen im frühkindlichen Lebensalter auf die Resilienz im späteren Leben weiter aufzuklären, wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 310 Cd1-Mäuse den Haltungsbedingungen „Environmental Enrichment“ (EE, Stimulation durch Spielobjekte) und „Maternal separation“ (MS, wiederholte Stressbelastung durch Separation der Nachkommen vom Muttertier) sowie Standardhaltungsbedingungen unterworfen. Insgesamt 31 männlichen Tieren wurde im Alter von vier Wochen die Gehirne entnommen und aus diesen jeweils die Regionen Frontalcortex, Striatum, Nucleus accumbens, Hippocampus, Amygdala, dorsale Nuclei raphes und Hypothalamus herauspräpariert. Aus den gewonnenen Proben wurde RNA extrahiert, hieraus cDNA synthetisiert und abschließend – nach Ausschluss von Kontamination und Integritätsprüfung – die Expressionsraten der untersuchten Gene mittels RT-qPCR quantifiziert. Um auch verhaltensbiologische Konsequenzen der unterschiedlichen Haltungsbedingungen zu erfassen, wurden außerdem 30 weibliche sowie 30 männliche Tiere im weiteren Lebensverlauf verschiedenen Verhaltenstests zugeführt. In den Sucrose-Präferenz-Tests zeigten sich Effekte der Haltungsbedingung auf Sucrose-Konsum und -Präferenz mit signifikant geringeren Werten der Haltungsgruppe EE. Bei der Auswertung der Openfield-Tests fanden sich Gruppen-Geschlechter-Interaktionseffekte mit signifikant geringeren Werten (Gesamtstrecke, Strecke und Aufenthaltsdauer im zentralen Bereich, Eintritte in den zentralen Bereich) der weiblichen EE-Tiere. In den Barnes Maze-Tests benötigten die Tiere der Haltungsgruppe EE an den meisten Testtagen signifikant weniger Zeit, um in die Escape-Box zu „entkommen“. Auf neurobiologischer Ebene fanden sich signi-

fikante Unterschiede der *CRH*-Expressionsraten in Amygdalae und Frontalcortex, der *CRHR1*-Expressionsraten in Amygdalae und Hypothalamus sowie der *CRHR2*-Expressionsraten in Amygdalae und Hippocampus. Demgegenüber konnte kein signifikanter Effekt der Haltungsbedingung auf das NPY-System gefunden werden. Jedoch ließen sich signifikante Unterschiede der *NPSR1*-Expressionsraten in Amygdalae, Frontalcortex, dorsalen Nuclei raphes und Hypothalamus feststellen. Es kann also grundsätzlich von Auswirkungen unterschiedlich aversiver Haltungsbedingungen auf die Stress-Resilienz von Versuchstieren ausgegangen werden. Dies ist einerseits für Tierversuche allgemein von grundsätzlicher Bedeutung. Andererseits legen die Resultate eine entsprechende frühkindliche „Programmierung“ auch im Menschen nahe.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aisa** B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. *Neuroscience*. 2008 Jul 17;154(4):1218-26.
- Albers** HE, Ottenweller JE, Liou SY, Lumpkin MD, Anderson ER. Neuropeptide Y in the hypothalamus: effect on corticosterone and single-unit activity. *Am J Physiol*. 1990 Feb;258(2 Pt 2):R376-82.
- Auer** H, Lyianarachchi S, Newsom D, Klisovic MI, Marcucci G, Kornacker K. Chipping away at the chip bias: RNA degradation in microarray analysis. *Nat Genet*. 2003 Dec;35(4):292-3.
- Baquedano** E, García-Cáceres C, Diz-Chaves Y, Lagunas N, Calmarza-Font I, Azcoitia I, Garcia-Segura LM, Argente J, Chowen JA, Frago LM. Prenatal stress induces long-term effects in cell turnover in the hippocampus-hypothalamus-pituitary axis in adult male rats. *PLoS One*. 2011;6(11):e27549.
- Beck** B, Fernet B, Stricker-Krongrad A. Peptide S is a novel potent inhibitor of voluntary and fast-induced food intake in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Jul 8;332(3):859-65.
- Bengel** D, Jöhren O, Andrews AM, Heils A, Mössner R, Sanvitto GL, Saavedra JM, Lesch KP, Murphy DL. Cellular localization and expression of the serotonin transporter in mouse brain. *Brain Res*. 1997 Dec 19;778(2):338-45.
- Bertram** CE, Hanson MA. Prenatal programming of postnatal endocrine responses by glucocorticoids. *Reproduction*. 2002 Oct;124(4):459-67.
- Bethge** M, Müller-Fahrnow W, Radoschewski FM. The Relation between Psychosocial Stress and the Reduction of Work Ability – Results of the Socio-Medical Labor Force Panel. *Zeitschrift "Deutsche Rentenversicherung" Ausgabe 3/2008*.
- Branchi** I, D'Andrea I, Sietzema J, Fiore M, Di Fausto V, Aloe L, Alleva E. Early social enrichment augments adult hippocampal BDNF levels and survival of BrdU-positive cells while increasing anxiety- and "depression"-like behavior. *J Neurosci Res*. 2006 May 1;83(6):965-73.
- Brenes** JC, Rodríguez O, Fornaguera J. Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and

serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008 Mar;89(1):85-93.

