

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Entwicklungsgenetik

## *Chronic Mild Stress (CMS) in Mäusen – Untersuchungen zu einem Tiermodell für Depression*

Martin Schweizer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. K. H. Schneitz

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. W. Wurst

2. apl. Prof. Dr. W. Zieglgänsberger

(Ludwig-Maximilians-Universität München)

Die Dissertation wurde am 09.07.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 14.09.2008 angenommen.





*enigstens ist so viel gewiss, dass die feinern innern Aenderungen und Empfindungen, die der Mensch durch Worte ausdrücken kann, bei Thieren ganz wegfallen. Um zu prüfen, ob eine Substanz sehr heftige oder gefährliche Wirkungen hervorbringe, das läßt sich im allgemeinen wohl (bei Versuchen an mehreren Thieren zugleich) wahrnehmen, auch wohl etwas in die Sinne fallendes, allgemeines von Wirkungen auf Bewegung der Glieder, Kälte oder Hitze, Oeffnung von oben oder unten u.d.gl. aber etwas Zusammenhängendes, Entscheidendes nie, was Einfluß auf die Beurtheilung der eigentlichen Heilkraft des Mittels bei Menschen haben könnte. Dazu sind solche Versuche zu dunkel, zu roh, und, wenn ich so sagen darf, zu plump.*

SAMUEL HAHNEMANN, 1796

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VII</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1 Stress und Depression</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2 Stress und Tiermodelle in der Depressionsforschung</b> .....	<b>7</b>
<b>1.3 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>14</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1 Terminologie</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2 Tiere und Tierhaltung</b> .....	<b>16</b>
<b>2.3 Experimentelles Design</b> .....	<b>17</b>
<b>2.4 Stressparadigmen</b> .....	<b>21</b>
2.4.1 <i>Chronic Mild Stress</i> -Prozedur.....	21
2.4.2 Akuter Stress.....	24
<b>2.5 Verhaltenstests</b> .....	<b>25</b>
2.5.1 <i>Dark/Light Box Test</i> (DaLi) .....	25
2.5.2 <i>Forced Swim Test</i> (FST) .....	25
2.5.3 <i>Open Field Test</i> (OF) .....	26
2.5.4 <i>Elevated Plus Maze Test</i> (EPM).....	27
2.5.5 <i>Modified Holeboard Test</i> (mHb) .....	27
2.5.6 Konsumverhalten .....	28
2.5.7 Langzeitmessung der Aktivität im Heimkäfig.....	29
<b>2.6 Pharmakologische Behandlung mit Paroxetin</b> .....	<b>29</b>
<b>2.7 Bestimmung physiologischer Parameter</b> .....	<b>29</b>
2.7.1 Entnahme und Aufbereitung des Bluts und der Hirne .....	29
2.7.2 Hormonbestimmung im Blutplasma.....	30

2.7.3	Gehirn-Kryoschnitte .....	30
2.7.4	Immunohistochemie .....	30
2.7.5	<i>In situ</i> Hybridisierung .....	31
2.7.6	Semiquantitative Bildanalyse .....	35
<b>2.8</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG VERSCHIEDENER MAUSSTÄMME IM CMS-PARADIGMA .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2</b>	<b>Vorversuche zu Konsummessungen .....</b>	<b>43</b>
<b>3.3</b>	<b>Beschreibung der Auswertung .....</b>	<b>47</b>
<b>3.4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
3.4.1	Konsumverhalten verschiedener Mausstämmen während CMS .....	48
3.4.2	Charakterisierung verschiedener Mausstämmen nach CMS hinsichtlich angst- und depressionsbezogenen Verhaltens .....	59
3.4.3	Untersuchung von physiologischen und endokrinologischen Parametern in chronisch mild gestressten Mäusen .....	73
3.4.4	Effekte chronischer Paroxetinbehandlung im CMS-Modell .....	85
<b>3.5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>94</b>
<b>4</b>	<b>VERÄNDERUNGEN DES LICHRHYTHMUS' ALS CMS-KOMPONENTE .....</b>	<b>110</b>
<b>4.1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>110</b>
<b>4.2</b>	<b>Versuchsdurchführung .....</b>	<b>111</b>
<b>4.3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>113</b>
4.3.1	Konsumverhalten .....	113
4.3.2	Kurzfristige Verhaltenseffekte von Lichtstress: Aktivitätsmessungen im Heimkäfig .....	118
4.3.3	Langfristige Verhaltenseffekte von chronischem Lichtstress .....	120
4.3.4	Physiologische Parameter .....	122
<b>4.4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>126</b>
<b>5</b>	<b>AKUTER STRESS IM KONTEXT DES CMS .....</b>	<b>129</b>
<b>5.1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>129</b>
<b>5.2</b>	<b>Versuchsdurchführung .....</b>	<b>131</b>

---

<b>5.3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>133</b>
5.3.1	Längere Zeit (7 Wochen) zurückliegende im Vergleich zu aktueller CMS-Erfahrung.....	133
5.3.2	Akuter Stress im Kontext von CMS .....	137
<b>5.4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>146</b>
<b>6</b>	<b>SCHLUSSBETRACHTUNG</b> .....	<b>149</b>
<b>ANHANG</b> .....		<b>I</b>
➤	Verwendete Lösungen zu molekularbiologischen Untersuchungen .....	i
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....		<b>IV</b>
<b>DANKSAGUNG</b> .....		<b>XV</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon
Balb/c	Balb/c-Mäuse
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
BL/6	C57BL/6-Mäuse (allgemein)
BL/6J	C57BL/6J-Mäuse
BL6/N	C57BL/6N-Mäuse
BSA	Rinderserumalbumin
CA1	<i>Cornu ammonis 1</i> -Region im Hippocampus
CA3	<i>Cornu ammonis 3</i> -Region im Hippocampus
CD1	CD-1-Mäuse
CMS	<i>Chronic Mild Stress</i> , Chronisch Milder Stress
CMS temp	Versuchsgruppe, nur vorübergehend CMS ausgesetzt
CO	Kontrollgruppe, Kontrollmäuse ohne CMS-Erfahrung
COX-2	Cyclooxygenase 2
CRH	<i>Corticotropin Releasing Hormone</i> , Corticoliberin
D2Jlco	DBA/2Jlco-Mäuse
D2Ola	DBA/2Ola-Mäuse
DaLi	<i>Dark/Light Box</i>
DBA	DBA/2-Mäuse (allgemein)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DG	<i>Gyrus dentatus</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPM	<i>Elevated Plus Maze</i>
EtOH	Ethanol
FST	<i>Forced Swim Test</i>

---

FVB	FVB-Mäuse
GR	Glucocorticoidrezeptor
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Wasser im Reinheitsgrad für molekularbiologische Untersuchungen
LC	<i>Locus coeruleus</i>
LS	Lichtstress, Lichtstimulus
mHb	<i>Modified Holeboard Test</i>
MR	Mineralocorticoidrezeptor
NMRI	NMRI-Mäuse
NTE	Puffer (enth. NaCl, Tris-HCl und EDTA, s. Anhang)
NTP	Gemisch aus Nucleotiden
OF	<i>Open Field Test</i>
OT	Objektträger
Par	mit Paroxetinbehandlung
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Puffer (s. Anhang)
PCR	Polymerasekettenreaktion
Per1	<i>Period 1-Gen</i>
PFA	Paraformaldehyd
PGES2	Prostaglandinsynthetase E2
PVN	<i>Nucleus paraventricularis</i>
RT	Raumtemperatur
SCN	<i>Nucleus suprachiasmaticus</i>
SI	<i>Social Interaction Stress</i>
SSC	NaCl/Natriumcitrat-Puffer (s. Anhang)
TEA	Triethanolamin
UTP	Uridintriphosphat
Veh	Versuchsgruppe mit Vehikelbehandlung

## Zusammenfassung

Stressvolle Lebensumstände können Auslöser sein für depressive Episoden im Leben eines Menschen mit einer Prävalenz von bis zu 10%. Bei der Behandlung von Depressionen muss unter anderem zurückgegriffen werden auf Antidepressiva, deren klinische Wirksamkeit in vielen Fällen begrenzt wird durch einen sehr späten Wirkungseintritt, ein breites Nebenwirkungsspektrum und einen hohen Anteil an depressiven Patienten, die nicht auf gegenwärtig verfügbare medikamentöse Behandlungsoptionen ansprechen. Die Erforschung von neuartigen, verbesserten Antidepressiva wird erheblich erschwert durch mangelhafte Kenntnis der Ursachen für Depression. So besteht sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der präklinischen Arzneimittelentwicklung ein dringender Bedarf an validen Tiermodellen für Depression – bis heute ist kein solches Tiermodell bekannt, was umfassend das Krankheitsbild der Depression modellieren kann. Einige Ansätze zu dieser Problematik versuchen die Zusammenhänge von Angsterkrankungen, Stress und Depression am Tier zu modellieren. Als ein solches Tiermodell wurde vor etwa 20 Jahren der chronisch milde Stress (*Chronic Mild Stress*, CMS) an Ratten etabliert – mit bis heute andauernden Schwierigkeiten hinsichtlich Zuverlässigkeit, Reproduzierbarkeit und Validität. Aus Kostengründen und für die Verwendung von genetisch veränderten Tieren (Mäusen) ist für die psychiatrische präklinische Forschung ein zuverlässiges Mausmodell unverzichtbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels chronisch mild gestressten Mäusen versucht, einen Phänotyp zu erzeugen, der den essenziellen Anforderungen an ein Tiermodell für Depression gerecht wird. Besonderes Augenmerk wurde in diesem Zusammenhang auf die Entwicklung einer Anhedonie als einem Kernsyndrom der Depression gerichtet und in verschiedenen Mausstämmen anhand ihres Konsumverhaltens einer süßen Trinklösung untersucht. Des Weiteren wurden verschiedene Verhaltenstests durchgeführt, um den durch chronisch milden Stress generierten Phänotyp möglichst umfassend abzugreifen. Durch den Einsatz eines vielfach verwendeten Antidepressivums (Paroxetin) wurde versucht, das in dieser Arbeit verwendete Protokoll pharmakologisch zu validieren.

Stressorspezifischen Besonderheiten und dem Einfluss von akutem Stress im CMS-Paradigma wurde im Speziellen nachgegangen, wobei weitere Befunde und Kritikpunkte zur Methodenentwicklung eines Tiermodells gefunden wurden. Diese Ergebnisse, die Verhaltensbefunde und die untersuchten physiologischen Parameter

werden in der Gesamtschau diskutiert und die Tauglichkeit des entwickelten Experimentprotokolls zur Entwicklung eines Mausmodells für Depression erörtert.

## 1 Einleitung

### 1.1 Stress und Depression

Im Jahr 1936 entlehnte der Mediziner Hans Selye die Begriffe „Stress“ und „Stressor“ aus der Werkstoffkunde, wo sie unter anderem zum Beschreiben von mechanischer Spannung und Materialermüdung verwendet werden, und übertrug sie als Teil seiner Arbeiten über das Adaptionssyndrom in den medizinisch-biologischen Bereich (Selye, 1936). Stress entspricht hierbei einem sehr generellen Konzept und bezieht sich auf Reaktionen eines Organismus auf äußere Ereignisse, die dessen physiologisches Gleichgewicht (Homöostase) stören. Diese Ereignisse können physikalischer, chemischer oder psychologischer Natur sein (Fuchs & Flugge, 2003). Die Stressantwort beinhaltet neuroendokrine, neurochemische und Verhaltensreaktionen, die als eine Art Alarmsystem fungieren, das initiiert wird, wenn ein erlerntes Verhalten nicht unmittelbar eine stressvolle Situation bewältigen lässt (Levine & Ursin, 2004). Mit anderen Worten ist die Stressantwort dazu da, mit Stressoren als den Stress auslösenden Ereignissen zurechtzukommen und erneut einen Zustand des Gleichgewichts (Homöostase) herzustellen. Falls dieser Anpassungsprozess unzureichend verläuft und die Stressantwort daher über längere Zeit anhält, kann die Homöostase des Organismus' bedroht und damit die Gesundheit gefährdet werden (Fuchs & Flugge, 2003). Im Menschen kann zum Beispiel das Unvermögen, mit (meist psychologischen) Stressoren umzugehen, zu Angst- und Gemütskrankungen führen. Im Besonderen ist Stress dafür bekannt, einen Faktor bei der Entstehung von Depressionen darzustellen (Arborelius et al., 1999; Holsboer, 1999; Holsboer, 2001). Typischerweise führt extremer Stress nicht zu einer Depression sondern zu einer posttraumatischen Belastungsstörung (PTSD). In anfälligen Patienten jedoch können Stressoren, die anderweitig als mild angesehen werden, eine bedeutende Rolle bei der Manifestation einer depressiven Episode spielen.

Die Stressantwort wird durch die Aktivität des autonomen Nervensystems und der HPA-Achse (Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, *hypothalamus-pituitary-adrenal axis*, HPA-Achse) vermittelt, wobei diese beiden Systeme interagieren und gleichzeitig auftretende Veränderungen des Verhaltens mitbestimmen. Die Aktivierung des autonomen Nervensystems resultiert in der Freisetzung von Noradrenalin in praktisch jedem Körperorgan, sowie in der Ausschüttung von Adrenalin durch die Nebenniere. Die Folge davon sind erhöhter Puls und Blutdruck, Verlangsamung der Verdauung, Erhöhung des Blutzuckerspiegels und eine verminderte Sensitivität von Schmerzrezeptoren. Dies befähigt den Organismus zu einer unmittelbaren Flucht- oder Verteidigungsreaktion.

Eine Komponente der Stressantwort ist die Aktivierung der HPA-Achse. Eine Schlüsselrolle spielt in ihr der Hypothalamus, dessen Aufgabe die Erhaltung der Homöostase des Körpers ist. Neurologisches Input bekommt der Hypothalamus dabei durch eine Reihe von Sensoren und Strukturen; unter anderem Thermorezeptoren, Osmorezeptoren und Projektionen vom *Tractus solitarius*, die Informationen über den Blutdruck und viszerale Sensorik bereitstellen. Projektionen vom *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) lassen den Hypothalamus seine Aktivität an den Licht-Dunkel-Rhythmus anpassen. Weiterhin bezieht der Hypothalamus Informationen durch Projektionen von limbischen und olfaktorischen Strukturen, die für die Regulation von Nahrungsaufnahme, Reproduktionsverhalten und für stressinduzierte Verhaltensantworten eine Rolle spielen.

Das neurologische Output folgt zwei großen Pfaden. Einer von diesen ist wiederum das autonome Nervensystem, das durch die Äste des Sympathikus und Parasympathikus Funktionen wie die Herzrate, Vasokonstriktion, Verdauung und eine Reihe anderer Funktionen reguliert. Der zweite Pfad beinhaltet endokrine Signale. Der Hypothalamus besteht aus einer Reihe von spezialisierten Kernen (*Nuclei*), die Freisetzungshormone (*releasing hormones*) sekretieren. Diese Freisetzungshormone stimulieren die Hypophyse, die ihrerseits weitere Hormone ausschüttet wie adrenocorticotrophes Hormon (ACTH), Thyreotropin (TSH), follikelstimulierendes Hormon (FSH), Prolaktin und Somatotropin. Diese Hormone beeinflussen periphere Organe, die sie über den Blutkreislauf erreichen. Der Hypothalamus und die Hypophyse bilden also einen Teil vieler regulierender endokriner Achsen, worunter die HPA-Achse für die Stressforschung die bedeutendste ist.

Die Aktivierung der HPA-Achse resultiert in der Freisetzung von Glucocorticoiden (wie Corticosteron beim Nagetier und Cortisol beim Menschen) aus der Nebennierenrinde, die die Verfügbarkeit von Glucose im Blut erhöhen durch Gluconeogenese, Lipolyse, Proteolyse und durch Erhöhung der Insulinresistenz. Des Weiteren haben Glucocorticoide eine antiinflammatorische Funktion. Unter stressfreien Bedingungen ist die HPA-Achse an der Regulation des Flüssigkeitshaushalts und der Nahrungszufuhr beteiligt. Die Aktivität dieses Systems unterliegt einem circadianen Rhythmus, mit der höchsten Aktivität zu Beginn der Wachphase, beim Menschen also morgens, beim Nager zu Beginn der Dunkelphase (de Kloet et al., 1999; de Kloet et al., 1998). Unter Stressbedingungen wird die HPA-Achse aktiviert, da vermehrt Glucose benötigt wird, um ausreichend Energie für Organe zur Verfügung zu stellen, die während der Stressantwort eine erhöhte Aktivität aufweisen. In diesem Zusammenhang ist der *Nucleus paraventricularis* (PVN) die bedeutendste Region des Hypothalamus und stellt

einen Dreh- und Angelpunkt der komplex miteinander in Wechselwirkung stehenden Systeme dar, die die Stressantwort regulieren (Pacak, 2000). Der PVN besteht aus magnozellulären Zellen, die Arginin-Vasopressin (AVP) produzieren und freisetzen, und aus parvozellulären Zellen, die Corticoliberin (*corticotropin-releasing hormone*, CRH) produzieren und freisetzen (Herman et al., 2002). Von der *Eminentia mediana* aus wird dieses ins Hypophysen-Pfortader-System sekretiert, erreicht über dieses den drüsigen Anteil der Hypophyse, wo es die Freisetzung von ACTH in den Blutkreislauf bewirkt. AVP kann hierbei synergistisch mit CRH reagieren und die ACTH-Freisetzung verstärken (Antoni, 1986; Lowry et al., 1986; Whitnall, 1993). Wenn ACTH über den Blutkreislauf die Nebennierenrinde erreicht, werden dort Glucocorticoide freigesetzt.

Verschiedene Rückkopplungsschleifen inhibieren diese stressinduzierten Prozesse. Zum einen – in einer kurzen Rückkopplungsschleife – inhibiert ACTH die Freisetzung von weiterem ACTH durch die Hypophyse. Zum anderen – in einer größeren Rückkopplungsschleife – sind die durch die Nebennierenrinde freigesetzten Glucocorticoide nötig, um die Aktivität der HPA-Achse durch Bindung an Glucocorticoidrezeptoren (GR) und Mineralocorticoidrezeptoren (MR) hauptsächlich im Hippocampus zu hemmen (de Kloet et al., 2000; Reul et al., 1987; Reul et al., 2000; Reul & de Kloet, 1985).

Im gesunden Organismus reagiert die HPA-Achse auf stressvolle Ereignisse mit erhöhter Freisetzung von Glucocorticoiden, die an GRs im Hippocampus binden und über diesen Rückkopplungsmechanismus eine Rückkehr zu einem ausgeglichenen Zustand des Systems (Homöostase) bewirken. Normale Konzentrationen dieser Glucocorticoide beeinflussen die Hippocampusfunktion und bestimmte kognitive Fähigkeiten positiv (Nestler et al., 2002). In depressiven Patienten jedoch konnte gezeigt werden, dass die Rückkopplungsmechanismen nicht mehr hinreichend funktionieren. Die Patienten zeigten eine anhaltende Aktivierung des sympathischen Nervensystems, höhere Konzentrationen von zirkulierendem Cortisol (wobei es sich um ein Symptom handelt, das auftreten kann, aber nicht muss) und eine erhöhte Cortisolantwort auf ACTH, wobei oft eine Vergrößerung der Hypophyse und der Nebennieren gefunden wurde (Gould et al., 1998; Ressler & Nemeroff, 2000; Sheline et al., 1996). Den schädlichen Effekt von lang anhaltend erhöhten Cortisolwerten verdeutlicht die Tatsache, dass 40-90% der Patienten mit Cushing-Syndrom, das durch hohe Plasmakonzentrationen an Cortisol gekennzeichnet ist, gleichzeitig an Depressionen leiden (Kaplan & Sadock, 1998).

Das Wissen über die stressinduzierten Veränderungen der Hirnphysiologie, wie sie hier für die HPA-Achse skizziert wurden, entstammt der modernen Forschung der letzten

Jahrzehnte und überschneidet sich zu einem erheblichen Teil mit den Erkenntnissen zur Depressionssymptomatik. Das depressive Krankheitsbild kann sehr individuell gekennzeichnet sein durch Symptome wie Schlafstörungen, Lustlosigkeit, depressive Verstimmung, Traurigkeit, Antriebsstörungen, Gefühlen von Schuld, Angst und Wertlosigkeit, Gefühllosigkeit, Konzentrationsstörungen, Appetitlosigkeit, Libidoverlust und geht häufig mit der Entwicklung einer Angststörung einher (Saß & Houben, 1996). Schlafstörungen und Lustlosigkeit (Anhedonie) stellen dabei zwei Kernsymptome dar, die in der Mehrzahl der Fälle und unabhängig von anderen individuellen Symptomen und Begleiterscheinungen auftreten. Anhedonie bezeichnet eine psychische Störung, bei der die Fähigkeit zu positivem emotionalen Erleben reduziert ist. Die Empfindung von Freude, Lust oder Vergnügen ist eingeschränkt oder aufgehoben, der Betroffene ist unfähig, Befriedigung zu empfinden. Anhedonie kann dabei einen Wesenszug, einen Gemütszustand oder auch ein Symptom von verschiedenen psychiatrischen Krankheiten darstellen (Dilling et al., 1994; Loas, 1996; Saß & Houben, 1996).

Antidepressiva, deren erste Vertreter vor mehr als 50 Jahren durch Zufall entdeckt wurden, stellen zusammen mit kognitiver Verhaltenstherapie, Psychotherapie und Elektrokrampftherapie eine Behandlungsoption dar, die in vielen Fällen zu Remission oben genannter Symptome führen kann. Zwar ist eine Vielzahl von Antidepressiva auf dem Markt, allen gemeinsam jedoch ist ein Eingriff in den Stoffwechsel monoaminerger Neurotransmitter, was ihr mitunter ungünstiges Nebenwirkungsprofil bestimmt (Settle, Jr., 1998). Sie wirken außerdem erst nach mehrwöchiger Anwendung und nur in einem Teil der Patienten. Die weitere Entwicklung von Antidepressiva neuer Art (jenseits des direkten Eingriffs in die monoaminerge Neurotransmission) mit verbessertem Nebenwirkungsprofil, schnellerem Wirkungseintritt und breiterer Einsetzbarkeit wird wesentlich erschwert durch die Tatsache, dass die hirneurophysiologischen Grundlagen der Depression höchstens lückenhaft bekannt sind.

Theorien zur Pathophysiologie der Depression wurden entwickelt und weitergeführt seit Hippocrates' Modell der Melancholie als Überschuss an schwarzer Galle (Beck, 1972; Secretion et al., 1998). Das moderne medizinische Konzept der Depression als einem abgegrenzten Krankheitsbild taucht erstmalig in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts mit den Ideen des Psychiaters Emil Kraepelin auf (Beck, 1972). Während Theorien, wie Sigmund Freuds Auffassung der Depression als Manifestation verinnerlichter Ärgers oder Verlusts weiterhin Einfluss haben, fassen gegenwärtige Ansätze zur Diagnose und Behandlung von Depression diese als Krankheit des zentralen Nervensystems auf (Insel & Charney, 2003). Das ernsthafte Dilemma jedoch sowohl der Erforschung der neurobiologischen Grundlagen von Depressionen und

Angsterkrankungen als auch der Versuche, diese Störungen im Tier zu modellieren, ist, dass die genauen zu Grunde liegenden neuronalen Mechanismen unbekannt sind. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist Depression eine sehr heterogene Krankheit, deren Symptome sich auf psychologischer, physiologischer und auf Verhaltensebene manifestieren (Beck, 1972). Nichtsdestotrotz gibt es einige Symptome, die in der Mehrzahl der Patienten auftreten, und obwohl es schwierig ist zu ergründen, ob solche Erscheinungen die Grundursache der Krankheit oder vielmehr eine Konsequenz von dieser sind, stellen sie doch sehr nützliche Merkmale dar, um die Pathophysiologie der Depression zu erforschen (Cryan & Mombereau, 2004; Insel & Charney, 2003; Nestler et al., 2002; Wong & Licinio, 2004).

Zweifelsohne würde ein besseres Verständnis der Pathophysiologie der Depression und damit die Entwicklung von neuen, verbesserten Therapieoptionen eine beträchtliche Versorgungslücke füllen. Die jährlich steigenden Kosten für klinische Phase-II- und Phase-III-Studien in der Arzneimittelentwicklung sind enorm (DiMasi et al., 2003), wobei die Ausgaben für die Entwicklung zentral wirksamer Arzneimittel (z.B. Psychopharmaka) größer sind als die für andere große Krankheitsgebiete (Frantz, 2004). Erschwerend kommt hinzu, dass die psychiatrische Forschung bei der Entwicklung neuartiger Substanzen – wie in vielen anderen klinischen Studien auch – mit einem deutlichen Placeboeffekt zu kämpfen hat (Lakoff, 2002).

Bevor also kostspielige klinische Studien in die Wege geleitet werden, muss sich die pharmazeutische Industrie versichern, dass die zu untersuchenden biologischen Zielstrukturen tatsächlich in relevantem Zusammenhang mit der Krankheit stehen, gegen die ein Arzneimittel entwickelt werden soll. Von zentraler Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Verfügbarkeit von validen präklinischen Tiermodellen, auch um in einem nächsten Schritt das Potenzial von neuen Pharmaka testen zu können.

## **1.2 Stress und Tiermodelle in der Depressionsforschung**

Tiermodelle für Depression haben die Funktion, einige bekannte Aspekte dieser psychiatrischen Erkrankung im Labortier (z.B. in Nagern) zu reproduzieren und damit zu modellieren. Ihre Anwendung finden sie (1) als Instrumente in der Grundlagenforschung zu den neurobiologischen und pathophysiologischen Ursachen der Depression, (2) als experimentelle Modelle, um die Wirkungsweise von (bekannten) Antidepressiva zu ergründen und (3) zum Screening in der Antidepressivaentwicklung in der pharmazeutischen Forschung. Die Anzahl der verschiedenen Tiermodelle für affektive

Störungen ist groß und stetig wachsend. Die Diversität der Modelle wird weiter erhöht durch viele Veränderungen und Anpassungen, die an jedem von ihnen vorgenommen werden. Eine Darstellung der gängigsten Tiermodelle für psychiatrische Erkrankungen findet sich in mehreren Übersichtsartikeln (Cryan et al., 2002; Nestler et al., 2002; Shaffery et al., 2003; Willner, 1997).

Das Problem bei der Entwicklung von Tiermodellen ist – besonders von Modellen für psychische Störungen, die zu einem Großteil durch subjektive Erfahrungen gekennzeichnet sind – eindeutige und klare Kriterien zu definieren, um Anspruch auf Validität z.B. als Depressionsmodell erheben zu können. McKinney und Bunney (1969) schlugen in diesem Zusammenhang vor mehr als 30 Jahren vor, die Minimal Kriterien für ein Tiermodell für Depression an den folgenden Punkten zu orientieren:

1. „vernünftige Analogie“ zum Krankheitsbild im Menschen und zur Manifestation der Symptome
2. eine objektiv zu verfolgende Veränderung des Verhaltens
3. die beobachteten Verhaltensänderungen sollen durch die gleichen Behandlungsmodalitäten rückgängig zu machen sein, die auch im Menschen wirksam sind
4. das Modell soll in verschiedenen Laboratorien robust reproduzierbar sein

Viele der Symptome der Depression (z.B. depressive Stimmung, Gefühl der Wertlosigkeit, Suizidgedanken) können nicht in Labortieren ermittelt werden. Willner (1984) verfeinerte die von McKinney und Bunney (1969) vorgeschlagenen Kriterien und schlug verschiedene Arten der Validität vor: Konstrukt-Validität (*construct validity*), phänotypische Validität (*face validity*) und prädiktive Validität (*predictive validity*).

Konstrukt-Validität richtet sich an das theoretische Konzept des Modells. Dieser Ansatz beruft sich jedoch größtenteils auf das gegenwärtige Verständnis der Depressionspathologie, die bei weitem noch nicht hinreichend ergründet ist. Hinzu kommt die enorme Schwierigkeit, die vielen Faktoren mit einzubeziehen, die in der Entwicklung einer Depression eine Rolle spielen, wie psychologische (stressvolle Lebensereignisse, negative Erfahrungen, Persönlichkeitsprofil) oder biologische Aspekte (genetische Einflüsse, physische Erkrankungen, medikamentöse Behandlungen).

Die phänotypische Validität bezieht sich auf die Ähnlichkeit zwischen dem im Tier modellierten Verhalten und den Symptomen im depressiven Menschen. Ein Modell, das mehrere Symptome gleichzeitig darstellen und erfassen kann, wird als valide eingeschätzt.

Prädiktive Validität betrifft das Ausmaß, in dem das Modell auf antidepressive Behandlung anspricht, wie sie im Mensch als effektiv beobachtet wird. Ein valides Modell sollte sensitiv und spezifisch sein, d.h. es sollte empfindlich auf den Einsatz von Antidepressiva, möglichst aber nicht auf den von unspezifischen Pharmaka reagieren. Außerdem sollte die Reaktion innerhalb eines sinnvoll entsprechenden Dosisintervalls auftreten.

Stressvolle Lebensereignisse sind Umweltfaktoren, die in vielen Fällen die Manifestation einer depressiven Episode verursachen können, wie bereits beschrieben wurde. Es ist daher denkbar, dass ein valides Depressionsmodell von einer stressinduzierten Verhaltensänderung abgeleitet werden kann. Es wird weiterhin angenommen, dass die Unkontrollierbarkeit der Stressoren ein Gefühl des Kontrollverlustes bewirkt und daher zu einem depressiven Verhalten führen könnte. Einige Tiermodelle für Depression sind aus diesen Überlegungen heraus entstanden.

Das Paradigma der erlernten Hilflosigkeit (*Learned Helplessness*) wurde erstmals von Overmier und Seligman (1967) in Hunden untersucht, wobei die Tiere unausweichlichen Elektroschocks ausgesetzt wurden. Wenn dabei der wiederholte aversive Stimulus nicht vermieden werden konnte, verzichteten sie auf das Entkommen aus der Situation, selbst wenn die Möglichkeit dazu bestand. Dieses Modell wurde in vielen Spezies (einschließlich Nagern) als reproduzierbar gefunden und scheint viele Aspekte der humanen Depression widerzuspiegeln. Das hilflose Tier zeigt Gewichtsverlust, agitiertes lokomotorisches Verhalten, Schlafstörungen, Abnahme der Libido, verschlechtertes Lernen, Veränderungen der HPA-Achse und auch Anhedonie (d.h. einen erhöhten Schwellenwert für intracraniale Selbststimulation (Zacharko & Anisman, 1991) und einen reduzierten Konsum von Zucker- beziehungsweise Saccharinlösung im Vergleich zu Kontrolltieren (Minor et al., 1994; Vollmayr et al., 2003)). Einige Studien zeigen, dass der Effekt der Hilflosigkeit auf drei Tage begrenzt ist, andere Studien berichten von einem hilflosen Verhalten, das für 7 bis 14 Tage nach der Schockexposition anhielt (Vollmayr et al., 2003; Vollmayr & Henn, 2001). Die Effekte des Stressmodells können mit einer Reihe Antidepressiva, Elektrokrampftherapie und selbst mit kognitivem Training wieder normalisiert werden (Overmier, 1968; Sherman & Petty, 1982). Jedoch entwickelten nicht alle Tiere Hilflosigkeit, die unausweichlichen Elektroschocks ausgesetzt waren.

Eine Reihe von Stressmodellen bedient sich der Manipulation in einer frühen Lebensphase der Tiere, einschließlich pränatalen Stresses, frühen postnatalen Handlings und der Trennung vom Muttertier. Alle drei Varianten führen zu neuroendokrinen und

Verhaltensstörungen, die bis ins Erwachsenenalter erhalten bleiben und die die Tiere empfindlich gegenüber Stress im späteren Leben machen. So zeigen Tiere, die solchem Stress in einer frühen Lebensphase ausgesetzt waren, eine hyperaktive HPA-Achse, Veränderungen in Neurotransmittersystemen, eine verstärkte Reaktion auf neue Umgebung und eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber erlernter Hilflosigkeit und Selbstverabreichung von Substanzen. In den meisten Fällen können diese Veränderungen durch Antidepressivabehandlung wieder normalisiert werden, wobei auch negative Befunde berichtet werden (zur Übersicht siehe Nemeroff & Vale, 2005).

Ein weiteres Stressmodell, mit dem sich die vorliegende Arbeit beschäftigen soll, verfolgt den Ansatz, dass chronisch milder Stress (CMS) in Tieren über einen längeren Zeitraum hinweg zu einem depressiven Verhaltensphänotyp führen kann. Die ursprüngliche CMS-Prozedur wurde von Willner und Kollegen gegen Ende der 1980er Jahre als ein Tiermodell für Depressionen in Ratten entwickelt (Willner et al., 1987), das sich in drei wichtigen Punkten von anderen Modellen zu jener Zeit unterschied: (1) die einen depressiven Phänotyp hervorrufenden Bedingungen waren relativ realistisch, (2) im Fokus des Modells befand sich ein Kernsymptom der Depression (Anhedonie) und (3) der Langzeitcharakter des Modells war geeignet, die Effekte von chronischer Substanzapplikation zu untersuchen (Willner et al., 1992; Willner et al., 1987). Die CMS-Prozedur bestand aus einer Weiterentwicklung von früheren Beobachtungen von Katz und Kollegen (1981), wonach Ratten, die über einen längeren Zeitraum hin einer Reihe von relativ starken Stressoren ausgesetzt wurden, ihren Konsum an süßen Trinklösungen verringerten, was mutmaßlich eine Verminderung des hedonischen Werts bedeutete und somit das Symptom der Anhedonie widerspiegeln konnte. Diese Studie war Teil einer langen Reihe von Publikationen, die sich – mit dieser einen Ausnahme – mit der Untersuchung von chronischem Stress auf die lokomotorische Aktivität der Tiere und der Normalisierung dieses Effekts durch Antidepressiva befasste (Katz, 1982). Die von Willner auf dieser Grundlage weiter entwickelte CMS-Prozedur unterschied sich von jener, die von Katz verwendet wurde, in zwei wichtigen Punkten:

Zum einen wurden aus ethischen Gründen und um eine realistischere Simulation von Alltagsstress zu erreichen, die Stressintensitäten bedeutend gesenkt. Des Weiteren wurde, da Anhedonie ein Kernsymptom der Depression ist (Änderungen der lokomotorischen Aktivität jedoch nicht), der Konsum bzw. die Präferenz für süße Trinklösungen als Hauptparameter (Endpunkt) des Modells ins Auge gefasst. Die CMS-Prozedur beinhaltete die kontinuierliche Applikation einer Reihe von milden Stressoren, wie z.B. Perioden von Futter- und Wasserdeprivation, Herabsetzung der

Umgebungstemperatur, Wechsel der Tiere, die in einem Käfig zusammen gehalten werden und Schiefstellen des Käfigs. Die Originalarbeit berichtet, dass über eine Zeitspanne von mehreren Wochen hinweg die so gestressten Ratten ihren Konsum von und ihre Präferenz für eine verdünnte Zuckerlösung allmählich verminderten, was durch chronische Behandlung mit Antidepressiva wieder normalisiert werden konnte (Willner et al., 1992; Willner et al., 1987). Die Validität des Modells konnte unterstrichen werden durch weiterführende Untersuchungen zu einem verminderten Sexual- und Aggressionsverhalten (D'Aquila et al., 1994), vermindertem Körpergewicht (Willner et al., 1996), herabgesetzter lokomotorischer Aktivität (Gorka et al., 1996), verminderter Körperpflege, Veränderungen des Schlafs (Moreau et al., 1995), veränderter Ausschüttung von Cytokinen (Grippe et al., 2003) und einer Erhöhung der HPA-Achsen-Aktivität (Willner et al., 1992). Alle diese Effekte konnten durch chronische, jedoch nicht durch akute Behandlung mit allen Klassen klinisch wirksamer Antidepressiva wieder normalisiert werden (Willner, 1997). Die Entwicklung dieser CMS-Prozedur in Ratten als Tiermodell für Depression erfüllte somit in einzigartiger Weise die Kombination der von Willner vorgeschlagenen Validitäts-Kriterien (siehe oben).

Die meisten Befunde der frühen Literatur über CMS stammen aus dem Labor, in denen die Prozedur entwickelt wurde. Dies ließ die Frage nach der Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit von CMS in anderen Arbeitsgruppen aufkommen. In den vergangenen Jahren wurde die CMS-Prozedur erfolgreich in mehreren Labors etabliert (Grippe et al., 2003; Kang et al., 2005; Konkle et al., 2003), jedoch wurde auch Kritik an mehreren Punkten geübt (Nielsen et al., 2000). Das meistdiskutierte Problem in der CMS-Literatur ist der inkonsistent auftretende anhedonische Effekt, dem eine gesamte Ausgabe der Zeitschrift *Psychopharmacology* gewidmet wurde (134, 1997). CMS, so wurde argumentiert, verursacht eine generelle Desensitivierung gegenüber belohnenden Stimuli. In einigen Studien jedoch wurde gefunden, dass eine verminderte Reaktion auf den belohnenden Reiz (das heißt Verringerung des Konsums an süßen Trinklösungen) durch Verminderung des Körpergewichts hervorgerufen werden kann (Forbes et al., 1996; Matthews et al., 1995). Andere fanden wiederum, dass die Abnahme des Zuckerkonsums in CMS-Tieren viel größer ist als die Abnahme des Körpergewichts (D'Aquila et al., 1997). Des Weiteren konnten Veränderungen des Körpergewichtes nicht in allen Fällen beobachtet werden.

Ein weiterer Kritikpunkt des CMS-Modells bezieht sich auf die Verwendung von Futter- und Wasserdeprivation im CMS-Protokoll. Diese Manipulationen waren hinreichend, um einen verminderten Konsum der süßen Trinklösungen zu verursachen (Hatcher et al., 1997). Jedoch wurden in den Experimenten der Originalprozedur sowohl

CMS- als auch Kontrolltiere dieser Futter- und Wasserdeprivation ausgesetzt, wobei die Verminderung des Konsums nur in CMS-Tieren auftrat (Valverde et al., 1997; Willner et al., 1992). In einigen Labors wurde beobachtet, dass eine CMS-induzierte Reduktion des Zucker- bzw. Saccharinkonsums begleitet ist von einer Verminderung der Präferenz für diese Lösungen (Ayensu et al., 1995; D'Aquila et al., 1997; Willner et al., 1987). In wiederum anderen Labors konnte eine Abnahme des Zuckerkonsums beobachtet werden, wohingegen die Präferenz unverändert blieb durch CMS (Forbes et al., 1996; Matthews et al., 1995). Eine Verminderung der Zuckerpräferenz durch CMS kann weiterhin auch bei unvermindertem Zuckerkonsum auftreten (De & Schreiber, 1997). Eine weitere Messmethode zur Beurteilung von Belohnungsverhalten ist die intracranielle Selbststimulation (*intracranial self-stimulation*, ICSS). Nur eine Arbeitsgruppe konnte wiederholt eine Reduktion von ICSS durch die CMS-Prozedur beobachten (Moreau et al., 1995; Moreau et al., 1992). Nielsen et al. (2000) hingegen betonten, eine CMS-induzierte Verminderung von ICSS sei als robuster Endpunkt für ein CMS-Modell genauso problematisch wie ein verminderter Konsum von Zuckerlösung. Andere physiologische Parameter, die durch das CMS-Protokoll verändert wurden, haben sich ebenfalls als inkonsistent erwiesen. So konnten einige Studien eine Erhöhung des basalen (=unter ungestressten Bedingungen erhobenen) Corticosteronplasmaspiegels in Ratten beobachten, die dem CMS-Protokoll ausgesetzt wurden (Ayensu et al., 1995; Bielajew et al., 2002), wohingegen andere eine biphasische Antwort fanden (Silberman et al., 2002), keine Veränderung (Azpiroz et al., 1999) bzw. sogar eine Verminderung der basalen Corticosteronplasmakonzentration (Murison & Hansen, 2001). Physiologische Parameter wie Körpertemperatur und Herzrate unterliegen abhängig vom Zeitpunkt und der Art der Stressapplikation großen Schwankungen (Nielsen et al., 2000). Die verschiedenen CMS-Protokolle könnten dadurch eine sehr variable Stärke aufweisen, wobei das etwaige Fehlen von erwarteten Verhaltenänderungen auf ein zu niedriges Stressniveau zurückzuführen sein könnte. Des Weiteren ist denkbar, dass die Experimentergebnisse wesentlich von den verwendeten (Ratten-)Stämmen und gar vom Tierlieferant abhängen könnten (Willner, 1997).

Bis heute gibt es keine allgemein akzeptierte Erklärung für die offensichtlichen Schwierigkeiten, das CMS-Modell robust in vielen Labors zu etablieren (Willner, 1997). Die Situation wird weiter verkompliziert durch die verschiedenen Arten, auf die CMS-Experimente durchgeführt werden. Die Qualität und Dauer der Stressoren sowie der Zeitpunkt und die Häufigkeit der Stressapplikation werden selten explizit beschrieben, und daher bleiben viele Fragen offen.

Der größte Teil der Untersuchungen in der CMS-Literatur wurde in der Ratte als Labortier durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit sollte einer Entwicklung in der Verhaltenspharmakologie Rechnung getragen werden, die verstärkt die Maus als Modellorganismus einsetzt. Historisch gesehen stand die Forschung am Tier (in erster Linie am Nagetier) im Mittelpunkt der Bemühungen zum Verständnis der neuronalen Systeme, die Emotionen vermitteln, den auftretenden pathologischen Bedingungen und wie diese therapeutisch zu beeinflussen sind. Für Jahrzehnte war hierzu die Ratte die Spezies der Wahl in der präklinischen Forschung – nicht zuletzt da Ratten einen guten Dienst verrichteten in Paradigmen, die die Säulen der modernen Verhaltenspharmakologie darstellen. Des Weiteren kam die Größe und Widerstandsfähigkeit der Ratte der Durchführung chirurgischer Eingriffe (Katheterisierung und Kanülenimplantation) entgegen und erleichterte damit (toxikologische) Tests von neuen Substanzen. Es kam jedoch im letzten Jahrzehnt, wie in anderen biomedizinischen Disziplinen, zu einem explodierenden Gebrauch von Mäusen in der neuropsychiatrischen Forschung. Die treibende Kraft hinter diesem Trend war die Entwicklung von neuartigen molekularbiologischen Technologien (z.B. *gene targeting*), die es ermöglichten, durch präzise genetische Veränderungen die neuronale Grundlage des Verhaltens zu untersuchen (Crawley, 2002; Holmes et al., 2004; Tecott, 2003). Obwohl genetische Modifikationen auch in der Ratte und selbst in höheren Säugetieren durchgeführt werden können, ist doch die Maus für diesen Zweck besonders geeignet (Joyner, 2000). Des Weiteren haben Mäuse einen praktischen und ökonomischen Vorteil, indem sie relativ leicht zu züchten und in großer Anzahl zu halten sind. Obwohl Mäuse in der Zeit vor der Anwendung solcher neuartiger Techniken bereits in der Verhaltenspharmakologie benutzt wurden, sorgte die starke Verbreitung der Gentechnologie für schnelles bzw. erweitertes Einbeziehen der Maus in die Depressionsforschung (Cryan & Holmes, 2005). Dies sollte auch für die vorliegende Arbeit Ausschlag gebend sein für die Wahl der Maus als Modellorganismus.

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Angesichts der rasanten Entwicklung der kombinatorischen Chemie, die in kürzester Zeit eine Fülle neuartiger Substanzen zur Verfügung stellen kann, der erfolgreichen Bemühungen um immer effizienteres Hochdurchsatz-Screening und in Kombination mit gentechnologischen Fortschritten der letzten Jahre (z.B. siRNA-Technologie) erhöhen sich die Anforderungen an die Verhaltenspharmakologie, der mit ihrem Instrumentarium in der Arzneistoffentwicklung zwischen Reagenzglas und der erstmaligen Anwendung im Menschen (Phase I) eine wesentliche Rolle zukommt. Im Fall der Depressionsforschung bedeutet dies den dringenden Bedarf an einem Tiermodell für Depression, das verlässlich, effizient, ökonomisch und praktikabel potentielle Arzneistoffkandidaten hinsichtlich ihrer möglichen antidepressiven Wirkung charakterisieren kann. In der vorliegenden Arbeit soll ein CMS-Modell in der Maus mit dem Konsumverhalten für süße Trinklösungen als Hauptparameter (Endpunkt) für diesen Zweck im Labor etabliert werden. Angesichts der vielen Kontroversen und Schwierigkeiten bei Entwicklung und Reproduktion der Ergebnisse der bisherigen CMS-Literatur sollte zunächst im Rahmen der Modellentwicklung eine Messmethode für das Konsumverhalten und anschließend ein praktikables CMS-Protokoll ausgearbeitet werden. Daraufhin sollten verschiedene Mausstämme in diesem Paradigma hinsichtlich ihres Konsumverhaltens, ihres angst- und depressionsbezogenen Verhaltens und veränderter physiologischer Parameter charakterisiert werden. Ferner sollte eine pharmakologische Validierung des Modells durch Applikation eines bekannten Antidepressivums erfolgen. Bei jedem einzelnen Entwicklungsschritt sollte die Praktikabilität der Durchführung sowie die Erkennung möglicher Fehlerquellen, die die Reproduzierbarkeit beeinträchtigen könnten, im Vordergrund der Bemühungen stehen.

Es ergaben sich somit folgende Fragestellungen:

- Lässt sich eine Messmethode zum Konsumverhalten entwickeln, die das Symptom der Anhedonie und des Motivationsverlusts in den verwendeten Mäusen valide widerspiegelt? Wie sind in diesem Zusammenhang mögliche systematische Fehlerquellen zu beurteilen?
- Welche Effekte hat eine unter praktikablen Gesichtspunkten zusammengestellte CMS-Prozedur in verschiedenen Mausstämmen auf deren Konsumverhalten, ihr angst- und depressionsassoziiertes Verhalten und physiologische Parameter wie Stresshormone, Körpergewicht und

depressionsrelevante Proteine? Was für einen Phänotyp erzeugt somit das entwickelte CMS-Protokoll?

- Welchen Einfluss hat die Applikation eines bekannten Antidepressivums im CMS-Modell? Wie ist die pharmakologische Validität zu beurteilen?
- Welche Aussagen lassen sich soweit treffen zur Tauglichkeit der CMS-Prozedur als Depressionsmodell? Wo sind Schwachstellen zu erkennen, und wie könnten sich diese verbessern lassen?
- Welche Schlüsse zur Gesamtbeurteilung lassen sich zu diesem CMS-Modell ziehen? Wird das CMS-Modell, soweit in dieser Arbeit entwickelt, den eingangs erwähnten Validitätskriterien für ein Tiermodell für Depression gerecht? Falls nicht, welche richtungsweisenden Befunde erbrachte die vorliegende Arbeit für weitere Untersuchungen zur Entwicklung eines Tiermodells für Depression?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Terminologie

Es werden in dieser Arbeit der Einfachheit und Einheitlichkeit halber, und um semantische Verfälschung feststehender Fachbegriffe zu vermeiden, diese (speziell im Bereich der Verhaltenstests) weitgehend im Englischen benutzt. Eine Begriffserklärung erfolgt in den entsprechenden Abschnitten in diesem Kapitel.

### 2.2 Tiere und Tierhaltung

Die Untersuchungen wurden ausschließlich mit männlichen Mäusen durchgeführt. D2Ola-, BL/6J-, Balb/c-, FVB- und NMRI-Mäuse wurden von Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland bezogen. Ebenso die in Experiment 5 im *Submissive Test* (s. Kap 2.4.2c)) genutzten CD1-Mäuse. BL/6N- und D2Jlco-Mäuse stammten von Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland.

	Verwendeter Mausstamm	Alter bei Ankunft	Alter zu Beginn der Stressperiode
Experiment 1	<b>D2Ola &amp; BL/6J</b>	14 Wochen	9 Monate
Experiment 2	<b>D2Ola</b>	7 Wochen	12 Wochen
Experiment 3	<b>BL/6J &amp; Balb/c</b>	7 Wochen	12 Wochen
Experiment 4	<b>FVB &amp; NMRI</b>	8 – 9 Wochen	21 Wochen
Experiment 5	<b>BL/6N</b>	12 – 14 Wochen	17 Wochen
Experiment 6	<b>D2Jlco</b>	5 Wochen	7 Wochen
Experiment 7	<b>BL/6J</b>	5 Wochen	9 Wochen
Experiment 8	<b>BL/6J</b>	5 Wochen	7 Wochen

Nach Ankunft wurden die Tiere einzeln in Macrolon® Typ III Käfigen (21 x 16 x 15 cm) unter Standardbedingungen (Temperatur  $21 \pm 1$  °C; rel. Luftfeuchtigkeit 40-60%; freier Zugang zu Futter und Wasser; 12 h Licht-/12 h Dunkelphase) gehalten. Die Tierkäfige wurden einmal pro Woche jeweils am gleichen Wochentag gewechselt, außerdem dann, wenn die verwendete Stressprozedur es verlangte (z.B. *wet cage*-Stressor). Es wurde zwischen Käfigwechsel und Verhaltenstests (Ausnahme: Konsumverhalten) immer ein zeitlicher Abstand von mindestens 2 Tagen eingehalten, um Einflüsse der neuen Umgebung auf den jeweiligen Test zu minimieren.

### 2.3 Experimentelles Design

Die vorliegende Arbeit basiert auf 7 Langzeitexperimenten (Experiment 1 bis Experiment 7). Jedes dieser Experimente besteht aus den Abschnitten (a) Eingewöhnungsphase für die Tiere (teilweise wurden auch Vorversuche zur Modelloptimierung hierin durchgeführt), (b) Stressprozedur und (c) finale Verhaltenstests.

In der Eingewöhnungsphase wurden die Tiere für mindestens zwei Wochen an die Haltungsräume und die Trinkflaschen für Präferenztests gewöhnt. Es wurde das basale (=unter stressfreien Bedingungen erfasste) Konsumverhalten ermittelt, das als Grundlage für die gleichmäßige Aufteilung der Individuen in die Gruppen für die Stressprozedur diente. Die Konsumparameter der letzten 2 Wochen der Eingewöhnungsphase wurden dabei als Einteilungskriterium verwendet.

Es wurde eine Stressprozedur ausgearbeitet, die in den Experimenten 1 bis 6 angewandt wurde. In Experiment 7 wurde der Lichtstress als einzelner Stressor der wöchentlichen Standardprozedur genauer untersucht, somit nur dieser verwendet. Während aller dieser Abschnitte wurde zweimal pro Woche (Mo und Do) das Konsumverhalten ermittelt, in Experiment 1 zur Methodenentwicklung dreimal pro Woche (Mo, Mi, Fr), Details dazu siehe Kapitel zur Methodenentwicklung.