**Brenes** JC, Fornaguera J. Effects of environmental enrichment and social isolation on sucrose consumption and preference: associations with depressive-like behavior and ventral striatum dopamine. *Neurosci Lett.* 2008 May 9;436(2):278-82.

**Bustin** SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009 Apr;55(4):611-22.

**Callahan** LB, Tschetter KE, Ronan PJ. Inhibition of corticotropin releasing factor expression in the central nucleus of the amygdala attenuates stress-induced behavioral and endocrine responses. *Front Neurosci.* 2013 Oct 29;7:195.

**Canteras** NS. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002 Mar;71(3):481-91.

**Carola** V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res.* 2002 Aug 21;134(1-2):49-57.

**Carrasco** GA, Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol.* 2003 Feb 28;463(1-3):235-72.

**Carvajal** C, Dumont Y, Herzog H, Quirion R. Emotional behavior in aged neuropeptide Y (NPY) Y2 knockout mice. *J Mol Neurosci.* 2006;28(3):239-45.

**Chapillon** P, Manneché C, Belzung C, Caston J. Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. *Behav Genet.* 1999 Jan;29(1):41-6.

**Christie** BR, Eadie BD, Kannangara TS, Robillard JM, Shin J, Titterness AK. Exercising our brains: how physical activity impacts synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Neuromolecular Med.* 2008;10(2):47-58.

**Clark** SD, Duangdao DM, Schulz S, Zhang L, Liu X, Xu YL, Reinscheid RK. Anatomical characterization of the neuropeptide S system in the mouse brain by in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Comp Neurol.* 2011 Jul 1;519(10):1867-93.

- Cohen** H, Liu T, Kozlovsky N, Kaplan Z, Zohar J, Mathé AA. The neuropeptide Y (NPY)-ergic system is associated with behavioral resilience to stress exposure in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2012 Jan;37(2):350-63.
- Contarino** A, Heinrichs SC, Gold LH. Understanding corticotropin releasing factor neurobiology: contributions from mutant mice. *Neuropeptides*. 1999 Feb;33(1):1-12.
- Crawley** J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav*. 1980 Aug;13(2):167-70.
- Darnaudéry** M, Maccari S. Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain Res Rev*. 2008 Mar;57(2):571-85.
- Deak** T, Nguyen KT, Ehrlich AL, Watkins LR, Spencer RL, Maier SF, Licinio J, Wong ML, Chrousos GP, Webster E, Gold PW. The impact of the nonpeptide corticotropin-releasing hormone antagonist antalarmin on behavioral and endocrine responses to stress. *Endocrinology*. 1999 Jan;140(1):79-86.
- Del Arco** A, Segovia G, Canales JJ, Garrido P, de Blas M, García-Verdugo JM, Mora F. Environmental enrichment reduces the function of D1 dopamine receptors in the prefrontal cortex of the rat. *J Neural Transm*. 2007 Jan;114(1):43-8.
- Del Arco** A, Segovia G, Garrido P, de Blas M, Mora F. Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats. *Behav Brain Res*. 2007 Jan 25;176(2):267-73.
- Denisov** V, Strong W, Walder M, Gingrich J, Wintz H. Development and Validation of RQI: An RNA Quality Indicator for the Experion™ Automated Electrophoresis System. © 2008 Bio-Rad Laboratories, Inc. Bulletin 5761.
- DeVries** AC, Glasper ER, Detillion CE. Social modulation of stress responses. *Physiol Behav*. 2003 Aug;79(3):399-407.
- Domschke** K, Reif A, Weber H, Richter J, Hohoff C, Ohrmann P, Pedersen A, Bauer J, Suslow T, Kugel H, Heindel W, Baumann C, Klauke B, Jacob C, Maier W, Fritze J, Bandelow B, Krakowitzky P, Rothermundt M, Erhardt A, Binder EB, Holsboer F, Gerlach AL, Kircher T, Lang T, Alpers GW, Ströhle

A, Fehm L, Gloster AT, Wittchen HU, Arolt V, Pauli P, Hamm A, Deckert J. Neuropeptide S receptor gene converging evidence for a role in panic disorder. *Mol Psychiatry*. 2011 Sep;16(9):938-48.

**Dube** MG, Sahu A, Kalra PS, Kalra SP. Neuropeptide Y release is elevated from the microdissected paraventricular nucleus of food-deprived rats: an in vitro study. *Endocrinology*. 1992 Aug;131(2):684-8.

**Duman** CH, Schlesinger L, Russell DS, Duman RS. Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice. *Brain Res*. 2008 Mar 14;1199:148-58.

**El Rawas** R, Thiriet N, Nader J, Lardeux V, Jaber M, Solinas M. Early exposure to environmental enrichment alters the expression of genes of the endocannabinoid system. *Brain Res*. 2011 May 16;1390:80-9.

**Fabricius** K, Wörtwein G, Pakkenberg B. The impact of maternal separation on adult mouse behaviour and on the total neuron number in the mouse hippocampus. *Brain Struct Funct*. 2008 Feb;212(5):403-16.