Zur genaueren Untersuchung der Befunde aus Experiment 7 wurde ein weiteres (Experiment 8) durchgeführt (siehe Kapitel 4), jedoch kürzer und ohne chronisches Stressparadigma, weshalb es nicht in die Reihe der Langzeitexperimente einzuordnen ist. Die Zusammenstellung der Verhaltenstests am Anfang und Ende jedes Experiments richtete sich nach den spezifischen Fragestellungen.

#### Übersicht der verwendeten Mausstämme und Verhaltenstests

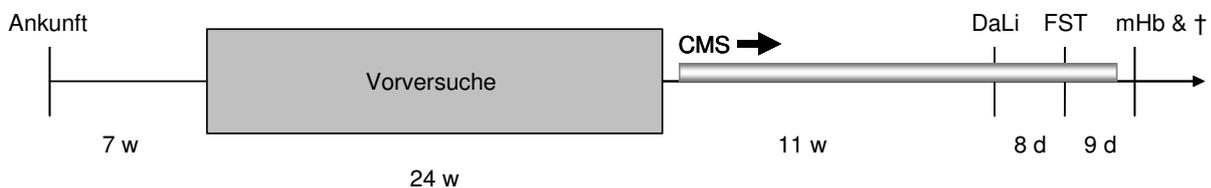
	Verwendeter Mausstamm	Verhaltenstests vor CMS	Verhaltenstests nach CMS
Experiment 1	<b>D201a &amp; BL/6J</b>	---	DaLi, FST, mHb
Experiment 2	<b>D201a</b>	DaLi (vor Paroxetin-Behandlung)	DaLi, OF, FST 1+2
Experiment 3	<b>BL/6J &amp; Balb/c</b>	DaLi	FST
Experiment 4	<b>FVB &amp; NMRI</b>	EPM, FST	OF, FST
Experiment 5	<b>BL/6N</b>	DaLi, EPM, OF, SD	DaLi, EPM, OF, FST, mHb
Experiment 6	<b>D2Jlco</b>	---	mHb, FST
Experiment 7	<b>BL/6J</b>	---	EPM, OF, FST

Im zusätzlichen Experiment 8 wurden BL/6J-Mäuse in ihrem Aktivitätsprofil untersucht, nachdem sie subchronisch mit 2 Stressoren aus dem Standardprotokoll (Kap. 2.4.1) behandelt wurden, Details siehe Kapitel 4.

Experiment 5 enthielt weitere BL/6N-Tiere, mit denen vergleichende Untersuchungen zu einem Stressmodell von Strekalova et al. (2004) durchgeführt wurden. Deren Ergebnisse gingen nicht in die vorliegende Arbeit mit ein, das Versuchsdesign erforderte jedoch auch für die im Folgenden behandelten 2 Versuchsgruppen zwei Anpassungen der Standardprozedur. Zum einen wurde Zuckerlösung (1%ig) anstatt Saccharinlösung für die Konsummessungen verwendet, zum anderen ein *Submissive Test* durchgeführt, wie er in Kapitel 2.4.2c) kurz skizziert wird. Die Relevanz bezüglich der vorliegenden Arbeit besteht nur in einer erweiterten Stressvorerfahrung der Tiere.

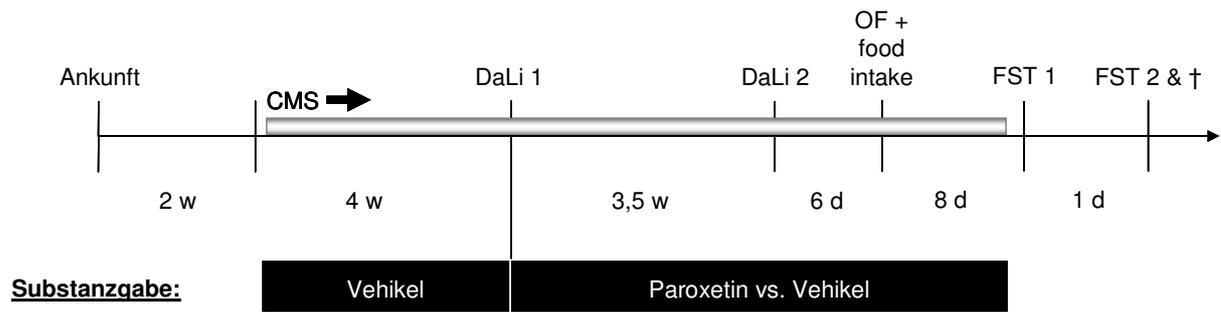
Folgende Abbildungen geben einen Überblick über das Design und den zeitlichen Ablauf der einzelnen Experimente. Erläuterungen finden sich im Abbildungstext.

### **Experiment 1**



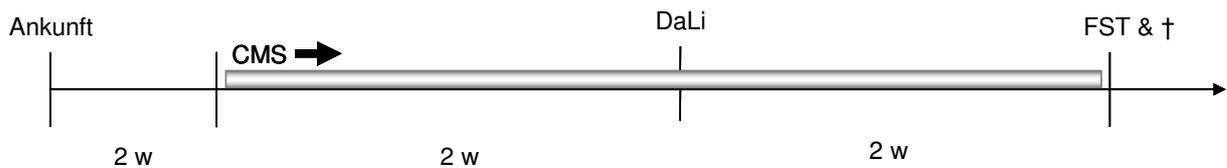
**Abbildung 2.1:** Experiment 1 wurde mit je 24 D201a- und BL/6J-Mäusen durchgeführt, für jeden Stamm zu Beginn der CMS-Phase aufgeteilt in je eine CMS- und eine ungestresste Kontrollgruppe. Für die Verhaltenstests DaLi, FST und mHb wurde die CMS-Prozedur für den jeweiligen Testtag ausgesetzt. Die Beleuchtungsbedingungen von DaLi und mHb entsprachen wie in Kap. 2.5 angegeben, der FST Test fand bei normaler Haltungsraumbeleuchtung statt.

## Experiment 2



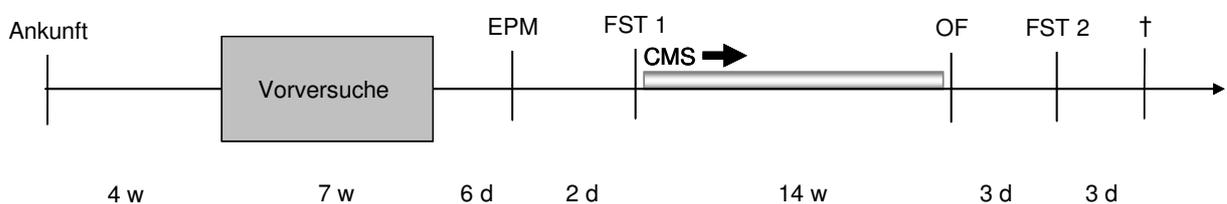
**Abbildung 2.2:** Experiment 2 wurde mit 40 D20la-Mäusen durchgeführt, zu Beginn der CMS-Phase aufgeteilt in eine CMS- und eine ungestresste Kontroll-Gruppe (je 20 Tiere). 10 Tiere der CMS-Gruppe bekamen nach 4 Wochen Vehikelbehandlung Paroxetin als Antidepressivum, die anderen 10 Tiere der CMS-Gruppe wurden weiterhin mit Vehikel behandelt. Die Stressprozedur wurde für die Testtage von DaLi II und OF unterbrochen und einen Tag vor FST I beendet. DaLi I und II wurden bei entsprechender Beleuchtung (s. Kap 2.5) durchgeführt, OF bei 30 lx, FST I und II bei Raumbeleuchtung.

## Experiment 3



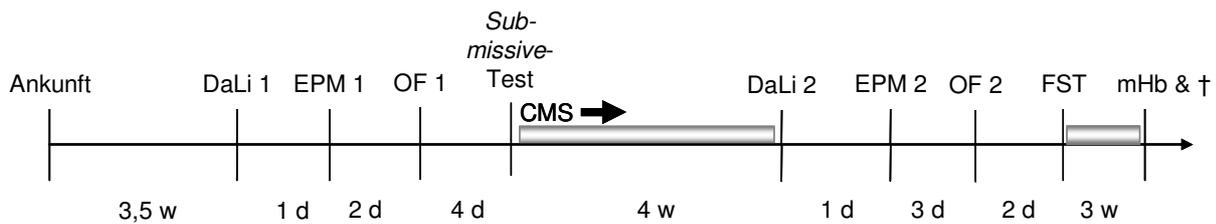
**Abbildung 2.3:** Experiment 3 wurde mit je 20 BL/6J- und Balb/c-Mäusen durchgeführt. Vor der CMS-Phase wurden die Tiere jeweils in Gruppen zu 10 in CMS- und Kontrolltiere eingeteilt. Am Tag des DaLi-Versuchs wurde CMS ausgesetzt und am Tag vor FST beendet. Der FST-Test fand im Hellen statt.

## Experiment 4



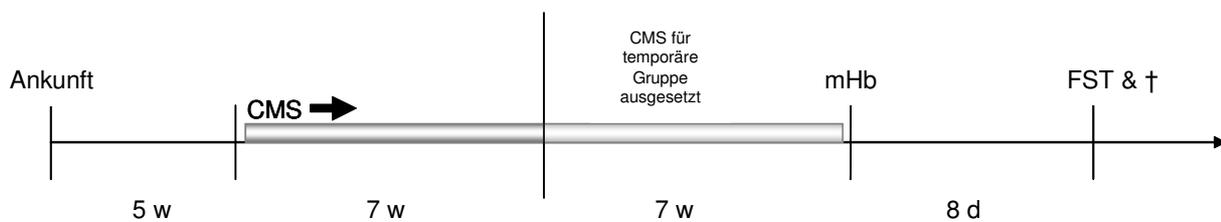
**Abbildung 2.4:** Experiment 4 wurde mit je 24 FVB- und NMRI-Mäusen durchgeführt, die in Gruppen von 8 zu Beginn der CMS-Phase eingeteilt wurden: jeder Mausstamm in eine Gruppe, die der CMS-Standard-Prozedur folgte, in eine zweite Gruppe, die ebenfalls dem CMS-Protokoll folgte, bei der aber der Lichtstress weggelassen wurde, und in eine ungestresste Kontrollgruppe. Alle Verhaltensversuche fanden zu Beginn der Dunkelphase unter Rotlichtbedingungen statt. Der CMS endete einen Tag vor dem OF-Test.

### Experiment 5



**Abbildung 2.5:** Experiment 5 wurde mit 40 BL/6N-Mäusen durchgeführt, die zu Beginn der CMS-Phase in Gruppen zu 20 Tieren aufgeteilt wurden: eine CMS-Gruppe, die dem Standardprotokoll nach gestresst wurde und in eine ungestresste Kontrollgruppe. Vor DaLi 2 wurde die Kontrollgruppe weiter unterteilt in 10 Tiere, die weiter in Verhaltensexperimenten getestet wurden, und in 10 solche, die von da an völlig ungestört gehalten wurden. In der Woche der Tests DaLi 2, EPM 2, OF 2 und FST wurde die Stressprozedur ausgesetzt und für weitere 3 Wochen zwischen FST und mHb angewandt. Der Stress endete einen Tag vor dem mHb-Test. Alle Verhaltenstests bis auf mHb (dort Beleuchtungsstärke 30 lx) fanden zu Beginn der Dunkelphase unter Rotlichtbedingungen statt.

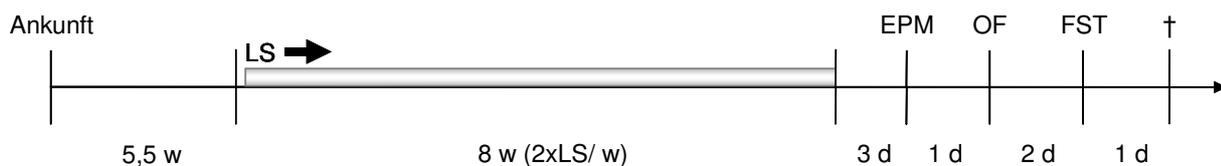
### Experiment 6



**Abbildung 2.6:** Experiment 6 wurde mit 72 D2Jlco-Mäusen durchgeführt. Nach 5 Wochen Habitationsphase mit Messungen des basalen Flüssigkeitskonsums wurden die Tiere auf diesem basierend gleichmäßig in 3 Gruppen aufgeteilt: in (a) 24 Tiere, die für 14 Wochen dem CMS-Standardprotokoll gemäß gestresst wurden, (b) 24 Tiere, die nur 7 Wochen gestresst wurden, danach ebenso ungestresst gehalten wurden wie (c) die dritte Gruppe der 24 Kontrolltiere.

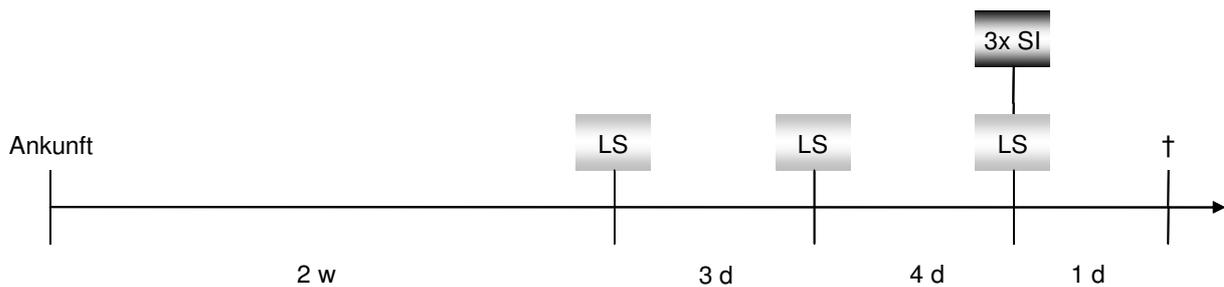
Für die beiden Verhaltensexperimente mHb und FST wurden alle 3 Gruppen nochmals unterteilt in jeweils Tiere, die akut vor den Tests *Restraint Stress* (s. Kap. 2.4.2) durchliefen und in Tiere, die akut ungestresst getestet wurden. Die CMS-Gruppen wurden dazu halbiert, die Kontrollgruppe gedrittelt, um mit der dritten Untergruppe bis zum Ende von Experiment 6 acht völlig stressnaive Tiere mitführen zu können. Diese Tiere wurden weder im mHb noch im FST getestet. Die Lichtbedingungen der beiden Tests – beide zu Beginn der Dunkelphase durchgeführt – entsprachen für mHb 30 lx, für den FST wurde Rotlicht gewählt.

### Experiment 7



**Abbildung 2.7:** Experiment 7 wurde mit 76 BL/6J-Mäusen durchgeführt, die nach 5,5 Wochen (wiederum basierend auf ihrem basalen Flüssigkeitskonsum) in zwei Gruppen eingeteilt wurden: in 40 Tiere, die dem Lichtstress wie in Kap. 2.4.1 beschrieben ausgesetzt wurden, und in 36 Kontrolltiere, die ungestresst mit ungestörtem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten wurden.

## **Experiment 8**



**Abbildung 2.8:** Experiment 8 wurde mit insgesamt 30 BL/6J-Mäusen durchgeführt, die nach der zweiwöchigen Habituationsphase in 3 Gruppen zu je 10 Tieren eingeteilt wurden: eine Versuchsgruppe erhielt in einer Woche insgesamt 3x den Lichtstimulus (LS) über Nacht (siehe Abbildung), eine weitere Versuchsgruppe wurde einen Tag vor dem Experimentende 3x der *Social Interaction*-Prozedur (SI) unterworfen, und die restlichen 10 Tiere dienten als ungestresste Kontrolle. Jeweils die Hälfte der Versuchsgruppen (5 Tiere) wurde in der Licht- bzw. in der Dunkelphase (mit 6h zeitlichem Abstand) getötet und die Per1-Expression im SCN untersucht.

## **2.4 Stressparadigmen**

### **2.4.1 Chronic Mild Stress-Prozedur**

Die sich im wöchentlichen Turnus wiederholende CMS-Prozedur beinhaltet folgende Komponenten:

Repeated Cold Stress (Willner et al., 1987): Die Mäuse wurden samt ihren Käfigen für 30 min in einen 4°C-Kühlraum gebracht, dort in Ruhe stehen gelassen und nach Ablauf dieser Zeit für 30 min in den Haltungsraum zurückgebracht. Diese Prozedur wurde insgesamt 3mal hintereinander durchlaufen.

Space Reduction (Casarotto & Andreatini, 2007): Mittels einer Trennwand wurde der Platz im Heimkäfig für jede Maus auf ca. 5 x 10 x 15 cm begrenzt. Der Zugang zu Wasser und Futter war weiterhin ungehindert möglich.

Cage Tilt (Willner et al., 1987): Die Käfige der Mäuse wurden so über Nacht in eine Schiefelage (45°) gebracht, dass die Tiere noch gut Zugang zu Futter und Wasser hatten.

Air Puff: Aus einer Sprühdose mit hochreiner Pressluft (Conrad Electronics, Hirschau, D) wurde in Abständen von je ca. 2s drei ca. 1s lange Luftsprühstöße (Air Puffs) auf die Tiere gerichtet. Nach 30 min und 60 min wurde diese Prozedur wiederholt.

Foreign room: Die Tiere wurden für 2h (dienstags) bzw. von Freitagabend bis Montagmorgen in ihren Käfigen in einen fremden Haltungsraum ohne andere Tiere gebracht.

Wet Cage (Willner et al., 1987): Die Käfigeinstreu der Tiere wurde mit 220 mL lauwarmem Leitungswasser befeuchtet, über Nacht so belassen und der gesamte Käfig am nächsten Morgen gegen einen frischen ausgewechselt.

Empty Cage (Mineur et al., 2003): Die Tiere erhielten für 2h einen Käfig ohne Einstreu.

Social Interaction (SI): Die zu stressenden Tiere wurden für jede Woche zufällig in Zweierpärchen eingeteilt. Diese wurden zusammen in einen Macrolon Typ II Käfig (21 x 30 x 15 cm) gesetzt, wo sie maximal 5 min Kontakt miteinander haben konnten, bevor sie mit einer Alulochplatte (Lochdurchmesser 7 mm, Dicke 2 mm) als Trennwand voneinander in die Käfighälften separiert wurden. Bei der ersten Attacke einer der Mäuse gegen die andere wurden sie sofort voneinander getrennt. Daraufhin folgte eine 15minütige Phase, in der die Tiere nur Blick- und Riechkontakt durch die Trennwand hatten. Abschließend wurden die Tiere wie oben beschrieben erneut 5 min ohne Trennwand in direktem Kontakt belassen. Die Heimkäfige der Mäuse eines Zweierpärchens wurden für die darauf folgende Nacht vertauscht, so dass jedes Tier seine Aktivitätsphase in einem fremden Käfig verbrachte. Am Folgetag wurde die gesamte beschriebene Prozedur (5 min Interaktion – 15 min Pause – 5 min Interaktion) mit denselben Paarungen wiederholt.

White Noise (Willner et al., 1987): Für 4h wurden die Mäuse einem lauten (85 dB) weißen Rauschen ausgesetzt, das randomisiert durch kurze Perioden der Stille im Zeitverhältnis Rauschen/Stille = 1:5 unterbrochen war.

Strobe (Willner et al., 1987): Mittels eines kleinen 45 W-Stroboskops (Conrad Electronics, Hirschau, D) wurden 120 Blitze weißes Licht pro Minute im dunklen Tierraum erzeugt.

Lights On (Lichtstress, LS, (Willner et al., 1987)): Das Raumlicht wurde die gesamte Aktivitätsphase (Dunkelphase) der Tiere hindurch an gelassen.

Pause: Keine Stressprozedur wurde durchgeführt, die Tiere verblieben die entsprechende Zeit in einem anderen Raum als die ungestressten Kontrollen.

Zusätzlich zu diesen in CMS-Experimenten üblicherweise verwendeten Stressoren wurden während der Etablierungsphase (Experiment 1) drei zusätzliche Stressoren untersucht, im Weiteren jedoch nicht mehr angewandt: Präsentation von 1. unerreichbarem Futter, 2. unbekanntem Duft und 3. Duft eines Fressfeindes (Katze).

Die oben aufgeführten Stressoren wurden unter Berücksichtigung der Möglichkeiten der technischen Umsetzung, der Minimierung störender Interaktionen mit z.B. Verhaltenstests und der Maximierung des angestrebten Readouts in einen wöchentlichen Plan gefasst. Die Stressoren waren in diesem zeitlich genau festgelegt, um

eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit des CMS der einzelnen Experimente zu gewährleisten. Im Gegensatz zu anderen CMS-Modellen, in denen die Stressoren randomisiert gesetzt wurden, wurde in dieser Arbeit auf Einheitlichkeit des Stressplans geachtet, um mögliche stressorspezifische Effekte eher erkennbar zu machen (z.B. Einfluß des Lichtrhythmus' im CMS-Wochenplan, s. Kapitel 4). In Experiment 1 wurde eine vorläufige Fassung jenes Plans angewandt (u.a. 3mal pro Woche Konsummessung), die nach Optimierung – Stressoren, die eher ineffektiv erschienen, wurden ersetzt bzw. entfielen – in die so genannte „Standardstressprozedur“ der Experimente 2 bis 6 mündete.

Zeit	Mo	Di	Mi	Do	Fr	Sa	So
0	Lights On	Space Reduction	Wet Cage	Foreign Cage	Cage Tilt	Sound	Pause/Changed Room
1							
2							
3						Pause/Changed Room	
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10		Changed Room			Empty Cage		
11	Repeated Cold Stress						
12			Social Interaction	Social Interaction			
13		Air Puff			Change Room		
14			Foreign Cage				
15	Konsummessung	Wet Cage		Konsummessung			
16							
17	Space Reduction			Cage Tilt			
18					Sound		
19							
20							Lights On
21							
22					Strobe		
23							
24							

**Abbildung 2.9: Standard-Stressprotokoll**

Das Standard-Stressprotokoll, wie es ab Experiment 2 angewandt wurde.

### 2.4.2 Akuter Stress

Als nur außerhalb des CMS-Protokolls vorkommende akute Stressoren wurde *Restraint Stress* und *Inescapable Footshock* verwendet (Swiergiel et al., 2008). Mit ihnen sollte die Stressreaktivität der CMS-Tiere untersucht werden.

#### a) *Restraint Stress*

Als Paradigma für akuten Stress wurden im *Restraint Stress* die Tiere in Plastikröhrchen (50 mL Falcon Tube, Durchmesser 29 mm, VWR, Ismaning, D) für 2h immobilisiert. Diese wurden zur Belüftung mit mehreren Löchern (Durchmesser ca. 5 mm) versehen.

#### b) *Inescapable Footshock*

*Inescapable Footshock* folgte einem Standardprotokoll (Kamprath & Wotjak, 2004) mit einem Stromstoß der Stärke 0,7 mA und einer Dauer von 2s. Dieser akute Stressor wird als einzelnes traumatisches Ereignis in z.B. der Erforschung der Post-traumatischen Belastungsstörung (PTSD) verwendet, wird somit zu den starken Stressoren gezählt und hat nachhaltige Auswirkungen in Bezug auf Ängstlichkeit und Aktivität (Siegmond, 2006). Die Mäuse wurden hierbei für insgesamt 180s in eine geschlossene Schockkammer mit Metallgitterboden (ENV-307A, 19 x 14 x 30 cm, MED Associates, St. Albans, USA) gesetzt, der 2s dauernde *Footshock* wurde nach 118s ausgelöst. Als Stromstoßgenerator wurde der ENV-414 verwendet (MED Associates, St. Albans, USA). Die Kammer war absolut dunkel, Kontrollmäuse verbrachten ebenfalls 180s darin, allerdings ohne Applikation eines Stromstoßes. Die Prozedur des *Inescapable Footshocks* wurde zu Beginn der Dunkelphase durchgeführt. Sie diente zur Untersuchung der Auswirkungen von einem akuten, starken Stressor im Kontext des CMS.

#### c) *Submissive Test*

In Experiment 5 wurde mit den verwendeten BL/6N-Tieren im Rahmen von vergleichenden Untersuchungen mit einem anderen Stressmodell, die keinen Eingang in die vorliegende Arbeit fanden, ein Test zur Untersuchung von submissivem Verhalten (*Submissive Test*) nach dem Protokoll von Strekalova et al. (2004) durchgeführt. Die BL/6N-Tiere wurden dazu 30 min an einen neuen Käfig habituiert und ihnen anschließend für weitere 8 min ein gleich altes CD1-Männchen in den Käfig gesetzt. Die Relevanz für die vorliegende Arbeit bestand lediglich in einer um diese Prozedur erweiterten Stressvorerfahrung (auch für Kontrolltiere).

## 2.5 Verhaltenstests

### 2.5.1 *Dark/Light Box Test (DaLi)*

Im *Dark/Light Box*-Versuch ist das Tier einem Konflikt zwischen zwei Verhaltensweisen ausgesetzt: zum einen ist es bestrebt, die unbekannte Umgebung zu explorieren, zum anderen besteht eine Aversion gegenüber hell beleuchteten Arealen. Exploriert ein Tier den hellen Bereich der *Dark/Light Box* häufiger bzw. länger, wird dies als geringere Ängstlichkeit interpretiert. Die benutzte Apparatur bestand aus zwei Kompartimenten (dunkel: 15 x 20 x 25 cm, hell: 30 x 20 x 25 cm, beide nach oben offen), die durch einen Tunnel miteinander verbunden waren. Das helle Abteil bestand aus weißem PVC und wurde mit 680-720 lx Kaltlicht gleichmäßig ausgeleuchtet, das dunkle Abteil bestand aus schwarzem Kunststoff und war bis auf 3 lx (Rotlicht) abgedunkelt. Zu Versuchsbeginn wurde die Maus mit Blickrichtung zum hellen Kompartiment in das dunkle Abteil gesetzt und ihr Verhalten in den darauf folgenden 5 min mit der Software ANY-maze (Stoelting, Wood Dale, USA) aufgezeichnet. Für die einzelnen Kompartimente wurde jeweils die Zeit, die sich das Tier darin befand, die Latenz bis zum Eintritt und die Anzahl der Eintritte ausgewertet. Bezüglich des hellen Kompartiments wurden die Parameter der Verhaltensdimension Ängstlichkeit zugeordnet, die Anzahl der Eintritte ins dunkle Kompartiment stellt einen – wenn auch im Vergleich zur Laufstrecke im *Open Field* verglichen nicht sehr aussagekräftigen – Parameter für lokomotorische Aktivität in der *Dark/Light Box* dar.