**Fernández Espejo** E. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. *Behav Brain Res*. 1997 Jun;86(1):105-12.

**Ferragud** A, Haro A, Sylvain A, Velázquez-Sánchez C, Hernández-Rabaza V, Canales JJ. Enhanced habit-based learning and decreased neurogenesis in the adult hippocampus in a murine model of chronic social stress. *Behav Brain Res*. 2010 Jun 26;210(1):134-9.

**File** SE, Gonzalez LE, Gallant R. Role of the dorsomedial hypothalamus in mediating the response to benzodiazepines on trial 2 in the elevated plus-maze test of anxiety. *Neuropsychopharmacology*. 1999 Aug;21(2):312-20.

**File** SE. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res*. 2001 Nov 1;125(1-2):151-7.

**Fleige** S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med*. 2006 Apr-Jun;27(2-3):126-39.

**Fleige** S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett*. 2006 Oct;28(19):1601-13.

- Fox** GB, Fan L, LeVasseur RA, Faden AI. Effect of traumatic brain injury on mouse spatial and nonspatial learning in the Barnes circular maze. *J Neurotrauma*. 1998 Dec;15(12):1037-46.
- Fox** C, Merali Z, Harrison C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behav Brain Res*. 2006 Nov 25;175(1):1-8.
- Galani** R, Berthel MC, Lazarus C, Majchrzak M, Barbelivien A, Kelche C, Cassel JC. The behavioral effects of enriched housing are not altered by serotonin depletion but enrichment alters hippocampal neurochemistry. *Neurobiol Learn Mem*. 2007 Jul;88(1):1-10.
- Gallagher** SR, Desjardins PR. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Curr Protoc Mol Biol*. 2006 Nov;Appendix 3:Appendix 3D.
- Gardella** E, Romei C, Cavallero A, Trapella C, Fedele E, Raiteri L. Neuropeptide S inhibits release of 5-HT and glycine in mouse amygdala and frontal/prefrontal cortex through activation of the neuropeptide S receptor. *Neurochem Int*. 2013 Mar;62(4):360-6.
- Gelfo** F, De Bartolo P, Tirassa P, Croce N, Caltagirone C, Petrosini L, Angelucci F. Intraperitoneal injection of neuropeptide Y (NPY) alters neurotrophin rat hypothalamic levels: Implications for NPY potential role in stress-related disorders. *Peptides*. 2011 Jun;32(6):1320-3.
- Givalois** L, Naert G, Rage F, Ixart G, Arancibia S, Tapia-Arancibia L. A single brain-derived neurotrophic factor injection modifies hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis activity in adult male rats. *Mol Cell Neurosci*. 2004 Nov;27(3):280-95.
- Gould** E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 17;95(6):3168-71.
- Gray** TS, Bingaman EW. The amygdala: corticotropin-releasing factor, steroids, and stress. *Crit Rev Neurobiol*. 1996;10(2):155-68.
- Gubernick** DJ, Alberts JR. Maternal licking of young: resource exchange and proximate controls. *Physiol Behav*. 1983 Nov;31(5):593-601.

- Han** RW, Yin XQ, Chang M, Peng YL, Li W, Wang R. Neuropeptide S facilitates spatial memory and mitigates spatial memory impairment induced by N-methyl-D-aspartate receptor antagonist in mice. *Neurosci Lett*. 2009 May 8;455(1):74-7.
- Harrison** FE, Reiserer RS, Tomarken AJ, McDonald MP. Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learn Mem*. 2006 Nov-Dec;13(6):809-19.
- Hascoët** M, Bourin M, Nic Dhonnchadha BA. The mouse light-dark paradigm: a review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2001 Jan;25(1):141-66.
- Hashimoto** H, Onishi H, Koide S, Kai T, Yamagami S. Plasma neuropeptide Y in patients with major depressive disorder. *Neurosci Lett*. 1996 Sep 20;216(1):57-60.
- He** S, Ma J, Liu N, Yu X. Early enriched environment promotes neonatal GABAergic neurotransmission and accelerates synapse maturation. *J Neurosci*. 2010 Jun 9;30(23):7910-6.
- Heilig** M, Söderpalm B, Engel JA, Widerlöv E. Centrally administered neuropeptide Y (NPY) produces anxiolytic-like effects in animal anxiety models. *Psychopharmacology (Berl)*. 1989;98(4):524-9.
- Heilig** M, McLeod S, Brot M, Heinrichs SC, Menzaghi F, Koob GF, Britton KT. Anxiolytic-like action of neuropeptide Y: mediation by Y1 receptors in amygdala, and dissociation from food intake effects. *Neuropsychopharmacology*. 1993 Jun;8(4):357-63.
- Heilig** M. The NPY system in stress, anxiety and depression. *Neuropeptides*. 2004 Aug;38(4):213-24.
- Heim** C, Nemeroff CB. The impact of early adverse experiences on brain systems involved in the pathophysiology of anxiety and affective disorders. *Biol Psychiatry*. 1999 Dec 1;46(11):1509-22.
- Heim** C, Newport DJ, Mletzko T, Miller AH, Nemeroff CB. The link between childhood trauma and depression: insights from HPA axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology*. 2008 Jul;33(6):693-710.
- Heinrichs** SC, Menzaghi F, Pich EM, Hauger RL, Koob GF. Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y. *Brain Res*. 1993 May 14;611(1):18-24.

- Hellemans** J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesomepele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 2007;8(2):R19.
- Horii-Hayashi** N, Sasagawa T, Matsunaga W, Matsusue Y, Azuma C, Nishi M. Developmental changes in desensitisation of c-Fos expression induced by repeated maternal separation in pre-weaned mice. *J Neuroendocrinol.* 2013 Feb;25(2):158-67.
- Hou** C, Jia F, Liu Y, Li L. CSF serotonin, 5-hydroxyindolacetic acid and neuropeptide Y levels in severe major depressive disorder. *Brain Res.* 2006 Jun 20;1095(1):154-8.
- Huang** FL, Huang KP, Boucheron C. Long-term enrichment enhances the cognitive behavior of the aging neurogranin null mice without affecting their hippocampal LTP. *Learn Mem.* 2007 Aug 1;14(8):512-9.
- Imbeaud** S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A, Auffray C. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res.* 2005 Mar 30;33(6):e56.
- Ishida** H, Shirayama Y, Iwata M, Katayama S, Yamamoto A, Kawahara R, Nakagome K. Infusion of Neuropeptide Y Into CA3 Region of Hippocampus produces Antidepressant-Like Effect via Y1 Receptor. *Hippocampus.* 2007;17(4):271-80.
- Jiménez-Vasquez** PA, Mathé AA, Thomas JD, Riley EP, Ehlers CL. Early maternal separation alters neuropeptide Y concentrations in selected brain regions in adult rats. *Brain Res Dev Brain Res.* 2001 Nov 26;131(1-2):149-52.
- Joëls** M, Karst H, Alfarez D, Heine VM, Qin Y, van Riel E, Verkuyl M, Lucassen PJ, Krugers HJ. Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. *Stress.* 2004 Dec;7(4):221-31.
- Jüngling** K, Liu X, Lesting J, Coulon P, Sosulina L, Reinscheid RK, Pape HC. Activation of neuropeptide S-expressing neurons in the locus coeruleus by corticotropin-releasing factor. *J Physiol.* 2012 Aug 15;590(Pt 16):3701-17.
- Kalinichev** M, Easterling KW, Plotsky PM, Holtzman SG. 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.* 2002 Aug;73(1):131-40.

- Kapoor** A, Dunn E, Kostaki A, Andrews MH, Matthews SG. Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J Physiol*. 2006 Apr 1;572(Pt 1):31-44.
- Karlsson** RM, Choe JS, Cameron HA, Thorsell A, Crawley JN, Holmes A, Heilig M. The neuropeptide Y Y1 receptor subtype is necessary for the anxiolytic-like effects of neuropeptide Y, but not the antidepressant-like effects of fluoxetine, in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008 Jan;195(4):547-57.
- Kazlauskas** V, Pagnussat N, Mioranza S, Kalinine E, Nunes F, Pettenuzzo L, Souza DO, Portela LV, Porciúncula LO, Lara DR. Enriched environment effects on behavior, memory and BDNF in low and high exploratory mice. *Physiol Behav*. 2011 Mar 28;102(5):475-80.
- Kempermann** G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 1997 Apr 3;386(6624):493-5.
- Kishimoto** T, Radulovic J, Radulovic M, Lin CR, Schrick C, Hooshmand F, Hermanson O, Rosenfeld MG, Spiess J. Deletion of *crhr2* reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet*. 2000 Apr;24(4):415-9.
- Kobilo** T, Liu QR, Gandhi K, Mughal M, Shaham Y, van Praag H. Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learn Mem*. 2011 Aug 30;18(9):605-9.
- Laviola** G, Hannan AJ, Macrì S, Solinas M, Jaber M. Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiol Dis*. 2008 Aug;31(2):159-68.
- Lee** JH, Kim HJ, Kim JG, Ryu V, Kim BT, Kang DW, Jahng JW. Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. *Neurosci Res*. 2007 May;58(1):32-9.
- Leger** M, Paizanis E, Dzahini K, Quiedeville A, Bouet V, Cassel JC, Freret T, Schumann-Bard P, Boulouard M. Environmental Enrichment Duration Differentially Affects Behavior and Neuroplasticity in Adult Mice. *Cereb Cortex*. 2014 Jun 5.
- Leggio** MG, Mandolesi L, Federico F, Spirito F, Ricci B, Gelfo F, Petrosini L. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav Brain Res*. 2005 Aug 30;163(1):78-90.