### 2.5.2 *Forced Swim Test (FST)*

Das erzwungene Schwimmen (*Forced Swimming*, FST) wird als akuter Verhaltenstest für depressionsähnliches Verhalten verwendet, stellt dabei eine für das Tier lebensbedrohliche Situation und daher einen starken physischen wie psychischen Stressor dar. Die Mäuse wurden in einem 2 L-Becherglas (Durchmesser 12 cm, bis 12 cm Höhe mit  $26 \pm 0,5$  °C warmem Leitungswasser gefüllt) für 5 Minuten schwimmen gelassen. Dabei war für die Tiere weder ein Entkommen aus dem Glas noch die Berührung des Glasbodens möglich. Nach 5 Versuchsdurchgängen wurde das Wasser gewechselt. Ein kleiner Rest des verschmutzten Wassers wurde dabei zurückgegossen, um die Wasserverschmutzung für alle Tiere möglichst gleich zu halten. Es wurden Anzahl, Latenz und die Zeiten der folgenden drei Parameter während eines 5 Minuten dauernden Tests durch Verhaltensbeobachtungen mittels der ANY-maze Software

(Stoelting, Wood Dale, USA) manuell erfasst, wenn auch in dieser Arbeit nur die Zeiten, die die Tiere mit den Verhaltensweisen verbrachten, gezeigt wird:

Struggling: Dieser aktive Versuch, der Situation zu entkommen, zeigt sich als heftige, stoßweise Bewegung aller vier Pfoten, wobei die Vorderpfoten an der Glaswand den Wasserspiegel durchbrechen. Das Tier befindet sich in einer eher senkrechten Körperhaltung.

Floating: Die Maus lässt sich ungerichtet im Wasser treiben, zeigt kein exploratives Verhalten, einzelne Bewegungen dienen nur dazu, den Kopf über Wasser bzw. das Gleichgewicht zu halten. *Floating* wird als behavioural despair interpretiert, die Maus gibt also ihre Versuche auf, aus dem Becherglas zu entkommen. Vermehrtes *Floating* wird als depressionsähnliches Verhalten interpretiert.

Swimming: Als *Swimming* wird jede Form der Bewegung im Wasser gewertet, die zwischen den beiden oben stehenden extremen Verhaltensweisen einzuordnen ist.

### 2.5.3 Open Field Test (OF)

Der *Open Field Test* (OF) dient zur Erfassung von lokomotorischer Aktivität auf einer hindernislosen Fläche gleichmäßiger Ausleuchtung. Die verwendete Apparatur bestand aus einer quadratischen Box aus hellgrauem PVC (Seitenlänge 50 cm) mit 30 cm hohen Wänden. Die Tiere wurden zu Beginn des 30minütigen Tests in eine Ecke mit Blick in Richtung des Zentrums der Box gesetzt und ihre Lokomotion mit Hilfe der ANY-maze-Software (Stoelting, Wood Dale, USA) über eine Videokamera aufgezeichnet und ausgewertet. Bis auf Experiment 2 wurde der OF-Test bei Rotlicht durchgeführt.

Zur differenzierteren Beurteilung des Explorationsverhaltens im OF von Experiment 2 wurde zusätzlich und in einer kleineren Apparatur (30 cm Seitenlänge, 30 lx Beleuchtungsstärke) untersucht, ob die Mäuse unterschiedlich auf die Präsentation von bekanntem Futter (Haferflocke) im Vergleich zu unbekanntem Futter (Mandelsplitter) reagieren. Dazu wurden symmetrisch zur Diagonalen im Abstand von 6/3 cm bzw. 3/6 cm (X/Y-Koordinaten von der Ecke aus gemessen) zu einer Ecke des OFs je eine Haferflocke bzw. ein Mandelsplitter gelegt. Die Mäuse wurden wie in Kap. 2.6 beschrieben die 2 Tage vor dem Test mit Hilfe der Aluminiumschälchen an Haferflocken gewöhnt. Während dieser Gewöhnungszeit wurden 2x täglich die Latenzen vom Einstellen des Schälchens bis zum ersten Futterkontakt bzw. bis zum Verzehr ermittelt. Dabei konnte sichergestellt werden, dass es sich danach tatsächlich um bekanntes Futter handelte. Im OF Test wurden die Mäuse zu Beginn in die dem Futter abgewandte Ecke

mit Blick in Richtung Futter gesetzt und zusätzlich zu lokomotorischen Parametern die Latenzen für erste Exploration und Fressen des jeweiligen Futters ermittelt.

#### **2.5.4 *Elevated Plus Maze Test (EPM)***

Im *Elevated Plus Maze Test* (EPM) wird auf angstassoziiertes Verhalten getestet. Ähnlich der *Dark/Light Box* wird auch hier sowohl die Aversion als auch der Explorationstrieb von Mäusen einem Areal des Versuchsaufbaus gegenüber ausgenutzt, um Aussagen über Ängstlichkeit der Tiere treffen zu können. Die Apparatur des EPM besteht aus einer kreuzförmigen Fläche (Größe eines Arms: 5,5 x 27,5 cm, Größe der Fläche im Zentrum: 5,5 x 5,5 cm) aus dunkelgrauem PVC, die 60 cm über dem Boden auf einem Stativ befestigt ist. Zwei gegenüberliegende Arme sind mit 15 cm hohen Wänden aus dem gleichen Material versehen, die zwei anderen Arme sind offen und stellen das exponierte Areal dar. Zu Beginn des fünfminütigen Tests wurden die Mäuse mit Blick in Richtung des geschlossenen Arms auf die mittlere Plattform gesetzt und ihr Verhalten mit Hilfe der ANY-maze Software (Stoelting, Wood Dale, USA) aufgezeichnet und ausgewertet. Als Verhaltensparameter wurden folgende erfasst:

% Eintritte offene Arme (=Anzahl der Eintritte offener Arm/Gesamtanzahl der Eintritte in die Arme) und % Zeit offene Arme (=Zeit auf dem offenen Arm/ Gesamtzeit auf allen Armen) sind übliche, zusammengesetzte Parameter, die eine Aussage über die Ängstlichkeit der Tiere erlauben. Als Parameter zur groben Einschätzung der lokomotorischen Aktivität der Tiere im EPM wurde die Anzahl der Eintritte ins Zentrum der Apparatur ausgewertet.

#### **2.5.5 *Modified Holeboard Test (mHb)***

Das *Modified Holeboard* (mHb) stellt eine Kombination aus dem klassischen *Holeboard* (File & Wardill, 1975) und einem *Open Field Test* dar, vereinigt somit einen Test primär für Explorationsverhalten mit einem Test für Lokomotion. Der hier verwendete Test wurde durch Ohl et al. (2001b; 2001a) mehrfach modifiziert und bietet ein umfassendes Verhaltens-Readout. Die Apparatur bestand aus einer großen Box aus dunkelgrauem PVC (100 x 50 cm), die über 50 cm hohe Wände aus dem gleichen Material verfügte. In ihrer Mitte wurde ein Brett („*Board*“, 70 x 20 x 0,5 cm) mit 12 Zylindern (2 cm Höhe, Ø 3 cm) platziert. Diese waren in 2 Reihen regelmäßig angeordnet. Die Apparatur wurde mit 60 lx Lichtstärke gleichmäßig ausgeleuchtet. Ein Testdurchlauf dauerte 5 Minuten, die

Tiere wurden zu Beginn in eine Ecke mit Blick in Richtung *Board* gesetzt. Längerer Aufenthalt auf dem zentralen, exponierten *Board* wurde mit erhöhter Exploration und erniedrigter Ängstlichkeit assoziiert. Die Aufnahme und Auswertung des Tests geschah mit Hilfe der ANY-maze Software, teilweise manuell (Verhaltensweisen) oder automatisiert (Lokomotion). Die ermittelten Verhaltensparameter wurden wie folgt verschiedenen Verhaltensdimensionen zugeordnet:

Ängstlichkeit:

*Zeit Board:* Die Zeit, die die Tiere auf der zentralen Fläche der Apparatur verbrachten, wurde in indirektem Verhältnis zu ihrer Ängstlichkeit interpretiert (siehe auch *Open Field-Test*).

Risikoabschätzungsverhalten:

*Stretching* (auch *Stretched Attend Postures, SAP*): Das Tier bleibt mit seinen Hinterpfoten am Platz stehen und streckt sich vorwärts, die Vorderpfoten gehen ein Stück mit, der Kopf wird vorgestreckt.

Exploration:

*Rearing:* So genanntes *Rearing*-Verhalten bedeutet das Aufstellen auf die Hinterpfoten, meist mit Anlehnung an eine Wand und wird als ungerichtetes Explorationsverhalten gedeutet. Es wurde die Häufigkeit dieser Verhaltensweise ausgewertet.

*Hole Exploration:* Die Exploration der Zylinder des *Boards* wird als gerichtetes Explorationsverhalten interpretiert. Es wurde die Häufigkeit dieser Verhaltensweise ausgewertet.

Lokomotorische Aktivität (Lokomotion):

Zurückgelegte Laufstrecke im mHb.

### 2.5.6 Konsumverhalten

Die Messung des Konsumverhaltens umfasste nur die Flüssigkeitsaufnahme von Wasser und Saccharin- bzw. Zuckerlösungen, da die Ermittlung der gefressenen Futtermenge sich als zu ungenau erwiesen hat. Die Tiere hatten in ihrem Heimkäfig ständigen Zugang zu Futter und Wasser. Alle Trinklösungen wurden in zylindrischen 100 mL-Flaschen aus Macrolon (Tecniplast, Hohenpeißenberg, D) mit einem Gummistopfen (36 x 44 x 40 mm, VWR, Ismaning, D) mit Glaskapillare (80 x 7 mm, Durchmesser Spitze 3 mm, Extraanfertigung MPI für Biochemie, Martinsried) angeboten. Mittels Differenzwägung (Waage TE412, Sartorius AG, Göttingen, D) unmittelbar vor und nach den

Messintervallen wurde nach Korrektur um einen nicht zu vermeidenden Tropffehler eine hinreichend genaue Ermittlung der getrunkenen Menge erreicht. Die Flaschen wurden mit der entsprechenden Flüssigkeit befüllt, die Kapillaren entlüftet und die Flaschen gewogen. Zur Abschätzung des Tropffehlers wurde pro Rack ein Leerkäfig mitgeführt, in den Referenzflaschen eingelegt wurden. Aus der Differenz der Ein- und Auswaage ergab sich der mittlere Tropffehler (0,1 mL). Die entsprechend vorbereiteten Flaschen wurden im Messzeitraum in die Futterraufen der Käfige vorsichtig eingelegt.

### **2.5.7 Langzeitmessung der Aktivität im Heimkäfig**

Um die Aktivität der Tiere über 24h in ihrem Heimkäfig zu messen wurden kleine CCD-Kameras (Conrad Electronics, Hirschau, D) neben den Käfigen montiert und die Bewegung der Mäuse zweidimensional in Seitenansicht aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ANY-maze Software. Es wurden die zurückgelegte Distanz, *Rearing* und Klettern am Käfigdeckel in einer zeitlichen Auflösung von 1h-Intervallen erfasst. Aufgrund der engen Abhängigkeit dieser Parameter voneinander wird in dieser Arbeit nur die im Heimkäfig zurückgelegte Laufstrecke der Tiere als Maß für lokomotorische Aktivität gezeigt.

## **2.6 Pharmakologische Behandlung mit Paroxetin**

Paroxetin in Form des Hydrochlorids aus kommerziell erhältlichen Tabletten (Seroxat, GlaxoSmithKline, Brentford, UK) wurde den Mäusen mittels einer Knopfkanüle (Ernst Kratz Nadelfabrik, Acufirm, 6cm Länge, Dreieich, D) 2x täglich intragastral verabreicht. Es wurde eine halbe 20 mg Tablette in 10 mL Wasser täglich frisch homogen suspendiert, die Dosierung davon betrug 100  $\mu$ L pro 10 g Körpergewicht der Maus (entsprechend 20 mg/kg Körpergewicht Paroxetin-Base Tagesdosis), verteilt auf 2 Gaben (9 Uhr und 16 Uhr). Als Vehikellösung diente Leitungswasser.

## **2.7 Bestimmung physiologischer Parameter**

### **2.7.1 Entnahme und Aufbereitung des Bluts und der Hirne**

Die Tiere wurden in einem Glasbehälter mit Isofluran (Curamed Pharma, Karlsruhe, D) anästhesiert und anschließend dekapitiert. Die Gehirne wurden schnell aus der Kalotte

entfernt, in vorgekühltem 2-Methylbutan (-30 – -40 °C; Roth GmbH, Karlsruhe, D.) und auf Trockeneis schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Das Blut eines jeden Tieres wurde in eisgekühlten, mit EDTA (Ethyldiamintetraacetat) beschichteten Röhrchen (Sarstedt, Nürnberg, D), die mit 10 µL Trasylol (Bayer, Leverkusen, D) versetzt worden waren, aufgefangen und auf Eis gelagert. Anschließend wurde das gewonnene Blut zentrifugiert (30 min, 3500 rpm, 4 °C), das Plasma abgenommen und bei -80 °C gelagert. Für die Zeitverlaufsmessungen von Plasmacorticosteron wurde zu entsprechenden Zeitpunkten Blut aus dem Schwanz der Mäuse genommen und in o.g. Röhrchen überführt (ca. 50 µL, ohne Trasylolzusatz). Ansonsten wurde zur Aufarbeitung und Lagerung wie oben beschrieben verfahren.

### 2.7.2 Hormonbestimmung im Blutplasma

Der Gehalt an ACTH und Corticosteron im Plasma der Tiere wurde mit kommerziell erhältlichen *Radioimmuno Assay Kits* (RIA; ICN Biomedicals Costa Mesa, CA) bestimmt. Der Inter- und Intra-Assay Koeffizient der Varianz lag für ACTH bei 7% und 5%, das Detektionslimit bei 2 pg/ml. Für Corticosteron lagen die Varianzkoeffizienten bei 7% und 4%, mit einem Detektionslimit bei 0.4 ng/ml. Es wurden generell alle zu vergleichenden Gruppen eines Experimentes im selben Ansatz gemessen.

### 2.7.3 Gehirn-Kryoschnitte

Die Gehirne wurden koronal mit einer Schnittdicke von 12 µm am Kryostaten (Leica, 2800 Frigocut E) geschnitten und auf geladene Objektträger (Super Frost Plus, Menzel Gläser, Merck, Ismaning, D.) aufgenommen und bei -20 °C zur baldigen Verwendung (Immunohistochemie) bzw. bei -80 °C (*in situ* Hybridisierung) zur Lagerung aufbewahrt.

### 2.7.4 Immunohistochemie

Die zu untersuchenden Schnitte wurden von -20 °C auf Raumtemperatur aufgetaut. Während aller folgenden Inkubations- und Waschrinne wurde darauf geachtet, dass die Gewebeschnitte nicht austrocknen. Wenn nicht anders angegeben, wurden in einer Glasküvette 220 mL der entsprechenden Lösung vorgelegt (s. Übersicht der verwendeten Lösungen im Anhang). Nach 10minütiger Fixierung in PFA wurden die Objektträger (OT) 3 x 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurde die Zellpermeabilität durch 15minütige Behandlung mit 0,2% Triton erhöht. Nach 2 x 5 min erneutem Waschen in PBS wurden unspezifische Bindungsstellen für den sekundären Antikörper auf den Schnitten mit je

500  $\mu$ L 5%igem Ziegenserum pro OT geblockt und für 1h in einer feuchten Kammer inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in entsprechender Verdünnung (s.u.) in 1,5%igem Serum hergestellt und 150  $\mu$ L davon pro OT aufgetragen, nachdem die 500  $\mu$ L Serum aus dem vorherigen Schritt entfernt wurden. Die stets mitgeführte Negativkontrolle erhielt hierbei reines 1,5%iges Serum ohne Antikörper. Ein Stück Parafilm auf dem OT verhinderte das Austrocknen bei der anschließenden Inkubation über Nacht in einer feuchten Kammer.

Am folgenden Tag wurde das Serum mit Antikörper durch Waschen (3 x je 5 min in PBS) von den OT entfernt. Der rot fluoreszierende sekundäre Antikörper – dieser ist mit dem Farbstoff Alexa Fluor 546 konjugiert und bindet an den primären Antikörper vom Kaninchen – wurde in 1:500 in PBS verdünnt, davon 200  $\mu$ L pro Objektträger aufgetragen und dieser in eine feuchte Kammer zur Inkubation (90 min) gelegt. Von diesem Prozedurschritt an wurden die Gehirnschnitte durchgängig vor Licht geschützt verarbeitet und gelagert, um den Verlust an Fluoreszenzintensität durch Tageslicht so gering wie möglich zu halten. Es folgten 2 Waschschritte à 5 min in PBS, 5 min Waschen in deionisiertem Wasser und abschließende Dehydrierung der Schnitte in einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration: 2 x 2 min in 70% EtOH, 2 x 2 min in 96% EtOH und 3 x 2 min in 100% EtOH. Vor der Lagerung im Kühlschrank wurden die Objektträger mit je einem Tropfen ProLong Gold (Invitrogen, Karlsruhe, D) versehen, um ein Ausbleichen der Schnitte zu minimieren, und mit einem Deckglas abgedeckt.

Target	Prim. Antikörper (Verdünnung)	Bezugsquelle
BDNF	1 : 50	Biozol/Diagnostica, Eching, Deutschland
COX-2	1 : 30	Biozol/Diagnostica, Eching, Deutschland
PGES2	1 : 250	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA

Abbildung 2.10: Verwendete Antikörper, deren Verdünnungen und Bezugsquellen

### 2.7.5 *In situ* Hybridisierung

Die Technik der *in situ* Hybridisierung erlaubt den Nachweis spezifischer mRNAs am Gewebeschnitt. Eine zur nachzuweisenden mRNA-Sequenz komplementäre Antisense-Sonde wurde radioaktiv markiert und auf fixierten Gehirnschnitten mit dem Target hybridisiert. Die Bildung von elementarem Silber aus seinen Halogeniden in Film- und

Photoemulsionsmaterial unter Strahlungseinwirkung der radioaktiven Antisense-Sonde wurde mikroskopisch ausgewertet, wobei der Schwärzungsgrad eine Aussage über die relative Menge an gebundener Antisense-Sonde zuließ.

**a) Amplifikation der cDNA mittels PCR**

Die Vorlage zur Herstellung der Hybridisierungssonde bestand aus einer cDNA-Sequenz, die in ein Standard pBlueskript SK+ Plasmid kloniert worden war. Dieses Plasmid enthielt Promotorregionen für gängige Polymerasen (SP6, T3, T7) – Voraussetzung für die anschließende Polymerasekettenreaktion (PCR), die zur Vervielfältigung der cDNA benutzt wurde. Die Plasmide für die entsprechenden Sonden wurden freundlicherweise von Frau Dr. Marianne Müller (Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München, D) [GR, MR und CRH] und Herrn Prof. Urs Albrecht (Universität de Fribourg, Fribourg, CH) [Per1] zur Verfügung gestellt.

Die PCR besteht aus 3 Schritten, die wiederholt durchlaufen werden, um die Menge an vorliegender cDNA mit jedem Durchlauf zu verdoppeln:

1. Denaturierung

Die zunächst doppelsträngige DNA wird auf 94°C erhitzt, um die Wasserstoffbrückenbindungen zu trennen, die die Einzelstränge zusammenhalten (Dauer der Denaturierungsphase: 30s).

2. Primerhybridisierung

In dieser Phase werden die Primer an die Einzelstränge hybridisiert. Dazu wird eine Temperatur gewählt, die ca. 2-3°C unter dem Schmelzpunkt des verwendeten Primers liegt (Dauer der Hybridisierungsphase: 30s).

3. Elongation

Die DNA-Polymerase füllt die fehlenden Stränge mit den entsprechenden Nukleotiden auf (Geschwindigkeit ca. 500 Basenpaare pro 30s). Die Synthese beginnt dabei am 3'-Ende und läuft in Richtung 5'-Ende. (Dauer der Elongationsphase: 40s)

Diese drei Schritte wurden 35mal wiederholt, wobei ganz zu Beginn zusätzlich eine einmalige, vierminütige Denaturierungsphase durchlaufen wurde. Nach Beendigung der PCR wurde das fertige Produkt auf 6 °C gekühlt.

Die technische Umsetzung der PCR erfolgte in einem Thermalcycler (PTC 100 Thermal Cycler, MJ Research, San Francisco, USA), der den Temperaturablauf wie oben beschrieben automatisiert. Als Reaktionsgemisch wurde vorgelegt:

- 1,0 µL DNA-Vorlage (100 ng/µL)
- je 2,0 µL Forward- und Reverse Primer (10 µM)
- 1,0 µL Taq-Polymerase (2 U/µL)
- 1,0 µL dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 10 mM
- 5,0 µL 10x Taq-Puffer (enthält 15 mM Mg<sup>2+</sup>)
- 38,0 µL hochreines Wasser (Nanopure, Fresenius, Bad Homburg, D)

Die Identitätsbestimmung des PCR-Produkts erfolgte mittels Gelelektrophorese. Ultrareine Agarose (Electran, VWR, Ismaning, D) wurde 0,8%ig in TBE-Puffer angesetzt und mit Ethidiumbromid versetzt, so dass dessen Endkonzentration im Gel 0,1 µg/mL betrug. Das Gel wurde in eine horizontale Elektrophoresekammer gegossen, das zu untersuchende DNA-Sample 9:1 mit 10x DNA Gel Loading Buffer (Eppendorf, Hamburg, D) versetzt, und das Gel damit beladen. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V Gleichstrom. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Die Konzentrationsbestimmung des fertigen PCR-Produkts erfolgte aus oben stehendem Ansatz im UV/VIS-Spektrometer, eine Absorption von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht einer Konzentration an doppelsträngiger DNA von 50 µg/mL.

#### **b) Herstellung der radioaktiv markierten Sonden**

Zur Herstellung der radioaktiv markierten Sonde wurden die folgenden Komponenten bei Zimmertemperatur zusammengegeben: 3 µL dNTP-Mix (Roche Diagnostics, Mannheim, D), 1 µL RNAsin (RNase-Inhibitor, Roche Diagnostics, Mannheim, D), 3 µL 10x Transkriptionspuffer (Qiagen, Hilden, D), 1 µL DNA-Vorlage (PCR-Produkt, s. a)), 3 µL S<sup>35</sup>-UTP (Hartmann Analytics, Braunschweig, D), 18 µL DEPC-H<sub>2</sub>O und 1 µL DNA-abhängige RNA-Polymerase (s.u.). Dieser Ansatz wurde nach sorgfältigem Durchmischen bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 0,5 µL RNA-Polymerase (s.u.) wurde für weitere 2 Stunden inkubiert. Die Aufreinigung der markierten RNA-Sonde

erfolgte mittels eines RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden, D) gemäß dem dort beigelegten Protokoll. 1 µL des dadurch aufgereinigten Eluats wurde entnommen, in 2 mL Szintillationsflüssigkeit (Aquasafe 300 Plus, Zinsser Analytik, Frankfurt, D) homogenisiert und dessen Radioaktivität (cpm) in einem Betazähler (LS 6000IC, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, D) gemessen. Die Probe musste zur weiteren Verwendung eine gemessene Mindestzerfallshäufigkeit von  $7 \times 10^5$  cpm aufweisen.

Zielstruktur	Polymerase Antisense	Polymerase Sense
CRH	SP6	T7
GR	T7	T3
MR	SP6	T7
Per1	T3	T7

#### **c) Fixierung der Objektträger mit Hirnschnitten**

Die bei -20 °C bzw. -80 °C gelagerten Schnitte wurden aufgetaut und staubfrei getrocknet, in 4%igem PFA bei 4 °C für 10 min fixiert, 3mal bei RT in PBS gewaschen, mit 0,25% Acetanhydrid in 0,1 M Triethanolamin (pH 8) für 10 min acetyliert und zweimal für je 5 min in 2x SSC gewaschen. Die Schnitte wurden in einer Ethanolreihe aufsteigender Konzentrationen (60%, 75%, 95%, 100% v/v) entwässert, in CHCl<sub>3</sub> entfettet und bei RT staubfrei getrocknet.

#### **d) Hybridisierung**

Die markierte RNA-Sonde aus Abschnitt b) wurde so mit Hybridisierungsmix verdünnt, dass die Endkonzentration  $4 \times 10^7$  cpm pro mL betrug. Der so hergestellte radioaktive Hybridisierungsmix wurde bei 90 °C im Wasserbad für 2 min denaturiert und auf Eis schnell wieder auf RT abgekühlt. Die zu behandelnden Schnitte wurden in mit Hybridisierungskammerlösung versehenen feuchten Kammern ausgelegt, 100 µL Hybridisierungsmix pro OT aufgetragen, und die OT mit Deckgläschen abgedeckt. Die OT wurden in der geschlossenen Kammer bei 55 °C im Ofen (Bachofer, Reutlingen, D) über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen vorsichtig unter 4x SSC entfernt, die Objektträger 4x je 5 min in 4x SSC gewaschen und für 20 min in 20 µg/mL RNase A in NTE bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden folgende Waschschr

durchlaufen: 2x, 1x und 0,5x SSC mit 1 mM DTT (immer frisch dazu gegeben, da DTT zur Reduktion von gebildeten Disulfidbrücken verbraucht wird). Auf dem Wasserbad (65°C) folgte für 30 min ein Waschschriff mit 0,1x SSC / 1 mM DTT, abschließend bei RT zweimal je 10 min in 0,1x SSC / 1 mM DTT. Die Schnitte wurden in einer EtOH/NH<sub>4</sub>OAc-Reihe (30% EtOH, 50% EtOH, 70% EtOH) und in einer EtOH/H<sub>2</sub>O-Reihe (95%, 100%, 100%) entwässert und abschließend getrocknet.

#### **e) Autoradiographie**

Die Objektträger wurden in lichtgeschützten Kassetten auf einen Autoradiographiefilm (Bio Max MR, Kodak, Berlin, D) gelegt, wobei sich die Expositionszeit bis zur Entwicklung des Films nach Art der Sonde richtete: für GR 1 Tag, für MR 1 Tag, für CRH 3 Tage und für Per1 2 Tage. Zur Entwicklung der Filme wurde eine Entwicklermaschine (3M XP2000, Mailand, I) benutzt. Die Objektträger wurden anschließend unter Rotlicht in 45°C warme Kodak NTP2 Autoradiographieemulsion getaucht, die zuvor blasenfrei mit Wasser 1:1 verdünnt wurde. Die OT wurden für 1h getrocknet, anschließend wurden sie in lichtgeschützten Boxen verpackt und bei 4°C bis zur Entwicklung aufbewahrt (7 Tage für GR und MR, 9 Tage für CRH und 8 Tage für Per1). Zu dieser wurden die Objektträger für 5 min in Kodak D-76 Entwickler, kurz in Wasser und 2x je 3 min in Kodak Fixer getaucht. Nach vorsichtigem Spülen unter laufendem Leitungswasser für eine halbe Stunde wurden die Objektträger getrocknet und konnten mit Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, USA) eingedeckelt werden. Rückstände von Silber und Eindeckmedium an der Rückseite des Objektträgers wurden mit 70%igem Isopropanol (v/v) und Methylenchlorid entfernt.

#### **2.7.6 Semiquantitative Bildanalyse**

Mittels einer Leica Workstation (DMI 6000B Mikroskop mit DFC 350 FX s/w Kamera und der Software Leica Application Suite) wurden digitale Bilder der *in situ* hybridisierten Hirnschnitte im Dunkelfeld erstellt, von den Schnitten der immunohistochemischen Analyse wurden Bilder im Hellfeld aufgenommen. Die Bildanalyse wurde mit Hilfe der Software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) durchgeführt. Für die IHC-Auswertung wurde das Signal in den zu untersuchenden Hirnarealen durch Umfahren markiert, bei den Dunkelfeldaufnahmen der ISH wurde nach der Auswertemethode von Greetfeld (2005) verfahren. Vom durchschnittlichen Grauwert (8 Bit Farbtiefe) des jeweiligen Signals wurde

derjenige eines Hintergrundsignals vom gleichen Hirnschnitt abgezogen. Pro Tier wurden 3-10 Hirnschnitte aufgenommen, von denen die Signalintensitäten gemittelt wurden und als einzelner Wert pro Tier in die statistische Auswertung eingingen.

## 2.8 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit der Software „SPSS 15.0“ (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Die ermittelten Daten wurden mit Hilfe eines zweiseitigen Student's t-Tests für den Vergleich zweier Gruppen, bzw. mittels einfaktorieller oder zweifaktorieller ANOVA bei mehr als 2 Versuchsgruppen analysiert. Bei Zeitreihenanalysen (z.B. Messungen des Konsumverlaufs, Verlauf der Plasmakonzentrationen von Corticosteron, Zeitverlauf der lokomotorischen Aktivität) wurde eine ANOVA mit Messwiederholungen angewandt. Fehlende Werte wurden hierbei durch die Gruppenmittelwerte zu den entsprechenden Zeitpunkten ersetzt, um in der Auswertung nicht unnötig viele Individuen/Freiheitsgrade zu verlieren. Falls – mittels Mauchly-Test geprüft – die Voraussetzung der Sphärizität verletzt wurde, wurden die Freiheitsgrade durch Greenhouse-Geisser-Korrektur angepasst. Der Nachvollziehbarkeit halber sind in diesen Fällen die unkorrigierten Freiheitsgrade und der zugehörige Korrekturfaktor  $\epsilon$  angegeben. Die gezeigten F-Werte sind in diesen Fällen jedoch immer korrigiert dargestellt. Bei signifikantem Interaktionseffekt der Faktoren der ANOVA mit Messwiederholungen wurden anschließend zu den betrachteten Zeitpunkten die Messwerte paarweise verglichen (mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche). Für post-hoc-Vergleiche, die ausschließlich nach signifikantem Ergebnis der ANOVA angewandt wurden, wurde der Test nach Tukey gewählt. Die unabhängige Variable war jeweils die Experimentalgruppe oder die Art der Behandlung, bei Zeitreihen zusätzlich der Faktor Zeit. Als signifikant wurde ein Unterschied gewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0.05$  war; zur weiteren Differenzierung wurden  $p$ -Werte  $< 0,01$  oder  $< 0,001$  in den Graphen gesondert markiert. Als tendenziell wurde ein Effekt mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,10$  bzw.  $p < 0,15$  (leichte Tendenz) gewertet. Sämtliche Beschreibungen der Resultate beruhen auf der Darstellung von Mittelwerten  $\pm$  Standardfehler wenn nicht anders angegeben.

### **3 Charakterisierung verschiedener Mausstämme im CMS-Paradigma**

#### **3.1 Einleitung**

Die in dieser Arbeit aus in der Literatur üblichen Komponenten und unter dem Gesichtspunkt der Durchführbarkeit zusammengestellte CMS-Standardprozedur sollte in verschiedenen Mausstämmen auf Effektivität, Validität und damit auf Tauglichkeit zur Gewinnung eines Depressionsmodells hin untersucht werden. Als Mausstämme wurden solche ausgewählt, die in der Arbeitsgruppe bereits im Rahmen der Sucht- und Depressionsforschung umfangreich charakterisiert wurden (D20Ia, D2Jlco, BL/6J, BL/6N, Balb/c), in der CMS-Literatur noch kaum vertreten waren (FVB), oder als Auszuchtstamm einen breiter gestreuten genetischen Hintergrund mitbrachten (NMRI). Stress kann Verhalten und Physiologie einiger Tiere verändern, während andere kaum oder gar nicht beeinflusst werden. Responsivität auf Stress generell oder auf CMS als möglichem Auslöser von anhedonischen Verhaltensveränderungen wurde bereits in unterschiedlichen Rattenstämmen gezeigt (Bielajew et al., 2002; Konkle et al., 2003). Dieses Phänomen tritt selbst innerhalb einer genetisch homogenen Population (Inzuchtstamm) auf, wobei epigenetische Faktoren eine Rolle zu spielen scheinen (Jakovcevski et al., 2007). So liegt auf der Hand – wie im Folgenden anhand verschiedener Verhaltensdimensionen und physiologischer Parameter erläutert – dass der Auswahl des Mausstammes in Bezug auf das Readout und somit der Beurteilung des Modells eine zentrale Rolle zukommt.

Um im CMS-Modell die mögliche Entstehung eines anhedonieassoziierten Verhaltensphänotyps mitverfolgen zu können, wurde unten stehende Methode zur Konsummessung entwickelt (siehe Abschnitt 3.2). Ihre Anwendbarkeit während der CMS-Prozedur sollte in der Charakterisierung verschiedener Mausstämme erörtert werden. Hierbei war von besonderem Interesse, welche Mausstämme aufgrund ihres Konsumverhaltens besser geeignet sein könnten als andere, Entwicklung und Verlauf eines möglichen CMS-modulierten Verhaltens abzubilden, das als Anhedonie interpretiert werden könnte. Dieser stammabhängige CMS-Effekt – so wurde vermutet – könnte im Wesentlichen durch drei Einflussgrößen bestimmt sein, die für sich allein genommen in den verwendeten Mausstämmen schon stark variieren: Die Wahrnehmung des Geschmacksreizes, dessen Bewertung (individueller hedonischer Wert) und die Beeinflussbarkeit dieser Bewertung durch CMS. Die Wahrnehmung des Geschmacksreizes wird einerseits genetisch beeinflusst durch Ausprägung der Geschmacksrezeptoren (Glendinning et al., 2005), andererseits durch methodische

Faktoren wie beispielsweise die gewählte Konzentration der süßen Lösung – in hohen Konzentrationen kann Saccharin einen metallisch-bitteren Geschmack erzeugen (Riera et al., 2007), der gemieden wird.

BL/6J- und FVB-Mäuse zeigen unter ungestressten Bedingungen eine hohe Affinität zu süßen Lösungen, DBA/2J-Tiere hingegen eine niedrige, während sich der Balb/c-Stamm in seinem Konsumverhalten zwischen diesen beiden bewegt (Lewis et al., 2005). Bei NMRI-Tieren als Mäusen eines Auszuchtstamms sollte das Augenmerk besonders auf eine möglicherweise erhöhte Streuung des Konsumverhaltens gerichtet werden. Generell ist die Varianz der geschmacklichen Wahrnehmung zwischen den Mausstämmen sehr groß, wie von Kotlus et al. (1998) gezeigt werden konnte.

Der hedonische Wert einer süßen Trinklösung hängt damit ab vom sensorischen Input und dessen Bewertung im Belohnungssystem der Tiere (Pecina et al., 2003), welche wiederum durch den sehr unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Mausstämmen geprägt ist (Mhyre et al., 2005). Verantwortlich kann dafür zum Beispiel der Dopaminumsatz im mesolimbischen System (Smith et al., 1987), die Serotoninkonzentration im Striatum (Mhyre et al., 2005) und die Opiatrezeptordichte im Hirn der Mäuse sein (Yirmiya et al., 1988). Bereits aus Studien der Suchtforschung sind deutliche Stammunterschiede im dopaminergen System von Mäusen bekannt, BL/6J-Tiere haben eine hohe Affinität zu Ethanol, DBA/2-Mäuse eine niedrige (D'Este et al., 2007; Ng et al., 1994). Diese Befunde könnten auch die unterschiedliche Responsivität gegenüber Saccharin als belohnendem Stimulus erklären, wie sie bei der Methodenentwicklung zur Konsummessung gefunden wurde. In einer Rattenzuchtlinie konnte gezeigt werden, dass Stressempfindlichkeit mit einer erhöhten Affinität zu süßen Lösungen einhergeht (West & Weiss, 2006). Dies ließ erwarten, dass der genetische Hintergrund in Nagern für die Entwicklung einer anhedonischen Symptomatik unter Stresseinfluss entscheidend sein muss.

Zusammengenommen mit weiteren Einflussfaktoren wie Seitenpräferenz, Futter- und Wasserkonsum und Körpergewicht – deren Ausprägungen ebenfalls genetisch mitbedingt sind (Bachmanov et al., 2002) – wird deutlich, welche bedeutende Rolle die Wahl des Mausstamms hinsichtlich des Konsumverhaltens im CMS-Paradigma spielen kann.

Durch CMS hervorgerufene Verhaltensveränderungen beschränken sich nicht nur auf einen anhedonieassoziierten Phänotyp im Konsumverhalten, der in der vorliegenden Arbeit als wichtigster Parameter dienen sollte. Wiederholte Stresserfahrung beeinflusst gleichzeitig Verhaltensdimensionen wie Ängstlichkeit, Fellpflege, Nahrungsaufnahme,

Sozialverhalten, Exploration und lokomotorische Aktivität in Nagern (Berton et al., 1998; Keeney & Hogg, 1999; Koolhaas et al., 1997; Kudryavtseva et al., 1991) – generell gekennzeichnet durch eine reduzierte Aktivität, die angesichts der stressvollen Situation als Ressourcen sparend angesehen wird (Ducottet & Belzung, 2004). Diese Verhaltensinhibition kann auch im Menschen in Zusammenhang mit einigen depressiven Symptomen wie Energieverlust, Appetitverlust, psychomotorischer Retardierung und vermindertem Interesse an gewöhnlichen Tätigkeiten beobachtet werden (Saß & Houben, 1996).

Werden diese Verhaltensdimensionen in Nagetieren in verschiedenen Testparadigmen untersucht, so zeigen sich bereits unter stressfreien, basalen Bedingungen deutliche Unterschiede zwischen den Stämmen im angst- und depressionsassoziierten Verhalten (Griebel et al., 2000; Lucki et al., 2001; Shanks & Anisman, 1988; Shanks & Anisman, 1989). Balb/c-Mäusen als ängstlichem Stamm wird eine hohe emotionale Reaktivität in beispielsweise dem *Elevated Plus Maze Test* zugeschrieben (Ducottet et al., 2004), BL/6J-Tiere gelten als weniger ängstlich, D20la-Mäuse sind in ihrer Ängstlichkeit zwischen diesen beiden Stämmen einzuordnen. Im FST zeigen Balb/c- sowie BL/6J-Mäuse einen ähnlich hohen Wert für Immobilität (Jacobson & Cryan, 2007), während DBA/J-Mäuse sowohl hoch (David et al., 2003) als auch niedrig in mehreren Studien (Ducottet & Belzung, 2005; Shanks & Anisman, 1988) bezüglich ihrer Immobilität im FST eingestuft wurden. NMRI- und FVB-Mäuse sind gemäß Jacobson und Cryan mit moderaten bzw. niedrigen Werten in diesem Verhalten einzuordnen (2007).

Ebenso divers wie unter Basalbedingungen zeigen sich in verschiedenen Mausstämmen die Verhaltensänderungen, die sich durch Stress im Allgemeinen ergeben. Erlernte Hilflosigkeit (*Learned Helplessness*) kann zum Beispiel durch *Footshock Stress* vermehrt in Balb/c-Tieren im Vergleich zu DBA/2- oder BL/6J-Mäusen auftreten (Jacobson & Cryan, 2007), Balb/c-Tiere zeigen eine gegenüber FVB- und BL/6J-Mäusen erhöhte Tendenz, eine durch Stress gesteigerte Aggression zu entwickeln (Jacobson & Cryan, 2007).

Hinsichtlich CMS im Speziellen kann daher ebenfalls eine große Variabilität der Stressantworten in verschiedenen Mausstämmen auf Verhaltensebene gefunden werden (Ducottet & Belzung, 2005; Nielsen et al., 2000). Dies beinhaltet Verhaltensdimensionen wie Ängstlichkeit, Exploration und Lokomotion, wie sie im EPM untersucht wurden (Ducottet & Belzung, 2005). Selbst bei Betrachtung des einzelnen Tieres wurde eine individuelle Reaktivität auf bedrohliche Stimuli festgestellt, die mit einer Anfälligkeit der CMS-Prozedur gegenüber korreliert werden konnte (Ducottet et al., 2004). Dass depressionsbezogenes Verhalten dabei durch eine CMS-Prozedur auch ohne die

Induktion eines ängstlichen Phänotyps auftreten kann, zeigen die Ergebnisse weiterer Studien (Hilakivi & Lister, 1990; Mineur et al., 2006). Dort war teilweise sogar für das Auftreten von erhöhter Ängstlichkeit maßgeblich, in welchem Testparadigma das Angstverhalten ermittelt wurde.

Zusammenfassend bedeutete dies, dass eine Charakterisierung des angst- und depressionsbezogenen Verhaltens (inklusive Exploration und lokomotorischer Aktivität) neben den Konsummessungen als weiteres Indiz zur Beurteilung der CMS-Prozedur dienen sollte. Die so gewonnenen Informationen sollten ergänzend die oben genannte Auswahl des am besten geeigneten Mausstamms erleichtern, Stärken und Schwächen des Modells aufzeigen und Hinweise zu seiner Optimierung geben.

Wiederholter Stress erhöht die Plasmaspiegel der Stresshormone Corticosteron und ACTH in Nagern (Kant et al., 1988; Kant et al., 1989). Die Anfälligkeit für die zu Grunde liegende Auslenkung der HPA-Achse variiert hierbei stark zwischen den Mausstämmen (Anisman et al., 1998a) und ist grundlegend vom zeitlichen Ablauf eines Stressexperiments abhängig (van Raaij et al., 1997). In Zusammenhang mit der CMS-Prozedur sollten die Corticosteron- und ACTH-Werte auch Auskunft geben über die Reaktivität auf den jeweils verwendeten finalen Verhaltenstest. Die Konzentration der Stresshormone war von besonderem Interesse zu diesen Zeitpunkten, da chronischer Stress die Empfindlichkeit für Testparadigmen als für die Tiere bis dato unbekannte neue Stressoren auf endokriner Ebene sowohl erhöhen (Bhatnagar & Dallman, 1998) als auch erniedrigen kann (Bielajew et al., 2002). Diese Parameter in verschiedenen Mausstämmen zu erheben, sollte Auskunft über die Effektivität des CMS-Modells in physiologischer Hinsicht geben.

Chronische Stresserfahrung führt in Nagern zu einer verminderten Gewichtszunahme (Zelena et al., 1999), wobei der zeitliche Verlauf des Körpergewichts abhängig ist von Faktoren wie Geschlecht, Stamm (Bielajew et al., 2002; Jones et al., 1998; Konkle et al., 2003) oder dem verwendeten Stressprotokoll (Marin et al., 2007). So sollte auch in der vorliegenden Arbeit die Entwicklung des Körpergewichts als Maß für einen physiologischen Effekt der CMS-Prozedur betrachtet werden.

Um die Tauglichkeit des CMS-Protokolls zur Entwicklung eines Depressionsmodells in verschiedenen Mausstämmen außerdem auf molekularbiologischer Ebene beurteilen zu können, wurden sechs im Hirn vorkommende Proteine ausgewählt, die in unterschiedlichem Erklärungszusammenhang mit Depression stehen. Sie lassen sich einteilen in Wachstumsfaktoren (BDNF), Enzyme aus dem

Prostaglandin-Biosyntheseweg (COX-2 und PGES2) und Elemente der Stressachse (CRH, GR, MR).

Neuronale Plastizität ist in depressiven Patienten gegenüber Gesunden herabgesetzt (Fuchs et al., 2004). Ein dafür mitverantwortlicher Wachstumsfaktor von Neuronen ist BDNF, dessen Expression durch CMS im Hippocampus erniedrigt (Gronli et al., 2006; Kozlovsky et al., 2007; Lee et al., 2006), aber auch erhöht gefunden wurde (Li et al., 2007b), was von der Art des Stressprotokolls abhängig sein könnte. COX-2 und PGES2 sind maßgeblich an der Synthese von Prostaglandinen beteiligte Enzyme, die als Zielstrukturen der Antidepressivaentwicklung (Leonard, 2007; Muller et al., 2006) im Rahmen der Inflammationstheorie der Depression stehen. Sowohl Stress als auch Entzündungsprozesse können die HPA-Achse aktivieren, was in einer erhöhten Corticosteronausschüttung resultiert (Linthorst & Reul, 1998). Corticosteron kommen in beiden Fällen Aufgaben zur Erhaltung der Homöostase zu: u.a. Kreislaufaktivierung, erhöhte Energiebereitstellung und Unterdrückung einer Entzündungsreaktion durch Immunsuppression und einen antiphlogistischen Effekt (Tsigos & Chrousos, 2002). Letzterer wird unter anderem vermittelt durch Hemmung der Biosynthese von inflammatorischen Transmittern wie Prostaglandinen (Burdan et al., 2006; Vishwanath et al., 1993).

CRH als aktivierendes Neuropeptid der HPA-Achse wird unter Stresseinfluss im PVN des Hypothalamus ausgeschüttet und setzt ACTH in der Hypophyse frei, das die Corticosteronproduktion in der Nebennierenrinde stimuliert (de Kloet et al., 1990; Steckler et al., 1999). Die beiden Steroidrezeptoren GR und MR sorgen im Hippocampus durch Bindung von zirkulierendem Corticosteron für negative Rückkopplung und somit für die Eindämmung der Stressreaktion der HPA-Achse (de Kloet et al., 1998). Chronischer Stress kann in höheren Zentren der Stressachse (wie z.B. im Hippocampus) die negative Rückkopplung des zirkulierenden Corticosterons durch Verminderung der Expression von Glucocorticoidrezeptoren (GR) abschwächen, und als Folge davon in chronisch gestressten Ratten eine erhöhte Corticosteronkonzentration im Blut unter basalen (=ohne akuten Stresseinfluss) Bedingungen zur Folge haben (Mizoguchi et al., 2003). Auf einen akuten Stressor (z.B. Verhaltenstest) reagieren chronisch gestresste Tiere mit einem ähnlichen Anstieg der Corticosteronkonzentration im Blut wie Kontrolltiere, jedoch kehrt diese Auslenkung in chronisch gestressten Tieren schneller wieder auf den basalen Wert zurück (Mizoguchi et al., 2001). Für diesen Befund wird teilweise Gewöhnung und Anpassung an beziehungsweise ein veränderter Umgang mit den Stressoren verantwortlich gemacht (Mizoguchi et al., 2001). Anhand der mRNA-Expression von CRH, MR und GR sollten Rückschlüsse zu ziehen sein auf eine eventuell durch CMS gestörte

Rückkopplungsreaktion (Steimer et al., 2007) – ein Phänomen, das in der Psychiatrie in Form des Dex-CRH-Tests zur Diagnostik einer HPA-Achsen-Hyperaktivität in Depressionspatienten verwendet wird (Aihara et al., 2007).

Die Adaption auf physiologischer Ebene an die stressvolle Umgebung ist in Mäusen stark abhängig vom verwendeten Stamm (Jones et al., 1998), wobei DBA/2-Tiere generell eine schnellere Corticosteronantwort als BL/6J-Mäuse auf einen akuten Stressor zeigen, und ihre verminderte Zunahme an Körpergewicht durch chronischen Stress stärker ausgeprägt ist (Jones et al., 1998).

Ergänzend zu den oben aufgeführten Verhaltensdaten führte die Erfassung der physiologischen Parameter zu einem erweiterten Readout, das umfassend die Auswirkungen vom zu untersuchenden CMS-Modell in verschiedenen Mausstämmen abgreifen sollte.

Wenn sich im CMS-Modell auch nur teilweise die zu untersuchenden Merkmale (Konsumverhalten, sonstige Verhaltens- und physiologische Parameter) in Richtung eines depressionsassoziierten Verhaltensphänotyps durch CMS verändern sollten, dann war in einem zweiten Schritt zur Validierung des Modells die pharmakologische Behandlung mit einem bekannten Antidepressivum vorgesehen. Durch dessen Einsatz sollte geprüft werden, ob diese – mutmaßlich pathologischen – Veränderungen durch chronische Gabe eines Antidepressivums wieder normalisiert werden könnten. Die meisten CMS-Effekte konnten in Ratten oder Mäusen durch den Einsatz von Antidepressiva wieder rückgängig gemacht werden, was die Validität der untersuchten Modelle bestätigt (Monleon et al., 1995; Munoz & Papp, 1999; Przegalinski et al., 1995). Erst wenn dies in vorliegender Arbeit neben der Etablierung eines robusten CMS-Effekts ebenfalls gelingen würde, könnte von einer umfassenden Validität des CMS-Modells ausgegangen werden. Bei der Wahl des Antidepressivums in Zusammenhang mit dem zu untersuchenden Mausstamm musste dessen Genotyp berücksichtigt werden, der die Sensitivität der Stämme auf Antidepressiva entscheidend beeinflusst (David et al., 2003; Liu & Gershenfeld, 2001; Ripoll et al., 2003). Die Ergebnisse der angegebenen Studien und der eigenen Arbeitsgruppe führten zur Auswahl von Paroxetin als für fast alle verwendeten Stämme geeignetes Antidepressivum, auf das diese hinreichend sensitiv in Verhaltensparadigmen getestet werden könnten.

Die Untersuchung der verschiedenen Mausstämmen sollte daher in zwei Schritten erfolgen: Zunächst die Charakterisierung des Einflusses des CMS-Protokolls unter Verwendung der entwickelten Methode zur Konsummessung. Und in einem weiteren

Schritt – falls sich depressionsassoziierte Tendenzen in einem oder mehreren Stämmen zeigten – in Kombination mit einer Paroxetinbehandlung.

Dabei waren folgende Fragestellungen von besonderem Interesse:

- Welche Charakteristika zeigen die einzelnen Mausstämme in den zu untersuchenden Parametern unter CMS-Einfluss?
- Lassen sich Zusammenhänge erkennen zwischen einzelnen Verhaltensdimensionen, d.h. zeigt sich zum Beispiel anhedonieassoziiertes Verhalten eher in einem ängstlichen Mausstamm? Ist ein Auftreten von Ängstlichkeit gekoppelt an depressionsassoziiertes Verhalten?
- Ist das CMS-Protokoll in der Lage, einen depressionsassoziierten Phänotyp zu induzieren – gar in mehreren Verhaltensdimensionen (Anhedonie, *Behavioural Despair*)? Welche Rolle kommt in dieser Hinsicht der Messung des Konsumverhaltens zu?
- Inwieweit kann die Gabe eines Antidepressivums die durch CMS veränderten Verhaltensdimensionen wieder normalisieren? Findet diese „Normalisierung“ in allen durch CMS veränderten Parametern statt oder nur teilweise?
- Welche Schlussfolgerungen lassen sich aus der Charakterisierung der Mausstämme in Bezug auf die Modellentwicklung ziehen? Welche Aspekte bedürfen weiterer Untersuchung, um das CMS-Protokoll zu optimieren?