- Leonard** SK, Ring RH. Immunohistochemical localization of the neuropeptide S receptor in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 2011 Jan 13;172:153-63.
- Le Pape** S. EasyqpcR : EasyqpcR for easy analysis of real-time PCR data at IRTOMIT-INSERM U1082 R package, IRTOMIT-INSERM U1082. sylvain.le.pape@univ-poitiers.fr
- Levine** S, Mody T. The long-term psychobiological consequences of intermittent postnatal separation in the squirrel monkey. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003 Jan-Mar;27(1-2):83-9.
- Li** C, Chen P, Smith MS. Corticotropin releasing hormone neurons in the paraventricular nucleus are direct targets for neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus: an anterograde tracing study. *Brain Res*. 2000 Jan 31;854(1-2):122-9.
- Li** M, Xue X, Shao S, Shao F, Wang W. Cognitive, emotional and neurochemical effects of repeated maternal separation in adolescent rats. *Brain Res*. 2013 Jun 26;1518:82-90.
- Liang** KC, Melia KR, Campeau S, Falls WA, Miserendino MJ, Davis M. Lesions of the central nucleus of the amygdala, but not the paraventricular nucleus of the hypothalamus, block the excitatory effects of corticotropin-releasing factor on the acoustic startle reflex. *J Neurosci*. 1992 Jun;12(6):2313-20.
- Lin** EJ, Lin S, Aljanova A, Doring MJ, Herzog H. Adult-onset hippocampal-specific neuropeptide Y overexpression confers mild anxiolytic effect in mice. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2010 Mar;20(3):164-75.
- Lipkind** D, Sakov A, Kafkafi N, Elmer GI, Benjamini Y, Golani I. New replicable anxiety-related measures of wall vs center behavior of mice in the open field. *J Appl Physiol* (1985). 2004 Jul;97(1):347-59.
- Lister** RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*. 1987;92(2):180-5.
- Liu** D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, Meaney MJ. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*. 1997 Sep 12;277(5332):1659-62.

- Liu** N, He S, Yu X. Early natural stimulation through environmental enrichment accelerates neuronal development in the mouse dentate gyrus. *PLoS One*. 2012;7(1):e30803.
- Livak** KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
- Llorens-Martín** MV, Rueda N, Martínez-Cué C, Torres-Alemán I, Flórez J, Trejo JL. Both increases in immature dentate neuron number and decreases of immobility time in the forced swim test occurred in parallel after environmental enrichment of mice. *Neuroscience*. 2007 Jul 13;147(3):631-8.
- Lukkes** JL, Forster GL, Renner KJ, Summers CH. Corticotropin-releasing factor 1 and 2 receptors in the dorsal raphe differentially affect serotonin release in the nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol*. 2008 Jan 14;578(2-3):185-93.
- Lyons** DM, Parker KJ, Schatzberg AF. Animal models of early life stress: Implications for understanding resilience. *Dev Psychobiol*. 2010 Jul;52(5):402-10.
- Macrì** S, Würbel H. Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: a critical review of the maternal mediation hypothesis. *Horm Behav*. 2006 Dec;50(5):667-80.
- Macrì** S, Chiarotti F, Würbel H. Maternal separation and maternal care act independently on the development of HPA responses in male rats. *Behav Brain Res*. 2008 Aug 22;191(2):227-34.
- Macrì** S, Granstrem O, Shumilina M, Antunes Gomes dos Santos FJ, Berry A, Saso L, Laviola G. Resilience and vulnerability are dose-dependently related to neonatal stressors in mice. *Horm Behav*. 2009 Oct;56(4):391-8.
- Marco** EM, Macrì S, Laviola G. Critical age windows for neurodevelopmental psychiatric disorders: evidence from animal models. *Neurotox Res*. 2011 Feb;19(2):286-307.
- McCauley** J, Kern DE, Kolodner K, Dill L, Schroeder AF, DeChant HK, Ryden J, Derogatis LR, Bass EB. Clinical characteristics of women with a history of childhood abuse: unhealed wounds. *JAMA*. 1997 May 7;277(17):1362-8.
- Meshi** D, Drew MR, Saxe M, Ansorge MS, David D, Santarelli L, Malapani C, Moore H, Hen R. Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nat Neurosci*. 2006 Jun;9(6):729-31.

- Mickey** BJ, Zhou Z, Heitzeg MM, Heinz E, Hodgkinson CA, Hsu DT, Langenecker SA, Love TM, Peciña M, Shafir T, Stohler CS, Goldman D, Zubieta JK. Emotion processing, major depression, and functional genetic variation of neuropeptide Y. *Arch Gen Psychiatry*. 2011 Feb;68(2):158-66.
- Miki** T, Liu JQ, Ohta K, Suzuki S, Kusaka T, Warita K, Yokoyama T, Jamal M, Ueki M, Yakura T, Tamai M, Sumitani K, Hosomi N, Takeuchi Y. Early post-natal maternal separation causes alterations in the expression of  $\beta$ 3-adrenergic receptor in rat adipose tissue suggesting long-term influence on obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Dec 6;442(1-2):68-71.
- Millstein** RA, Holmes A. Effects of repeated maternal separation on anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strains. *Neurosci Biobehav Rev*. 2007;31(1):3-17.
- Morales-Medina** JC, Dumont Y, Quirion R. A possible role of neuropeptide Y in depression and stress. *Brain Res*. 2010 Feb 16;1314:194-205.
- Morris** MJ, Pavia JM. Stimulation of neuropeptide Y overflow in the rat paraventricular nucleus by corticotropin-releasing factor. *J Neurochem*. 1998 Oct;71(4):1519-24.
- Müller** MB, Wurst W. Getting closer to affective disorders: the role of CRH receptor systems. *Trends Mol Med*. 2004 Aug;10(8):409-15.
- Nemeroff** CB. Neurobiological consequences of childhood trauma. *J Clin Psychiatry*. 2004;65 Suppl 1:18-28.
- Nikisch** G, Agren H, Eap CB, Czernik A, Baumann P, Mathé AA. Neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone in CSF mark response to antidepressive treatment with citalopram. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2005 Sep;8(3):403-10.
- Nishi** M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T. Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents. *Front Neurosci*. 2014 Jun 17;8:166.
- O'Malley** D, Dinan TG, Cryan JF. Neonatal maternal separation in the rat impacts on the stress responsivity of central corticotropin-releasing factor receptors in adulthood. *Psychopharmacology (Berl)*. 2011 Mar;214(1):221-9.
- Okamura** N, Reinscheid RK. Neuropeptide S: a novel modulator of stress and arousal. *Stress*. 2007 Aug;10(3):221-6.