### 3.2 Vorversuche zu Konsummessungen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Depressionsmodell auf der Grundlage von chronisch mildem Stress zu entwickeln, das mittels einer in vivo zu verfolgenden Messgröße als Screening-Werkzeug für neue Arzneistoffkandidaten in der präklinischen Forschung dienen kann. Als ein solch mitzuverfolgender Surrogat-Parameter wird in der Literatur der Konsum von süßer Trinklösung verwendet: eine Verringerung der Präferenz für bzw. der Konsum an süßer Lösung nach CMS wird als Anhedonie und somit als ein Kernsymptom der Depression interpretiert. Zur Ermittlung des Konsumverhaltens sollte für die Verwendung in der vorliegenden Arbeit eine optimale Messmethode entwickelt werden, da in der Literatur keine standardisierte Prozedur verbreitet ist, und die meisten Methodenbeschreibungen sich auf die Anwendung in Ratten beziehen (Willner, 2005).

Vielmehr existieren sehr verschiedene Ansätze, um den Konsum an süßer Lösung von Ratten und Mäusen zu messen. Bei der Entwicklung einer Messmethode in Betracht zu ziehen ist (1) die Art und Konzentration der süßen Lösung (Saccharin- oder Zuckerlösung), (2) die Häufigkeit und (3) Dauer der Präsentation, und (4) ob zu den Messintervallen die süße Lösung im direkten Vergleich zu Wasser in einem Zweiflaschenmodell oder die süße Trinklösung alleine im Einflaschenmodell den Tieren angeboten werden sollte. Bei Verwendung eines Zweiflaschenmodells ist weiterhin (5) die genetisch (Bachmanov et al., 2002) und durch die Umstände der Aufzucht (Tierlieferant) bedingte allgemeine Seitenpräferenz für die Trinkflaschen zu berücksichtigen.

Für Saccharin wurde in der Literatur eine Konzentration von 0,2%, für Zucker aufgrund der geringeren Süßkraft eine Konzentration von 1% als für die Messung des Konsumverhaltens üblich gefunden (Strekalova et al., 2004). Außerdem war der im Gegensatz zu Saccharin hohe kalorische Wert von Zucker zu berücksichtigen, der neben einem geschmacklichen damit auch einen ernährungsphysiologischen Konsumsanreiz bieten kann (Katz, 1982; Pijlman et al., 2003b). Auf eine Deprivation von Futter oder Wasser, wie sie in einigen CMS-Protokollen als Stressor verwendet wurde (D'Aquila et al., 1994; Monleon et al., 1995; Willner et al., 1987) und teilweise nötig war, um die Sensitivität der Konsummessungen zu erhöhen (Forbes et al., 1996), wurde in der vorliegenden Arbeit vollständig verzichtet. Futterdeprivation als konsummatorischer Stressor mit direktem Einfluss auf den Vasopressinstoffwechsel und den Flüssigkeitshaushalt der Tiere (Ikemura et al., 2004; Mornagui et al., 2006) war zum einen schon bei Verwendung als einzelner Stressor in der Lage, einen scheinbar anhedonischen Verhaltensphänotyp zu generieren (Forbes et al., 1996), zum anderen aufgrund der Eigenschaft als starker Stressor (El et al., 2000) für das CMS-Protokoll der vorliegenden Arbeit ungeeignet.

Die Dauer des Messintervalls sollte, um einen möglichst präzisen und repräsentativen Wert zu ergeben, 4 Tage betragen (Tordoff & Bachmanov, 2002), was für chronische Stressprotokolle aufgrund der täglichen Manipulationen ausscheidet. Deshalb verwenden viele Prozeduren eine 24h-Messung, die sich noch praktikabel in ein Protokoll einfügen lässt (Monleon et al., 1995; Strekalova et al., 2004) und gegen im Tagesverlauf auftretende Änderungen des Konsumverhaltens unanfällig ist (D'Aquila et al., 1997). Ein konträres Ziel – dem sich die vorliegende Arbeit in der zu verwendenden Messmethode anschloss – verfolgt die Erfassung des Konsumverhaltens in einem kurzen Zeitraum von 1 bis 2 Stunden (D'Aquila et al., 1997; Li et al., 2007a), da sich in kürzeren Messintervallen eine präzisere Aussage über das Ausmaß der Motivation zum Konsum

von süßer Lösung und damit zu deren hedonischem Wert treffen lässt (Salamone & Correa, 2002; Wise, 2004). Die Untersuchungen von D'Aquila et al. (1997) zeigen hierfür, dass die Messung während der ersten Stunde der Dunkelphase den Zeitraum der höchsten Aktivität der nachtaktiven Tiere (Ratten) abdeckt, am sensibelsten zur Detektion eines CMS-Effekts dient und eine phänotypische Parallele zur Humansituation darstellt, in der depressive Symptome (Melancholie) morgens am stärksten auftreten können. Unter Einbeziehung der oben genannten Faktoren wurde sich daher für ein Messintervall von 2h zu Beginn der Dunkelphase entschieden. Weiterhin wurde im Vergleich zu anderen CMS-Studien festgelegt, die Messhäufigkeit von üblicherweise einmal (Monleon et al., 1995; Strelakova et al., 2004; Willner et al., 1987) auf dreimal pro Woche (Montag, Mittwoch, Freitag) zu erhöhen, um einen detaillierten Einblick in den Verlauf des Konsumverhaltens zu ermöglichen. Nach Durchführung von Vorversuchen wurde diese Annahme neu beurteilt und die Messhäufigkeit angepasst.

Zuletzt wurde das Einflaschenmodell, bei dem im Messintervall die Wasserflaschen für den täglichen Konsum gegen eine Trinkflasche mit süßer Lösung ausgetauscht werden, auf eventuelle Vorteile (stabilerer, praktischere Erfassung) gegenüber dem Zweiflaschentest (Flasche mit süßer Lösung wird im Messintervall zusätzlich zur Wasserflasche gegeben) hin untersucht werden. Hintergrund dieser Untersuchung war die anfängliche Verwendung des Einflaschentests in der CMS-Literatur durch Monleon et al. (1995), der einfacher durchzuführen ist, jedoch keine Aussage über die Präferenz zulässt, was gemäß Weiss (1997) zur Beurteilung einer Anhedonie nötig ist.

Generelle Fragestellungen wie Seitenpräferenz, Saccharin- oder Zuckerlösung, Präferenz über Wasser etc. wurden in einem Vorversuch in BL/6J- und D201a-Mäusen durchgeführt, jeweils im 24h-Messintervall, da noch keine CMS-Prozedur involviert war. Die Untersuchung zum Ein- bzw. Zweiflaschenmodell erfolgte auch im 2h-Messzeitraum, der bei der Durchführung der CMS-Prozedur angestrebt wurde.

Die Ergebnisse der Vorversuche zur Methodenentwicklung für Konsummessungen (Details hier nicht gezeigt) ergaben, dass beide getesteten Mausstämmen die rechte Käfigseite präferierten. Sowohl BL/6J- als auch D201a-Mäuse zogen die Saccharin- der verwendeten Zuckerlösung und vor allem Leitungswasser vor. Die Entscheidung, mit Saccharin als süßer Trinklösung weiter zu verfahren, wurde zusätzlich durch den fehlenden kalorischen Wert von Saccharin gefestigt: bei der Verwendung einer Zuckerlösung hätte nicht ausgeschlossen werden können, dass deren Präferenz über Wasser zum Teil auf den physiologische Brennwert zurückzuführen ist. Diese Schwierigkeit wurde durch die Verwendung von Saccharin umgangen. BL/6J-Mäuse

gelten in der Literatur als Mausstamm mit hoher Affinität zu süßen Trinklösungen (Lewis et al., 2005; Sclafani, 2006), was in den Vorversuchen anhand mehrerer Präferenzen und des generell erhöhten Saccharinkonsums (im 24h-Intervall als Wasser durch Saccharinlösung ersetzt wurde) bestätigt werden konnte. Der Vergleich des Ein- mit dem Zweiflaschenmodell zeigte keinen systematischen Unterschied im Ergebnis der beiden Messverfahren, es wurde daher das Zweiflaschenmodell gewählt, da es die Ermittlung der Präferenz über Wasser zulässt, wie es von Weiss (1997) für eine eindeutige Aussage zum anhedonischen Verhalten gefordert wurde.

Im Vergleich der beiden Messmethoden, mit denen die Häufigkeit der Präsentationen untersucht wurde (1x vs. 3x Messung pro Woche), ergab sich kein Unterschied, weswegen aus Gründen der Arbeitersparnis zunächst die einmalige Messung pro Woche vorgesehen wurde, wie in den meisten CMS-Prozeduren üblich (D'Aquila et al., 1997; Monleon et al., 1995; Pothion et al., 2004; Willner et al., 1987). Im anschließenden Experiment 2 fand im Rahmen eines Verhaltenstests (*Dark/Light Box*) in der dritten Woche nach Stressbeginn eine gesonderte Konsummessung statt (siehe Abbildung 3.3), um einen dem Verhaltenstest zeitnahen Messwert des Konsumverhaltens zu erhalten. Der dort beobachtete plötzliche Einbruch des Saccharinkonsums (auch) in Kontrolltieren gab Anlass zu der Vermutung, die einmalige Erhebung der Konsumdaten pro Woche könnte das Konsumverhalten der Tiere nicht detailliert genug (z. B. keinen möglichen Einfluss einer akuten Stresssituation) widerspiegeln. Daher wurde ab der fünften Woche nach Stressbeginn in Experiment 2 für alle weiteren Experimente der vorliegenden Arbeit ein Kompromiss zwischen oben erwähnten Überlegungen eingegangen und zwei Messzeitpunkte pro Woche (Montag und Donnerstag) festgelegt.

Die Entwicklung der Konsummessmethode wurde nur in BL/6J- und D20la-Mäusen vorgenommen, was die Übertragbarkeit auf andere Mausstämme nicht gewährleistet. Angesichts des zeitintensiven Arbeitsaufwands wurden die soweit gewonnenen Daten jedoch als Grundlage für alle weiteren Experimente genommen. Dies stellte eine mögliche Fehlerquelle dar, deren Bedeutung nicht weiter untersucht werden konnte. Des Weiteren basieren die Ansätze zur Optimierung der Konsummessung (z. B. die Verwendung von Saccharin anstatt von Zucker und die zeitliche Abfolge deren Präsentation) auf der Annahme, dass die Maximierung des hedonischen Wertes der süßen Trinklösung das größte Potenzial bietet, durch CMS beeinflusst zu werden. (Diese Annahme sollte sich als richtig erweisen, wie anhand der Konsumdaten von BL/6J-Mäusen diskutiert wird). Die Entscheidung, die Saccharinflasche stets auf der präferierten Käfigseite anzubieten, folgt weiterhin diesem Ansatz, eine fehlerhafte Verschiebung zu Gunsten der Saccharinlösung konnte durch entsprechende Untersuchungen

ausgeschlossen werden. Um weiterhin dem Konzept des größtmöglichen hedonischen Werts gerecht zu werden, wurde das kurze Messintervall von 2h (trotz offensichtlicher Anfälligkeit für große intra- und interindividuelle Konsumschwankungen) beibehalten und nicht verlängert.

Zusammenfassend ergab sich eine Messmethode, die die Verwendung einer 0,2%igen Saccharinlösung im Zweiflaschenmodell vorsah. Ab Experiment 2 wurde jeweils montags und donnerstags in den ersten zwei Stunden der Dunkelphase das Konsumverhalten der Tiere ermittelt.

### 3.3 Beschreibung der Auswertung

Aus den mitunter recht komplexen und voneinander verschiedenen Versuchsdesigns wurden die Daten unter folgenden Gesichtspunkten extrahiert und in Hinblick auf konzeptionelle Gemeinsamkeiten der Experimente gegliedert. Im Zentrum der Betrachtungen befand sich stets das Konsumverhalten (als „in Echtzeit“ mitzuverfolgender Messwert) während der CMS-Prozedur, durch CMS verändertes Verhalten nach bzw. gegen Ende der Stressprozedur und Auswirkungen von CMS auf physiologische Parameter. So wurde – unabhängig von den individuellen Experimentdesigns, die bereits in Kapitel 2.3 dargestellt wurden – für jeden Stamm (1) die basalen Konsumdaten für die süßen Trinklösungen unter ungestressten Bedingungen ermittelt, (2) samt anschließendem Vergleich der Konsumdaten der CMS-Gruppe zu jenen von Kontrolltieren im Verlauf der CMS-Phase. Die gegen Ende der jeweils wochenlangen CMS-Prozedur durchgeführten (3) Verhaltensexperimente sollten einen generellen Effekt von CMS auf angst- oder depressionsassoziiertes Verhalten untersuchen und sind nach diesen Kriterien geordnet dargestellt. In jedem für die Charakterisierung der Mausstämmen relevanten Experiment wurde außerdem (4) die Corticosteron- und ACTH-Konzentration im Plasma der Tiere nach vielen Wochen CMS und den Verhaltenstests sowie (5) die Entwicklung des Körpergewichts während der CMS-Phase gezeigt. Zusätzlich durchgeführte (6) molekularbiologische Untersuchungen stressrelevanter Strukturen (CRH, GR, MR, BDNF, COX-2, PGES2) an Hirnschnitten sind nicht umfassend in allen Experimenten gleich erhoben worden, können und sollen somit nur auszugsweise den hirnphysiologischen Effekt von CMS in einzelnen Mausstämmen zeigen. Die in diesem Kapitel gezeigten Ergebnisse beruhen stets auf dem Vergleich der CMS- zur ungestressten Kontrollgruppe.

Die in Kapitel 3.4 dargestellten Ergebnisse entstammen den Experimenten 1 bis 5 und 7. Experiment 2, in dem die Paroxetinbehandlung in D2Ola-Mäusen untersucht wurde, stellt insofern eine Besonderheit dar, als dass die Durchführung eines vollständigen Versuchsdesigns aufgrund infrastruktureller Limitierung (Laborräume, Vorgaben der Tierhaltung, Personal) nicht möglich war. So musste die theoretisch ideale Anzahl an Versuchsgruppen auf die hier dargestellten Gruppen (CO, CO Veh und CMS Veh) reduziert und die Art der statistischen Auswertung (Einweg-ANOVA) angepasst werden. Für die Auswertung der Untersuchungen zur Paroxetinbehandlung wurden die Gruppenvergleiche zum Paroxetineffekt in CMS-Tieren (CMS Veh vs CMS Par) mittels Student's t-Tests durchgeführt.

### **3.4 Ergebnisse**

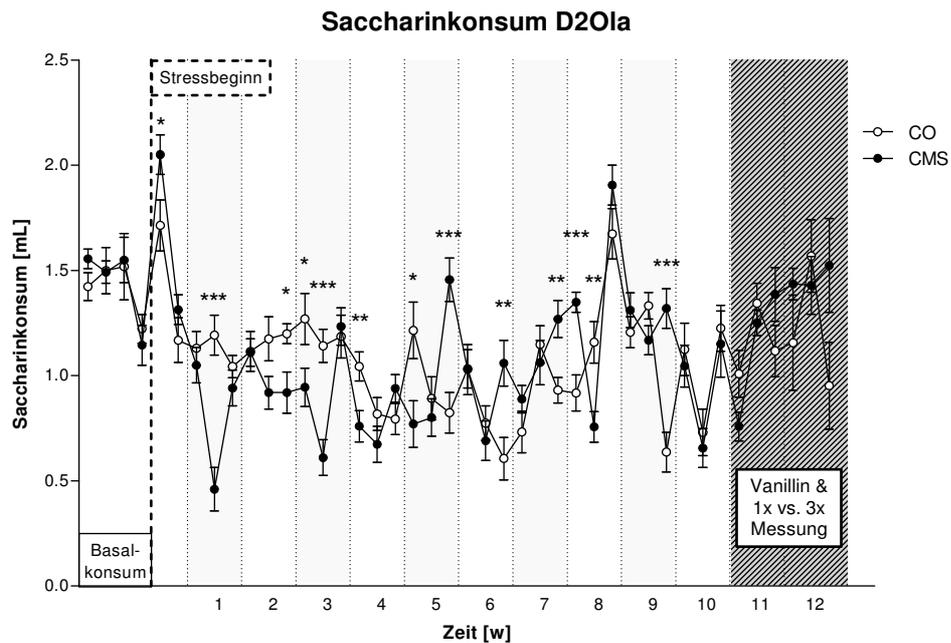
#### **3.4.1 Konsumverhalten verschiedener Mausstämme während CMS**

##### **a) *D2Ola-Mäuse***

Abbildung 3.1 zeigt den absoluten Saccharinkonsum von D2Ola-Mäusen in Experiment 1. Die vier vor Stressbeginn dargestellten Basalwerte sind die letzten einer langen Versuchsreihe zur Ermittlung des Basalkonsums von D2Ola-Mäusen im Rahmen der Methodenetablierung (Daten nicht gezeigt).

Unter ungestressten (=basalen) Bedingungen zeigten beide Versuchsgruppen einen mittleren Saccharinkonsum von  $1,43 \pm 0,05$  mL.

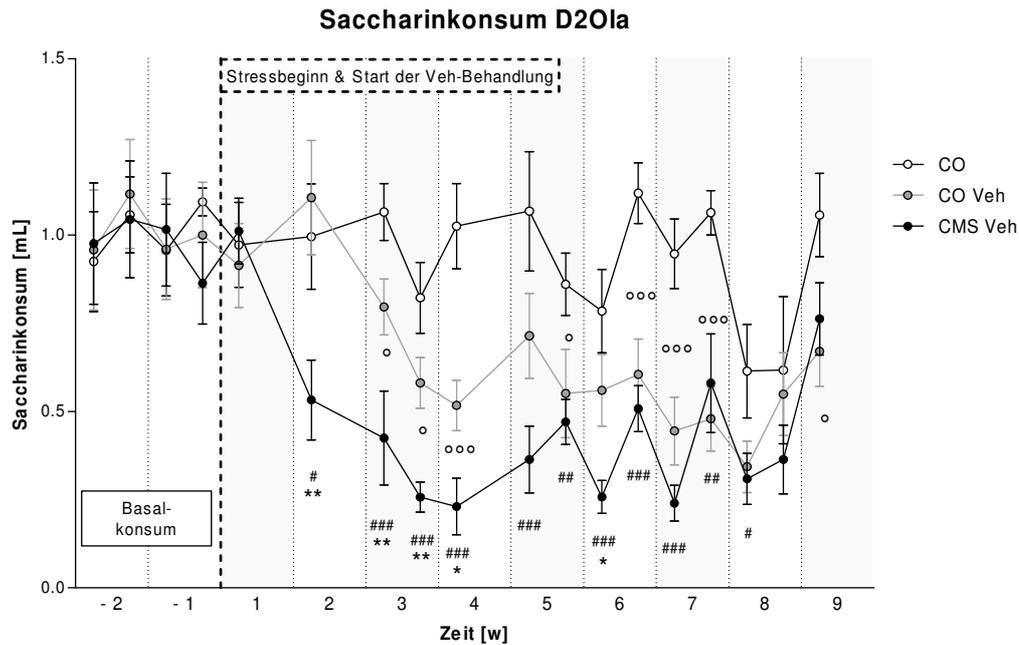
Der Vergleich des Konsumverhaltens der beiden Experimentalgruppen für die Periode ab Stressbeginn bis zum Ende des Experimentes mittels ANOVA mit Messwiederholungen ergab keinen signifikanten Effekt für den Faktor Gruppe (=CMS). Nach Stressbeginn wurden jedoch zu den in Abbildung 3.1 markierten Zeitpunkten Unterschiede im Saccharinkonsum der Versuchsgruppen ermittelt (Interaktion Gruppe x Zeit:  $F_{31,682}=9,29$ ;  $p<0,001$ ;  $\epsilon=0,359$ ), wobei der Konsum der CMS-Tiere bei einigen Messungen sogar über dem der Kontrolltiere lag.



**Abbildung 3.1:** Saccharinkonsum von D2Ola-Mäusen in Experiment 1. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Saccharinkonsums während der zweistündigen Messintervalle, Gruppengröße  $n=12$ . Die ersten vier Werte der Zeitreihen zeigen den Basalkonsum. \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$

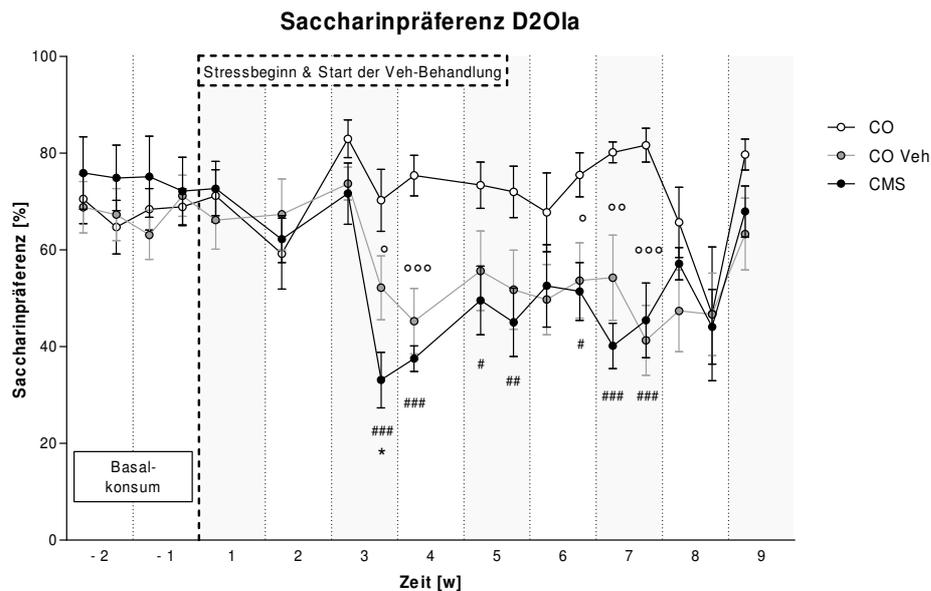
CMS hatte keinen Effekt (Faktor Gruppe) auf die Saccharinpräferenz der D2Ola-Mäuse in Experiment 1, es ergab sich kein signifikanter Interaktionseffekt der Faktoren Stress und Zeit (Daten nicht dargestellt). Die Ergebnisse zum Konsumverhalten von D2Ola-Mäusen zeigten somit eine Reduktion des Konsums in den meisten Messwerten der ersten 3-4 Wochen nach Stressbeginn, wohingegen CMS nicht in der Lage war, die Saccharinpräferenz dieser Tiere zu verändern.

In Abbildung 3.2 ist der Saccharinkonsum von ebenfalls D2Ola-Mäusen dargestellt, die im Zuge von Experiment 2 per Schlundsonde Wasser verabreicht bekamen. Der absolute Konsum der Saccharinlösung während des 2-stündigen Messintervalls der Gruppen Kontrolle (CO), Kontrolle mit Vehikellösung behandelt (CO Veh) und CMS und mit Vehikellösung behandelt (CMS Veh) wurden verglichen. Es zeigte sich hierbei ein deutlicher Gruppenunterschied (Faktor Gruppe  $F_{2,30}=19,07$ ;  $p<0,001$ ), wobei sowohl CMS Veh-Tiere ( $p<0,001$ ) als auch CO Veh-Tiere ( $p<0,01$ ) weniger Saccharin konsumierten als die Kontrollgruppe. Die zwei verschiedenen Stresskomponenten (Vehikelbehandlung *per se* und CMS+Vehikelbehandlung) hatten einen deutlich voneinander unterschiedlichen Einfluss auf den zeitlichen Verlauf des Saccharinkonsums (Effekt der Interaktion Gruppe x Zeit  $F_{26,390}=4,09$ ;  $p<0,001$ ;  $\epsilon=0,381$ )



**Abbildung 3.2:** Saccharinkonsum von D2Ola-Mäusen in Experiment 2. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Saccharinkonsums während der zweistündigen Messintervalle, Gruppengröße  $n=12$ . Die ersten vier Werte der Zeitreihen zeigen den Basalkonsum für die Versuchsgruppen. Paarweiser Vergleich CMS Veh vs. CO Veh: \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ . Paarweiser Vergleich CO Veh vs. CO: °  $p<0,05$ ; °°  $p<0,01$ ; °°°  $p<0,001$ . Paarweiser Vergleich kombinierter Stresseffekt CMS Veh vs. CO: #  $p<0,05$ ; ##  $p<0,01$ ; ###  $p<0,001$ .

Eine dem Saccharinkonsum analoge Auswertung wurde für die Saccharinpräferenz der D2Ola-Mäuse durchgeführt (Abbildung 3.3). Auch hier zeigte sich ein deutlicher Effekt im Faktor Versuchsgruppe ( $F_{2,30}=10,59$ ;  $p<0,001$ ): sowohl die stressvolle Applikation von Vehikellösung alleine als auch deren Kombination mit CMS verringerte in Experiment 2 die Saccharinpräferenz von D2Ola-Mäusen (in beiden Fällen  $p<0,01$ ) im Vergleich zu Kontrolltieren. Die hier getesteten CMS-Tiere zeigten gegenüber der Kontrollgruppe, die mit Vehikellösung behandelt wurde, keine zusätzliche Reduktion in ihrer Saccharinpräferenz. Den unterschiedlichen Zeitverlauf der Saccharinpräferenz betreffend ergab sich ein hochsignifikanter Interaktionseffekt (Gruppe x Zeit  $F_{26,390}=3,29$ ;  $p<0,001$ ;  $\epsilon=0,457$ ), siehe Abbildung 3.3.



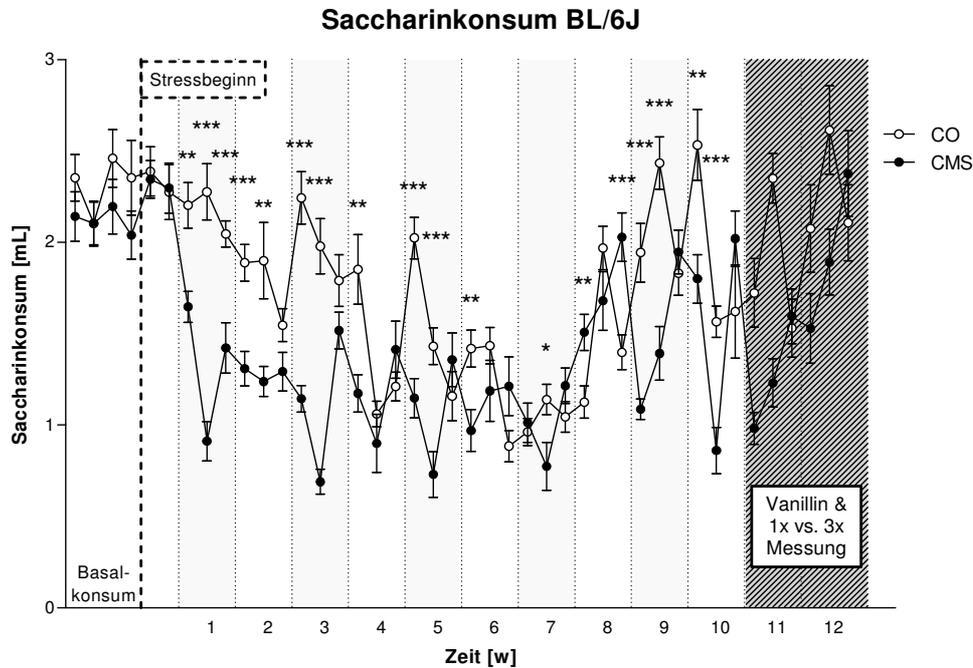
**Abbildung 3.3:** Saccharinpräferenz von D20la-Mäusen in Experiment 2. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Saccharinpräferenz während der zweistündigen Messintervalle, Gruppengröße  $n=12$ . Die ersten vier Werte der Zeitreihen zeigen die Saccharinpräferenz für die Versuchsgruppen unter Basalbedingungen. Paarweiser Vergleich CMS Veh vs. CO Veh: \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ . Paarweiser Vergleich CO Veh vs. CO: °  $p<0,05$ ; °°  $p<0,01$ ; °°°  $p<0,001$ . Paarweiser Vergleich kombinierter Stresseffekt CMS Veh vs. CO: #  $p<0,05$ ; ##  $p<0,01$ ; ###  $p<0,001$ .

Die Ergebnisse des Konsumverhaltens von Experiment 2, bei denen die Vehikelbehandlung als zusätzlicher Faktor im Versuchsdesign zu berücksichtigen war, zeigte eine Verminderung des Saccharinkonsums durch die Vehikelbehandlung *per se*, die durch die CMS-Prozedur zusätzlich erniedrigt wurde. Ebenso wurde die Saccharinpräferenz sowohl durch Vehikelbehandlung als auch durch deren Kombination mit der CMS-Prozedur in der dritten Woche nach Stressbeginn reduziert.

#### b) **BL/6-Mäuse: BL/6J & BL/6N**

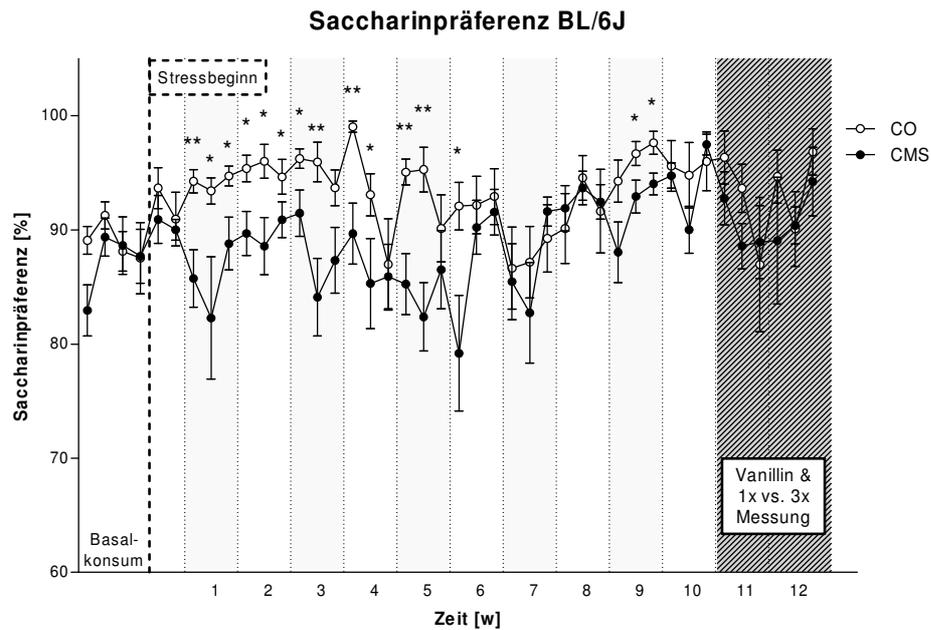
Dargestellt in Abbildung 3.4 ist der Saccharinkonsum von BL/6J-Mäusen aus Experiment 1. Unter Basalbedingungen konsumierten BL/6J Mäuse im Mittel  $2,22 \pm 0,08$  mL der gesüßten Lösung. Chronisch mild gestresste Tiere zeigten gegenüber den ungestressten Kontrollmäusen einen verminderten Konsum von Saccharinlösung ( $F_{1,22}=12,30$ ;  $p<0,01$ ). Dieser Unterschied zeigte sich ebenfalls im Interaktionseffekt der Faktoren Versuchsgruppe  $\times$  Zeit ( $F_{30,660}=14,27$ ;  $p<0,001$ ;  $\epsilon=0,366$ ). BL/6J-Mäuse zeigten in den ersten 3-4 Wochen nach Stressbeginn eine deutliche Reduktion des Saccharinkonsums durch CMS, dessen Unterschied zu dem der Kontrollgruppe in den Wochen 6-8 durch einen verminderten Konsum von CO-Tieren nicht länger anhielt. Gegen Ende der Stressprozedur traten in beiden Versuchsgruppen große Schwankungen im Saccharinkonsum auf, was zu den Vorversuchen mit Vanillin-Zugabe und der

Messhäufigkeit von nur 1x pro Woche führte. Die Messwerte der Wochen 11 und 12 gingen daher nicht in die Auswertung mit ein, da sie bereits im Rahmen der Vorversuche mit anderer Fragestellung behandelt wurden.



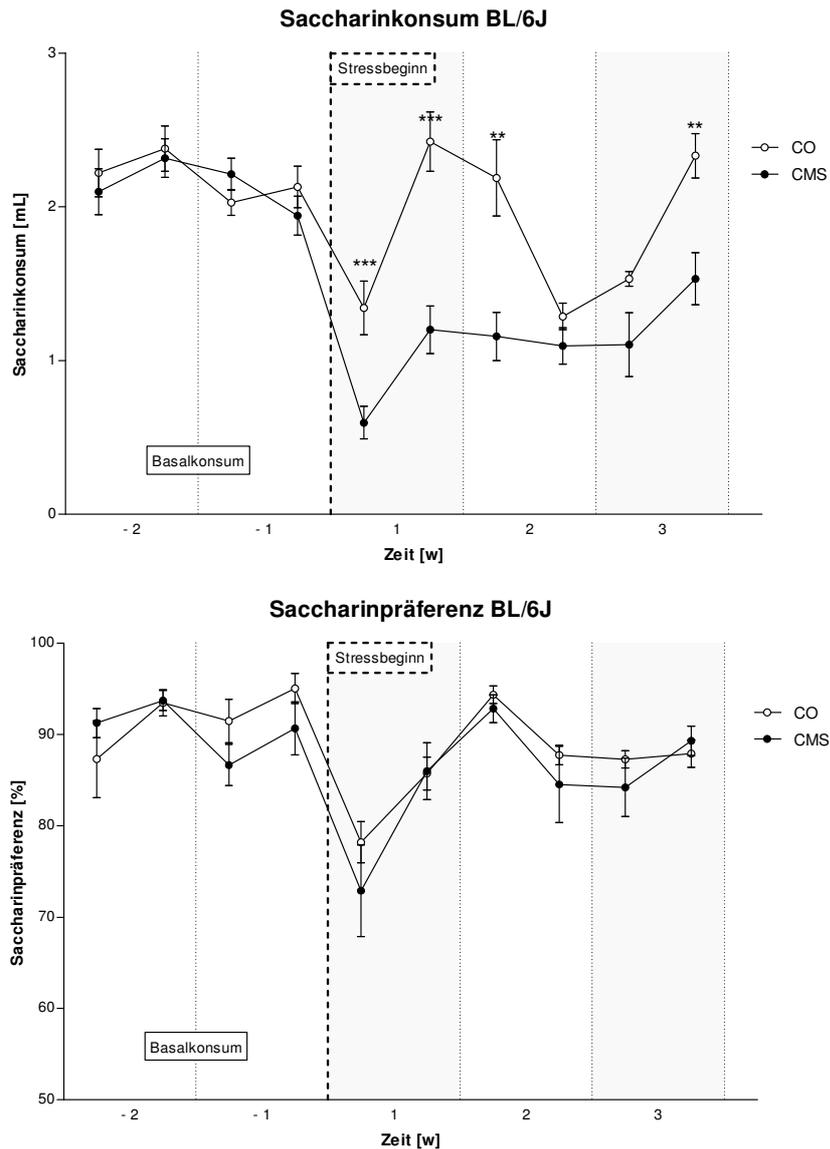
**Abbildung 3.4:** Saccharinkonsum von BL/6J-Mäusen in Experiment 1. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Saccharinkonsums während der zweistündigen Messintervalle, Gruppengröße  $n=12$ . Die ersten vier Werte der Zeitreihen zeigen den Basalkonsum. \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$  im paarweisen Vergleich.

Analog wurde die Saccharinpräferenz dieser Tiere in Experiment 1 ermittelt, die in Abbildung 3.5 gezeigt ist. Auch hier führte CMS zu einer Verringerung der Saccharinpräferenz im Vergleich zu Kontrolltieren (Faktor Gruppe  $F_{1,22}=4,92$ ;  $p<0,05$ ). Der Interaktionseffekt im Zeitverlauf (Gruppe  $\times$  Zeit  $F_{30,660}=2,57$ ;  $p<0,01$ ;  $\epsilon=0,298$ ) mit der Häufung an verminderter Präferenz für Saccharin durch CMS in der ersten Versuchshälfte (Woche 1-5 nach Stressbeginn) ist in Abbildung 3.5 detailliert gezeigt.



**Abbildung 3.5:** Saccharinpräferenz von BL/6J-Mäusen in Experiment 1. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Saccharinpräferenz während der zweistündigen Messintervalle, Gruppengröße  $n=12$ . Die ersten vier Werte der Zeitreihen zeigen die Saccharinpräferenz unter Basalbedingungen. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  im paarweisen Vergleich

In Abbildung 3.6 ist der Verlauf des Saccharinkonsums der BL/6J-Tiere in Experiment 3 dargestellt, das von kürzerer Dauer war und u.a. zeigen sollte, wie reproduzierbar die Konsumdaten sind. CMS bewirkte in diesen Mäusen eine deutliche Reduktion ihres Saccharinkonsums nach Stressbeginn ( $F_{1,18}=24,98$ ;  $p < 0,001$ ). Auch hier ergab die statistische Auswertung einen Effekt der Interaktion der Faktoren Stressgruppe  $\times$  Zeit ( $F_{5,90}=4,33$ ;  $p < 0,01$ ;  $\epsilon=0,584$ ). Die im paarweisen Vergleich signifikante Reduktion des Konsums an Saccharin durch CMS ist in der Abbildung markiert.

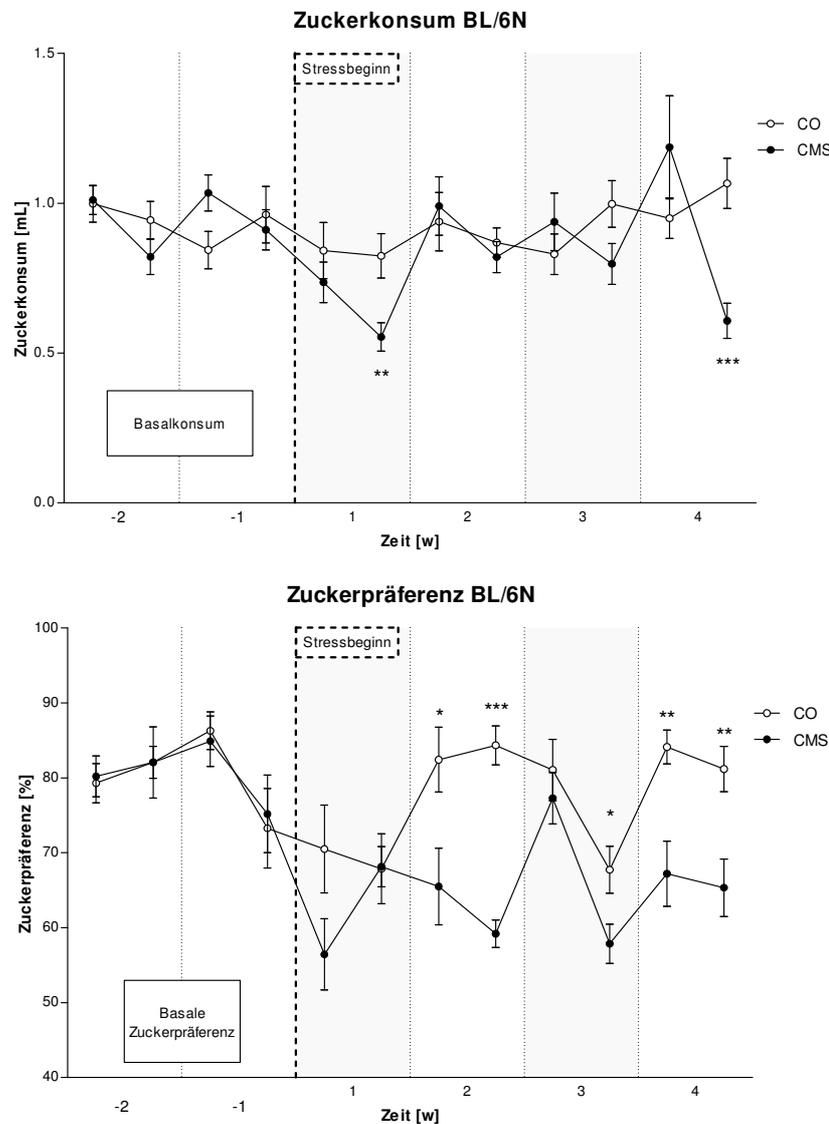


**Abbildung 3.6:** Saccharinkonsum und -präferenz von BL/6J-Mäusen (Experiment 3). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Saccharinkonsums während der zweistündigen Messintervalle, Gruppengröße  $n=20$ . Die ersten vier Werte der Zeitreihen zeigen den Basalkonsum für die Versuchsgruppen \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$

Analog wurden die Daten zur Saccharinpräferenz dieser Tiere ausgewertet. Es ergab sich weder ein Effekt der Stressgruppe noch einer der Interaktion dieses Faktors mit der Zeit.

Für BL/6J-Tiere lässt sich somit zusammenfassen, dass in den ersten 3-4 Wochen nach Stressbeginn sowohl der Konsum als auch die Saccharinpräferenz durch die CMS Prozedur verringert wurden, was jedoch in Experiment 3 weniger deutlich und nur für den Parameter Saccharinkonsum reproduziert werden konnte. Die Reduktion sowohl des Konsums als auch der Präferenz in Experiment 1 zeigte deutlich, dass die Tiere weniger Saccharin, dafür aber mehr Wasser konsumierten.

In BL/6N-Mäusen, die in Experiment 5 untersucht wurden, ergab CMS keinen signifikanten Unterschied im Zuckerkonsum im Faktor Versuchsgruppe. Die Auswertung dessen Zeitverlaufs lieferte einen Interaktionseffekt der Faktoren Zeit x Gruppe ( $F_{7,245}=5,89$ ;  $p<0,001$ ;  $\epsilon=0,618$ ), dessen Details in Abbildung 3.7 gezeigt sind.



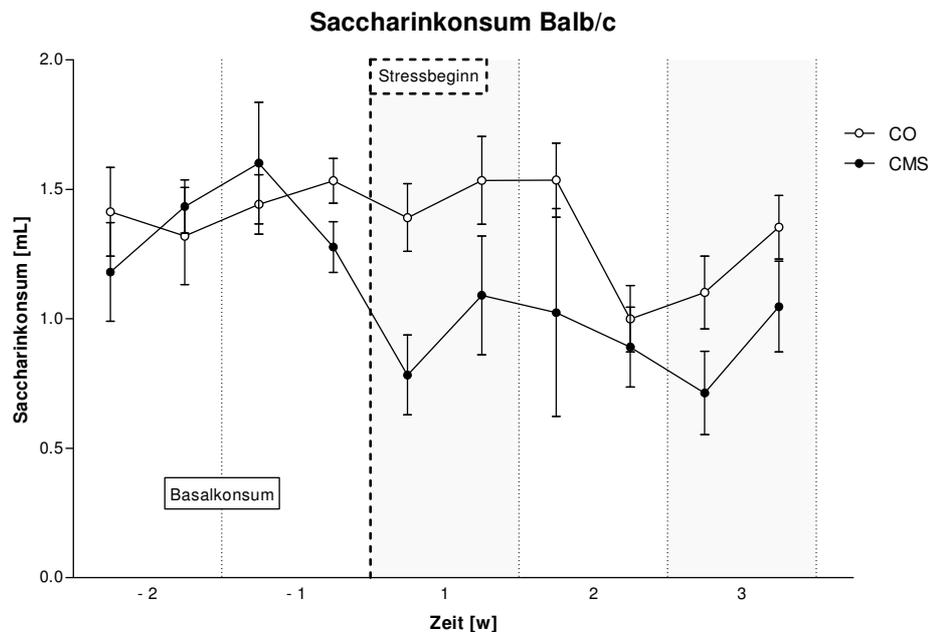
**Abbildung 3.7:** Zuckerkonsum und -präferenz von BL/6N-Mäusen aus Experiment 5. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Zuckerkonsums während der zweistündigen Messintervalle, Gruppengröße  $n=20$ . Der erste Wert der Zeitreihen zeigt den Zuckerkonsum unter Basalbedingungen \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$

Entsprechende Auswertung dieser Mäuse bezüglich ihrer Zuckerpräferenz ergab einen Gruppeneffekt durch CMS ( $F_{1,35}=13,48$ ;  $p<0,001$ ); gestresste Tiere präferierten Zucker weniger als die der Kontrollgruppe. Obige Abbildung zeigt die Details zum deutlichen Interaktionseffekt (Faktoren Gruppe x Zeit  $F_{7,245}=3,32$ ;  $p<0,01$ ;  $\epsilon=0,629$ ).

Für BL/6N-Mäuse zeigten die Daten hinsichtlich des Zuckerkonsums somit keinen CMS-Effekt, unter Einbeziehung der Zuckerpräferenz ließ sich folgern, dass ab der zweiten Woche nach Stressbeginn der Wasserkonsum in CMS-Tieren anstieg.

### c) *Balb/c-Mäuse*

Mäuse des Stammes Balb/c (Experiment 3) konsumierten unter Basalbedingungen im Mittel  $1,41 \pm 0,05$  mL von der Saccharinlösung (Abbildung 3.8) Nach Einsetzen der CMS-Prozedur tranken die gestressten Tiere kurzfristig weniger Saccharinlösung als die Kontrollmäuse (Faktor Stress  $F_{1,18}=6,03$ ;  $p<0,05$ ), im Zeitverlauf ihres Saccharinkonsums jedoch ergab sich kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.



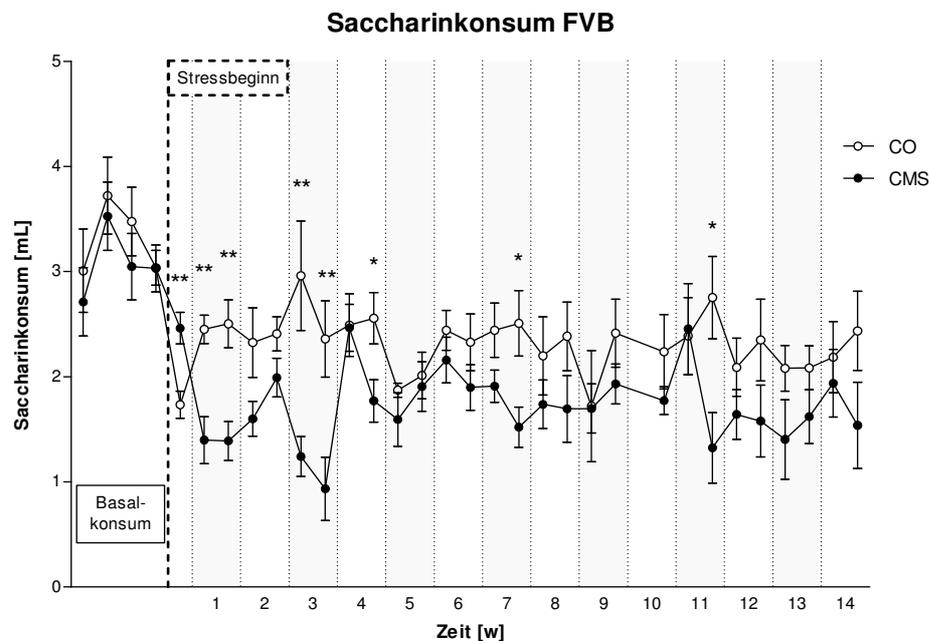
**Abbildung 3.8:** Saccharinkonsum der Balb/c-Mäuse aus Experiment 3. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Saccharinkonsums während der zweistündigen Messintervalle, Gruppengröße  $n=20$ . Die ersten vier Werte der Zeitreihen zeigen den Saccharinkonsum unter Basalbedingungen

Der nach CMS kurzfristig verminderte Absolutkonsum der gesüßten Lösung spiegelte sich nicht in der Präferenz derselben wider, und somit ergab sich in diesem Mausstamm weder einen Effekt im Faktor CMS noch im zeitlichen Verlauf der Präferenz (Daten nicht dargestellt). Aufgrund großer Streuung innerhalb der Versuchsgruppen konnte in Balb/c-Mäusen nur in der Gesamtbetrachtung eine leichte Reduktion des Saccharinkonsums durch CMS beobachtet werden. In Verbindung mit der unveränderten

Präferenz bedeutet dies, dass in CMS-Tieren auch der Wasser- bzw. Gesamtkonsum im Messintervall vermindert war.

#### d) FVB-Mäuse

In FVB-Mäusen (Experiment 4) wurde unter Basalbedingungen ein Absolutkonsum der Saccharinlösung von  $3,19 \pm 0,14$  mL ermittelt (Abbildung 4.15). CMS hatte eine Verringerung des Saccharinkonsums zur Folge (Faktor Versuchsgruppe  $F_{1,14}=6,37$ ;  $p<0,05$ ). Auch zeigte sich im zeitlichen Verlauf ihres Saccharinkonsums (Faktor Gruppe x Zeit  $F_{27,378}=2,46$ ;  $p<0,05$ ;  $\epsilon=0,237$ ), dass CMS-Tiere vorrangig in den Wochen 1-4 nach Stressbeginn weniger Saccharinlösung konsumierten als Kontrolltiere.