- Olesen** MV, Christiansen SH, Gøtzsche CR, Nikitidou L, Kokaia M, Woldbye DP. Neuropeptide Y Y1 receptor hippocampal overexpression via viral vectors is associated with modest anxiolytic-like and proconvulsant effects in mice. *J Neurosci Res.* 2012 Feb;90(2):498-507.
- Olson** AK, Eadie BD, Ernst C, Christie BR. Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. *Hippocampus.* 2006;16(3):250-60.
- Olsson** T, Mohammed AH, Donaldson LF, Henriksson BG, Seckl JR. Glucocorticoid receptor and NGFI-A gene expression are induced in the hippocampus after environmental enrichment in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 1994 Jun;23(4):349-53.
- Own** LS, Iqbal R, Patel PD. Maternal separation alters serotonergic and HPA axis gene expression independent of separation duration in C57bl/6 mice. *Brain Res.* 2013 Jun 17;1515:29-38.
- Painsipp** E, Wulsch T, Edelsbrunner ME, Tasan RO, Singewald N, Herzog H, Holzer P. Reduced anxiety-like and depression-related behavior in neuropeptide Y Y4 receptor knockout mice. *Genes Brain Behav.* 2008 Jul;7(5):532-42.
- Parfitt** DB, Levin JK, Saltstein KP, Klayman AS, Greer LM, Helmreich DL. Differential early rearing environments can accentuate or attenuate the responses to stress in male C57BL/6 mice. *Brain Res.* 2004 Jul 30;1016(1):111-8.
- Parker** KJ, Buckmaster CL, Sundlass K, Schatzberg AF, Lyons DM. Maternal mediation, stress inoculation, and the development of neuroendocrine stress resistance in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 21;103(8):3000-5.
- Paylor** R, Zhao Y, Libbey M, Westphal H, Crawley JN. Learning impairments and motor dysfunctions in adult Lhx5-deficient mice displaying hippocampal disorganization. *Physiol Behav.* 2001 Aug;73(5):781-92.
- Pfaffl** MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):e45.
- Pfaffl** MW. Quantification strategies in real-time PCR. *AZ of quantitative PCR*, 1, 89-113. 2004.

- Phillips** LJ, McGorry PD, Garner B, Thompson KN, Pantelis C, Wood SJ, Berger G. Stress, the hippocampus and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for the development of psychotic disorders. *Aust N Z J Psychiatry*. 2006 Sep;40(9):725-41.
- Prut** L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 2003 Feb 28;463(1-3):3-33.
- Raber** J, Rola R, LeFevour A, Morhardt D, Curley J, Mizumatsu S, Vandenberg SR, Fike JR. Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis. *Radiat Res*. 2004 Jul;162(1):39-47.
- Rage** F, Givalois L, Marmigère F, Tapia-Arancibia L, Arancibia S. Immobilization stress rapidly modulates BDNF mRNA expression in the hypothalamus of adult male rats. *Neuroscience*. 2002;112(2):309-18.
- Ramakers** C, Ruijter JM, DePrez RH, Moorman AF. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett*. 2003 Mar 13;339(1):62-6.
- Rampon** C, Jiang CH, Dong H, Tang YP, Lockhart DJ, Schultz PG, Tsien JZ, Hu Y. Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Nov 7;97(23):12880-4.
- Rasmuson** S, Olsson T, Henriksson BG, Kelly PA, Holmes MC, Seckl JR, Mohammed AH. Environmental enrichment selectively increases 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA expression and binding in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998 Jan;53(1-2):285-90.
- Redrobe** JP, Dumont Y, Quirion R. Neuropeptide Y (NPY) and depression: from animal studies to the human condition. *Life Sci*. 2002 Nov 8;71(25):2921-37.
- Redrobe** JP, Dumont Y, Fournier A, Baker GB, Quirion R. Role of serotonin (5-HT) in the antidepressant-like properties of neuropeptide Y (NPY) in the mouse forced swim test. *Peptides*. 2005 Aug;26(8):1394-400.
- Romeo** RD, Mueller A, Sisti HM, Ogawa S, McEwen BS, Brake WG. Anxiety and fear behaviors in adult male and female C57BL/6 mice are modulated by maternal separation. *Horm Behav*. 2003 May;43(5):561-7.
- Rosenfeld** CS, Ferguson SA. Barnes maze testing strategies with small and large rodent models. *J Vis Exp*. 2014 Feb 26;(84):e51194.

- Ruijter** JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, Moorman AF. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 2009 Apr;37(6):e45.
- Sah** R, Ekhtator NN, Strawn JR, Sallee FR, Baker DG, Horn PS, Geraciotti TD Jr. Low cerebrospinal fluid neuropeptide Y concentrations in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry.* 2009 Oct 1;66(7):705-7.
- Sajdyk** TJ, Schober DA, Gehlert DR. Neuropeptide Y receptor subtypes in the basolateral nucleus of the amygdala modulate anxiogenic responses in rats. *Neuropharmacology.* 2002 Dec;43(7):1165-72.
- Sajdyk** TJ, Shekhar A, Gehlert DR. Interactions between NPY and CRF in the amygdala to regulate emotionality. *Neuropeptides.* 2004 Aug;38(4):225-34.
- Sajdyk** TJ, Fitz SD, Shekhar A. The role of neuropeptide Y in the amygdala on corticotropin-releasing factor receptor-mediated behavioral stress responses in the rat. *Stress.* 2006 Mar;9(1):21-8.
- Sajdyk** TJ, Johnson PL, Leitermann RJ, Fitz SD, Dietrich A, Morin M, Gehlert DR, Urban JH, Shekhar A. Neuropeptide Y in the amygdala induces long-term resilience to stress-induced reductions in social responses but not hypothalamic-adrenal-pituitary axis activity or hyperthermia. *J Neurosci.* 2008 Jan 23;28(4):893-903.
- Savignac** HM, Dinan TG, Cryan JF. Resistance to early-life stress in mice: effects of genetic background and stress duration. *Front Behav Neurosci.* 2011 Apr 4;5:13.
- Schmidt** MV, Levine S, Oitzl MS, van der Mark M, Müller MB, Holsboer F, de Kloet ER. Glucocorticoid receptor blockade disinhibits pituitary-adrenal activity during the stress hypo-responsive period of the mouse. *Endocrinology.* 2005 Mar;146(3):1458-64.
- Schmidt** MV, Liebl C, Sterlemann V, Ganea K, Hartmann J, Harbich D, Alam S, Müller MB. Neuropeptide Y mediates the initial hypothalamic-pituitary-adrenal response to maternal separation in the neonatal mouse. *J Endocrinol.* 2008 May;197(2):421-7.
- Schoenfeld** TJ, Gould E. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. *Exp Neurol.* 2011 Jan 31.

- Schoor** O, Weinschenk T, Hennenlotter J, Corvin S, Stenzl A, Rammensee HG, Stevanović S. Moderate degradation does not preclude microarray analysis of small amounts of RNA. *Biotechniques*. 2003 Dec;35(6):1192-6, 1198-201.
- Seckl** JR, Holmes MC. Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007 Jun;3(6):479-88.
- Segovia** G, Del Arco A, de Blas M, Garrido P, Mora F. Effects of an enriched environment on the release of dopamine in the prefrontal cortex produced by stress and on working memory during aging in the awake rat. *Behav Brain Res*. 2008 Mar 5;187(2):304-11.
- Segovia** G, Del Arco A, Garrido P, de Blas M, Mora F. Environmental enrichment reduces the response to stress of the cholinergic system in the prefrontal cortex during aging. *Neurochem Int*. 2008 May;52(6):1198-203.
- Selye** H, *The physiology and pathology of exposure to stress*. Oxford, England: Acta, Inc. (1950).
- Shea** A, Walsh C, Macmillan H, Steiner M. Child maltreatment and HPA axis dysregulation: relationship to major depressive disorder and post traumatic stress disorder in females. *Psychoneuroendocrinology*. 2005 Feb;30(2):162-78.
- Shekhar** A, Truitt W, Rainnie D, Sajdyk T. Role of stress, corticotrophin releasing factor (CRF) and amygdala plasticity in chronic anxiety. *Stress*. 2005 Dec;8(4):209-19.
- Silva** MS, Pereira BA, Céspedes IC, Nascimento JO, Bittencourt JC, Viana MB. Dorsomedial hypothalamus CRF type 1 receptors selectively modulate inhibitory avoidance responses in the elevated T-maze. *Behav Brain Res*. 2014 Jun 14;271C:249-257.
- Skutella** T, Probst JC, Renner U, Holsboer F, Behl C. Corticotropin-releasing hormone receptor (type I) antisense targeting reduces anxiety. *Neuroscience*. 1998 Aug;85(3):795-805.
- Smith** KL, Patterson M, Dhillo WS, Patel SR, Semjonous NM, Gardiner JV, Ghatei MA, Bloom SR. Neuropeptide S stimulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and inhibits food intake. *Endocrinology*. 2006 Jul;147(7):3510-8.

- Stein-Behrens** B, Mattson MP, Chang I, Yeh M, Sapolsky R. Stress exacerbates neuron loss and cytoskeletal pathology in the hippocampus. *J Neurosci*. 1994 Sep;14(9):5373-80.
- Susman** EJ. Psychobiology of persistent antisocial behavior: stress, early vulnerabilities and the attenuation hypothesis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2006;30(3):376-89.
- Sztainberg** Y, Kuperman Y, Tsoory M, Lebow M, Chen A. The anxiolytic effect of environmental enrichment is mediated via amygdalar CRF receptor type 1. *Mol Psychiatry*. 2010 Sep;15(9):905-17.
- Sztainberg** Y, Kuperman Y, Justice N, Chen A. An anxiolytic role for CRF receptor type 1 in the globus pallidus. *J Neurosci*. 2011 Nov 30;31(48):17416-24.
- Sørensen** G, Lindberg C, Wörtwein G, Bolwig TG, Woldbye DP. Differential roles for neuropeptide Y Y1 and Y5 receptors in anxiety and sedation. *J Neurosci Res*. 2004 Sep 1;77(5):723-9.
- Takahashi** LK, Ho SP, Livanov V, Graciani N, Arneric SP. Antagonism of CRF(2) receptors produces anxiolytic behavior in animal models of anxiety. *Brain Res*. 2001 Jun 1;902(2):135-42.
- Tataurov** AV, You Y, Owczarzy R. Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids. *Biophys Chem*. 2008 Mar;133(1-3):66-70.
- Tau** GZ, Peterson BS. Normal development of brain circuits. *Neuropsychopharmacology*. 2010 Jan;35(1):147-68.
- Thiriet** N, Amar L, Toussay X, Lardeux V, Ladenheim B, Becker KG, Cadet JL, Solinas M, Jaber M. Environmental enrichment during adolescence regulates gene expression in the striatum of mice. *Brain Res*. 2008 Jul 30;1222:31-41.
- Thorsell** A, Svensson P, Wiklund L, Sommer W, Ekman R, Heilig M. Suppressed neuropeptide Y (NPY) mRNA in rat amygdala following restraint stress. *Regul Pept*. 1998 Sep 25;75-76:247-54.
- Thorsell** A, Carlsson K, Ekman R, Heilig M. Behavioral and endocrine adaptation, and up-regulation of NPY expression in rat amygdala following repeated restraint stress. *Neuroreport*. 1999 Sep 29;10(14):3003-7.

- Thorsell** A. Brain neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone in mediating stress and anxiety. *Exp Biol Med* (Maywood). 2010 Oct;235(10):1163-7.
- Timpl** P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK, Blanquet V, Steckler T, Holsboer F, Wurst W. Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nat Genet*. 1998 Jun;19(2):162-6.
- Vandesompele** J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034.
- Venerosi** A, Cirulli F, Capone F, Alleva E. Prolonged perinatal AZT administration and early maternal separation: effects on social and emotional behaviour of periadolescent mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003 Feb;74(3):671-81.
- Walf** AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2007;2(2):322-8.
- Waselus** M, Nazzaro C, Valentino RJ, Van Bockstaele EJ. *Biol Psychiatry*. Stress-induced redistribution of corticotropin-releasing factor receptor subtypes in the dorsal raphe nucleus. *Biol Psychiatry*. 2009 Jul 1;66(1):76-83.
- Van de Weerd** HA, Baumans V, Koolhaas JM, van Zutphen LF. Strain specific behavioural response to environmental enrichment in the mouse. *J Exp Anim Sci*. 1994 Aug;36(4-5):117-27.
- Van Praag** H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci*. 2000 Dec;1(3):191-8.
- Weinstock** M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008 Aug;32(6):1073-86.
- Widerlöv** E, Bissette G, Nemeroff CB. Monoamine metabolites, corticotropin releasing factor and somatostatin as CSF markers in depressed patients. *J Affect Disord*. 1988 Mar-Apr;14(2):99-107.
- Wilcox** RR. *Modern Statistics for the Social and Behavioral Sciences: A Practical Introduction*. Crc Press, 2012.
- Xu** YL, Reinscheid RK, Huitron-Resendiz S, Clark SD, Wang Z, Lin SH, Brucher FA, Zeng J, Ly NK, Henriksen SJ, de Lecea L, Civelli O. Neuropeptide S: a

neuropeptide promoting arousal and anxiolytic-like effects. *Neuron*. 2004 Aug 19;43(4):487-97.

**Xu** Z, Hou B, Zhang Y, Gao Y, Wu Y, Zhao S, Zhang C. Antidepressive behaviors induced by enriched environment might be modulated by glucocorticoid levels. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2009 Dec;19(12):868-75.

**Xue** X, Shao S, Li M, Shao F, Wang W. Maternal separation induces alterations of serotonergic system in different aged rats. *Brain Res Bull*. 2013 Jun;95:15-20.

**Yuan** JS, Reed A, Chen F, Stewart CN Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*. 2006 Feb 22;7:85.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Andreas Reif danke ich für die Vergabe dieses interessanten Promotionsthemas sowie für die Möglichkeit, die dazugehörigen Arbeitsschritte in seiner Arbeitsgruppe unter optimalen Bedingungen durchführen zu dürfen.

Frau Dipl.-Psych. Antonia Post danke ich für die zielgerichtete Betreuung meiner Arbeit sowie die fundierte Einarbeitung - insbesondere in die Methodik der angewandten Verhaltenstestungen.

Dem gesamten Laborteam, insbesondere Frau Terri Töpner, danke ich für die Bereitschaft und Geduld, mich in die erforderlichen Arbeitsschritte einzuführen und mir stets mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Abschließend danke ich Herrn M.Sc. Johannes Kattan für die kollegiale Zusammenarbeit, ohne die diese Arbeit im vorliegenden Umfang nicht möglich gewesen wäre.