**Abbildung 3.9:** Saccharinkonsum von FVB-Mäusen aus Experiment 4. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Saccharinkonsums während der zweistündigen Messintervalle, Gruppengröße  $n=8$ . Die ersten vier Werte der Zeitreihen zeigen den Basalkonsum für die Versuchsgruppen. \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$

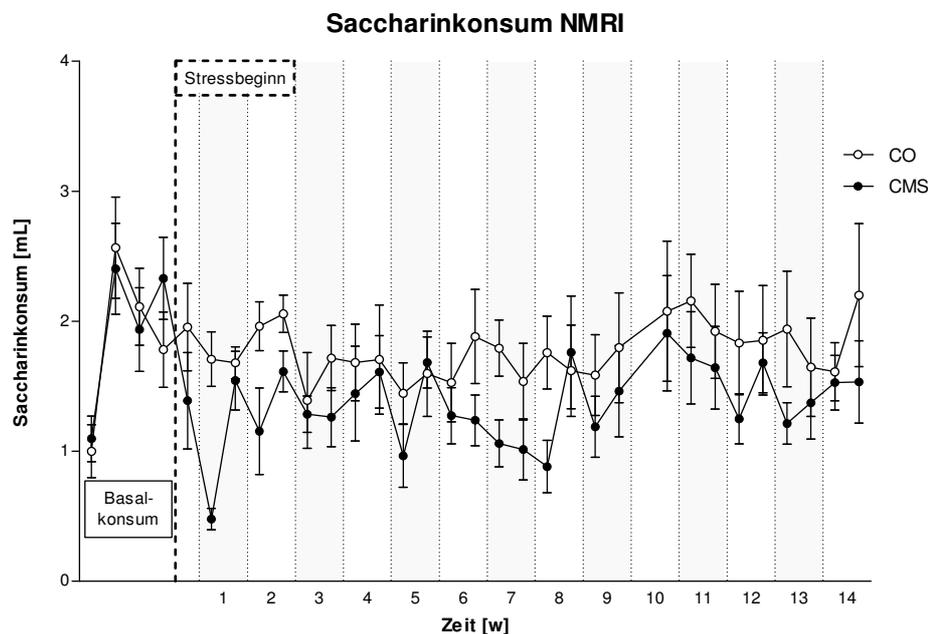
Im Gegensatz zum reduzierten Absolutkonsum der Saccharinlösung in Folge der CMS-Prozedur zeigten die CMS-Tiere keinen Unterschied in ihrer Präferenz für Saccharin (Faktor Gruppe), die Interaktion der Faktoren Behandlungsgruppe und Zeit ergab jedoch einen signifikanten Effekt ( $F_{27,378}=2,80$ ;  $p<0,05$ ;  $\epsilon=0,207$ , Daten nicht dargestellt).

Die CMS-Prozedur konnte in FVB-Mäusen deren Saccharinkonsum nur in den ersten 3-4 Wochen nach Stressbeginn in der Mehrheit der Messpunkte reduzieren, wobei keine Veränderung der Saccharinpräferenz durch CMS auftrat. Dies bedeutet, dass in diesem

Zeitintervall von 3-4 Wochen der gesamte Konsum (also auch der Wasserkonsum) reduziert war.

### e) *NMRI-Mäuse*

Der unter Basalbedingungen festgestellte Saccharinkonsum für NMRI-Mäuse (Experiment 4) lag bei  $1,89 \pm 0,17$  mL. Nach Stressbeginn unterschied sich die CMS- von der Kontrollgruppe weder in ihrem Saccharinkonsum (Faktor Stressgruppe) noch in dessen zeitlichen Verlauf (Interaktion Gruppe x Zeit), wie in folgender Abbildung gezeigt.



**Abbildung 3.10:** Saccharinkonsum von NMRI-Mäusen aus Experiment 4. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Saccharinkonsums während der zweistündigen Messintervalle, Gruppengröße  $n=8$ . Die ersten vier Werte der Zeitreihen zeigen den Basalkonsum für die Versuchsgruppen.

In ihrer Saccharinpräferenz zeigten chronisch mild gestresste NMRI-Mäuse eine verringerte Präferenz für Saccharin (Faktor Behandlungsgruppe  $F_{1,14}=9,76$ ;  $p<0,01$ ). Die paarweisen Vergleiche in Folge des signifikanten Interaktionseffekt der Faktoren Gruppe x Zeit ( $F_{27,378}=2,81$ ;  $p<0,05$ ;  $\epsilon=0,262$ ) wiesen auf wiederkehrende Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ab Woche 3 nach Stressbeginn bis Ende des Experimentes (Daten nicht gezeigt).

CMS hatte somit in NMRI-Tieren keinen Einfluss auf den Saccharinkonsum, die ab der dritten Woche nach Stressbeginn reduzierte Saccharinpräferenz lässt einen ab da gesteigerten Wasserkonsum bis zum Ende des Experimentes erkennen.

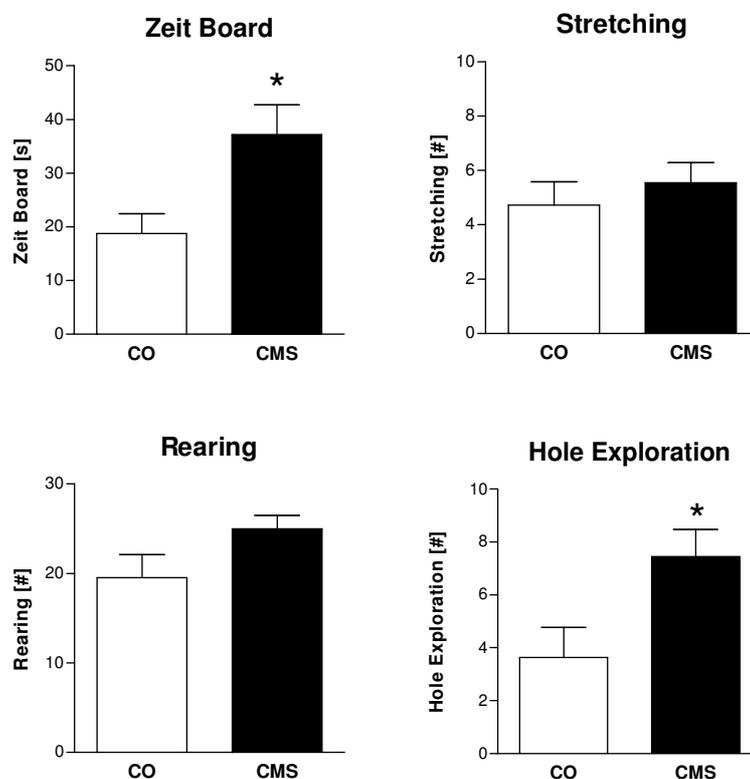
### 3.4.2 Charakterisierung verschiedener Mausstämme nach CMS hinsichtlich angst- und depressionsbezogenen Verhaltens

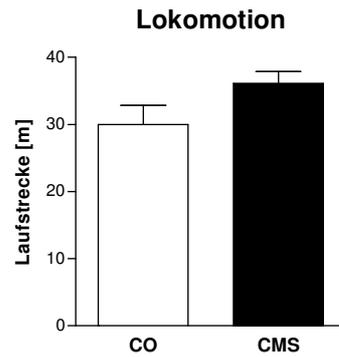
#### a) *D20la-Mäuse*

##### Angstbezogenes Verhalten

Die hier gezeigten Daten aus angstbezogenen Verhaltenstests von D20la-Mäusen nach 8 bzw. 13 Wochen CMS entstammen den *Dark/Light*- und mHb-Tests der Experimente 1 und 2. D20la-Tiere wurden außerdem in einem *Open Field Test* charakterisiert, in dem zusätzlich die Hemmung der Aufnahme von unbekanntem Futter (Food Intake Inhibition) untersucht wurde.

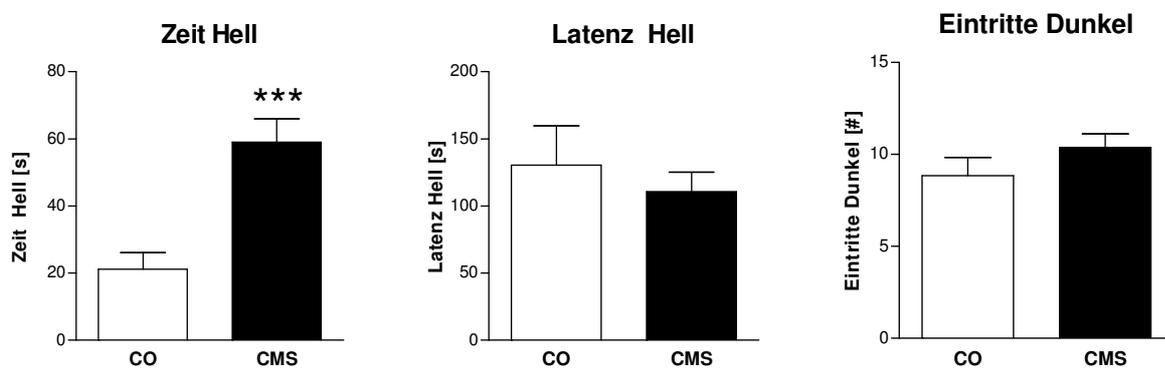
Abbildung 3.11 zeigt die Daten des mHb-Tests von Experiment 1. Die gestressten Tiere verbrachten mehr Zeit auf dem *Board* in der Mitte der Apparatur als Kontrolltiere ( $t_{20}=2,77$ ,  $p<0,05$ ). In den Verhaltensweisen *Stretching* und *Rearing* ergab sich kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen, jedoch war in den CMS-Tieren die gerichtete Exploration der Löcher (*Hole Exploration*) im mHb signifikant erhöht ( $t_{20}=2,51$ ;  $p<0,05$ ).





**Abbildung 3.11:** Verhaltensparameter von D2Ola-Mäusen im *modified Holeboard*-Test von Experiment 1 nach 13 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=11$ . \*  $p<0,05$ .

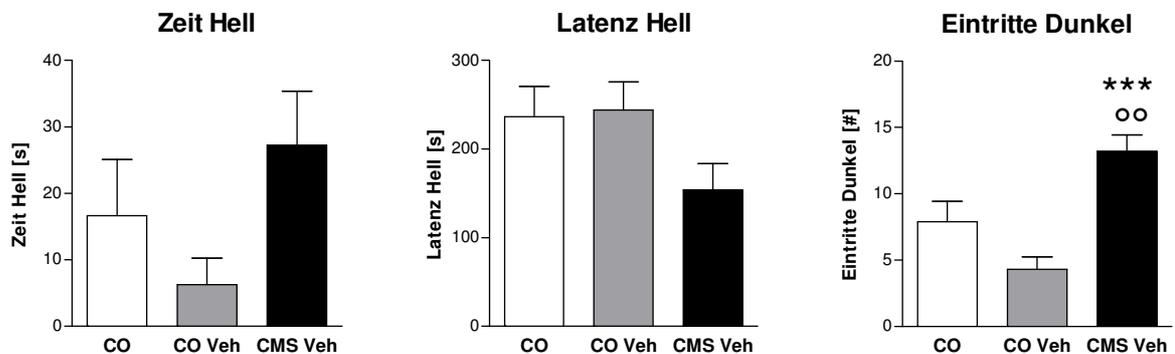
Im *Dark/Light Box*-Test von Experiment 1 (siehe Abbildung 3.12) haben sich die gestressten Tiere deutlich länger als Kontrolltiere im hellen Kompartiment aufgehalten (Zeit Hell,  $t_{21}=4,55$ ;  $p<0,001$ ). Weder in der Latenz bis zum ersten Eintritt ins helle (Latenz Hell) noch in der Anzahl der Eintritte ins dunkle Kompartiment (Eintritte Dunkel) unterschieden sich die beiden Versuchsgruppen voneinander.



**Abbildung 3.12:** Verhaltensdaten von D2Ola-Mäusen aus dem *Dark/Light Box*-Test in Experiment 1 nach 11 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=11-12$ . \*\*\*  $p<0,001$

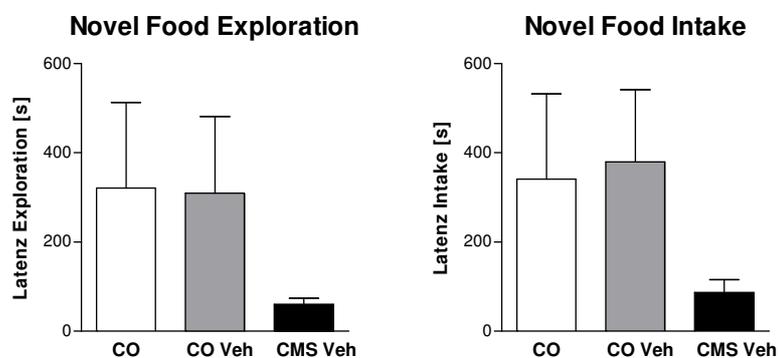
Experiment 2 enthielt im Versuchsdesign die intragastrale Applikation von Vehikellösung bzw. Paroxetin (zum pharmakologischen Effekt der Paroxetinbehandlung siehe Kapitel 3.4.4). Abbildung 3.13 zeigt die Verhaltensdaten der Tiere, die Vehikellösung appliziert bekamen (CO Veh) und jener, die zusätzlich dazu im CMS-Paradigma gestresst wurden (CMS Veh) im Vergleich zu Kontrolltieren. Aufgrund des unvollständigen Designs von Experiment 2 wurden die drei Versuchsgruppen mittels einer einfaktoriellen ANOVA untersucht. In keinem der beiden angstassoziierten Parameter (zum einen die Zeit, die die Tiere im Hellen verbrachten, zum anderen die Latenz bis zum

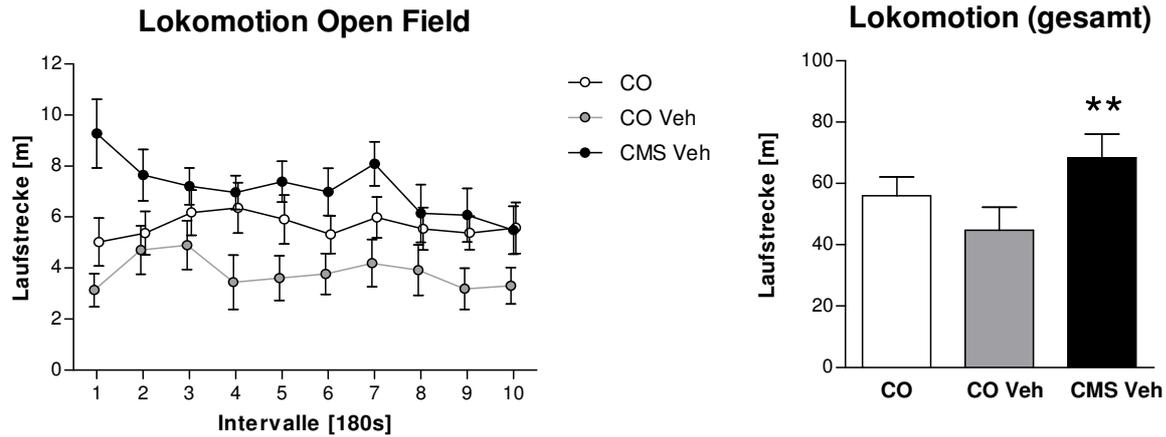
erstmaligen Betreten des hellen Kompartiments) ergab sich ein Unterschied zwischen den Gruppen. In der Anzahl der Eintritte ins dunkle Kompartiment zeigten CMS Veh-Tiere sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ) als auch zur CO Veh-Gruppe ( $p < 0,001$ ) eine erhöhte Aktivität ( $F_{2,25} = 13,01$ ;  $p < 0,001$ ).



**Abbildung 3.13:** Verhaltensdaten von D2Ola-Mäusen aus dem *Dark/Light Box*-Test in Experiment 2 nach 4 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=9-10$ . \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zu CO Veh, °°  $p < 0,01$  im Vergleich zu CO-Tieren.

Im *Open Field Test* in Experiment 2, in dem gleichzeitig das Verhalten nach Präsentation von unbekanntem Futter untersucht wurde, ergab sich kein signifikanter Unterschied in den Latenzen bis zur Exploration bzw. bis zum Fressen des unbekanntes Futters (siehe Abbildung 3.14). CMS Veh-Mäuse legten während der 30 Minuten des Tests eine größere Laufstrecke zurück (Faktor Versuchsgruppe:  $F_{2,25} = 5,67$ ;  $p < 0,01$ ) als die entsprechende Kontrollgruppe (CO Veh,  $p < 0,01$ ). Es zeigte sich im zeitlichen Verlauf kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (kein Interaktionseffekt Gruppe  $\times$  Zeit).

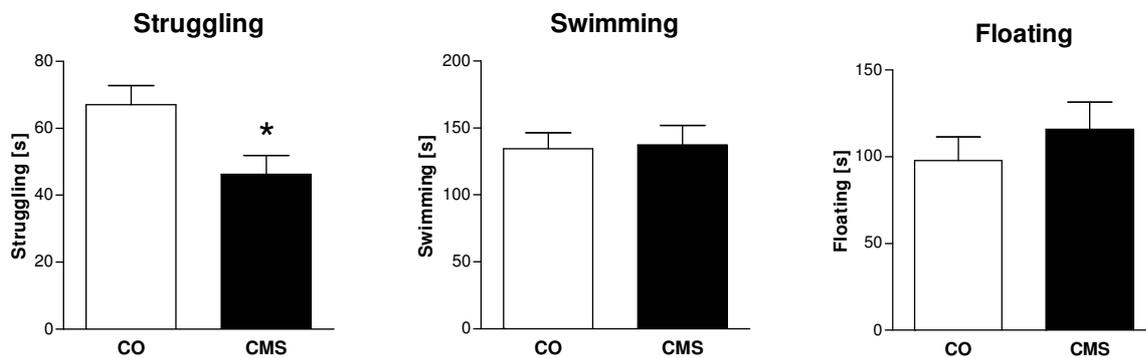




**Abbildung 3.14:** Novel Food Exploration / Intake und lokomotorische Aktivität von D2Ola-Mäusen im *Open Field Test* von Experiment 2 nach 8,5 Wochen CMS. Die Lokomotion ist dargestellt in 180s-Intervallen. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=9-10$ . \*\*  $p<0,01$  im paarweisen Vergleich (CO Veh vs. CMS Veh).

### Depressionsbezogenes Verhalten

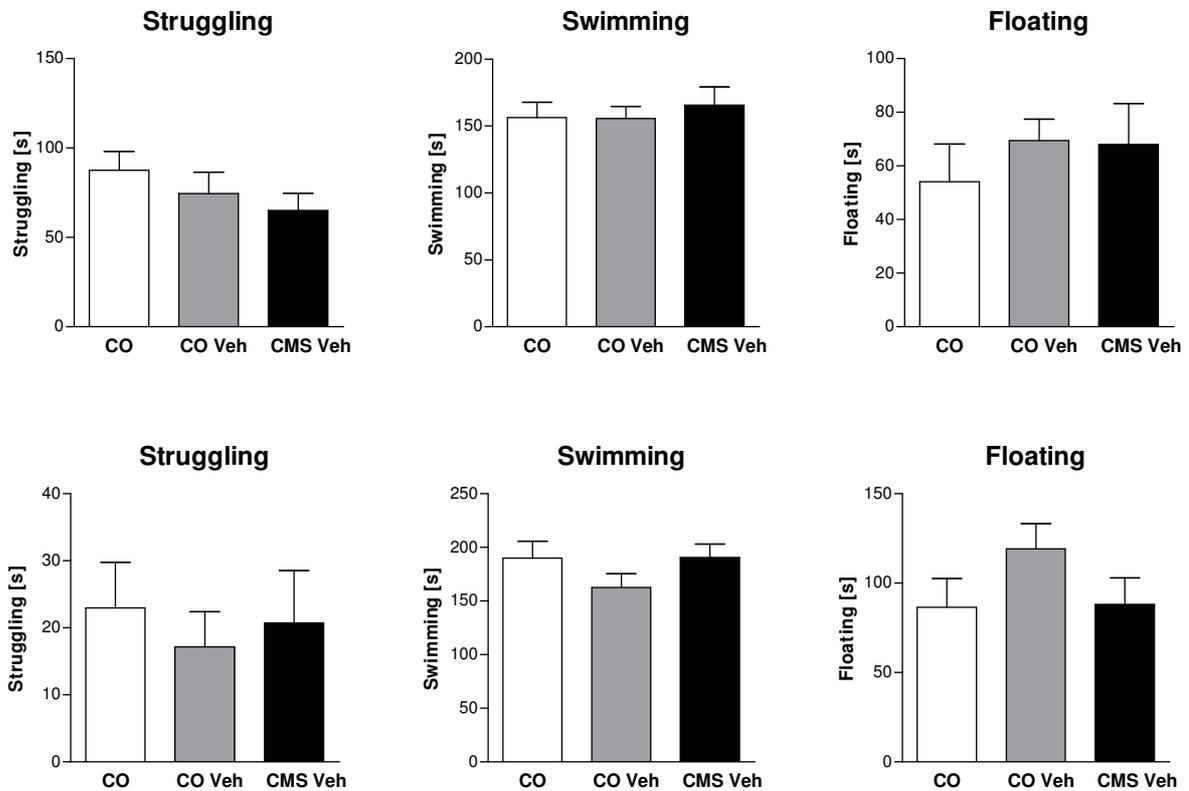
In D2Ola-Mäusen, die in Experiment 1 im FST auf depressionsassoziiertes Verhalten getestet wurden, zeigte sich nur im Parameter *Struggling* ein Unterschied zwischen CMS- und Kontrolltieren: bei ersteren war die Zeit, die sie mit *Struggling* verbrachten, geringer ( $t_{21}=2,59$ ;  $p<0,05$ ). Im *Swimming*- und *Floating*-Verhalten bestand kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (siehe Abbildung 3.15).



**Abbildung 3.15:** Verhaltensparameter von D2Ola-Mäusen im FST von Experiment 1 nach 12 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=11-12$ . \*  $p<0,05$ .

Abbildung 3.16 zeigt die Ergebnisse aus Experiment 2 des ersten (FST1) und zweiten FSTs (FST2), der 24h nach FST1 in D2Ola-Mäusen durchgeführt wurde. In

keinem der gezeigten Parameter ergab die einfaktorielle ANOVA einen signifikanten Effekt.

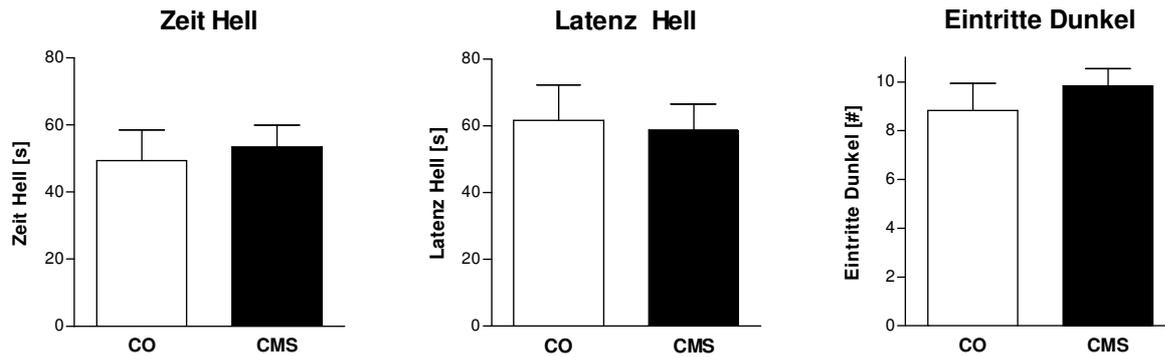


**Abbildung 3.16:** Verhaltensparameter der D201a-Mäuse vom ersten (obere Reihe) und zweiten (untere Reihe) FST2 von Experiment 2 nach 9,5 Wochen CMS und Vehikelbehandlung. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=9-10$ .

## b) **BL6-Mäuse: BL/6J & BL/6N**

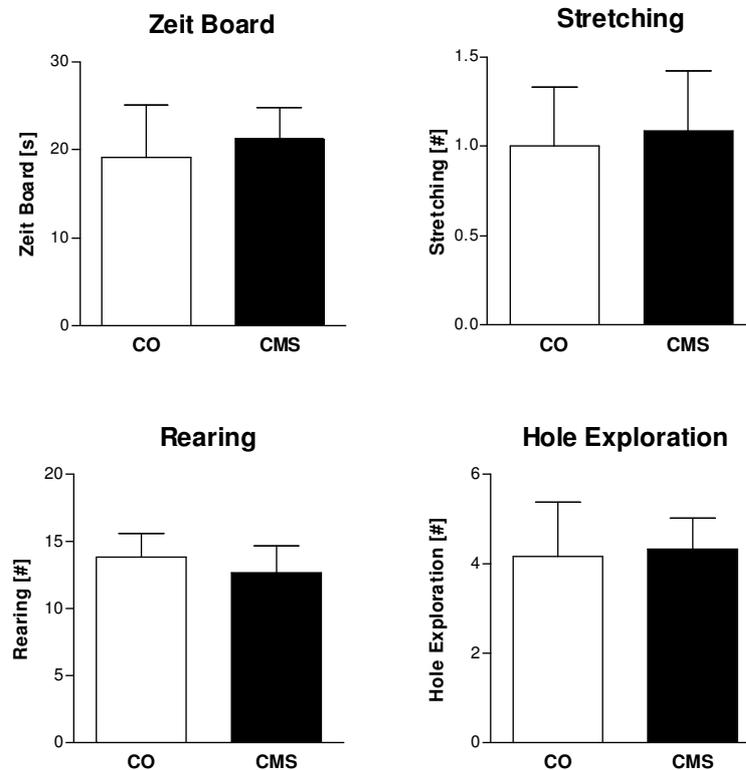
### Angstbezogenes Verhalten

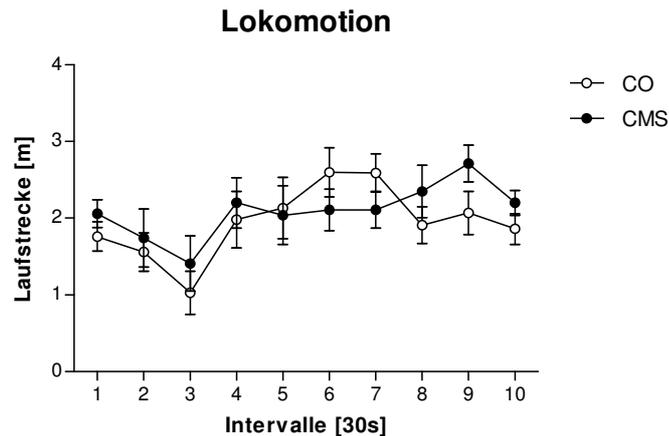
Abbildung 3.17 zeigt die Ergebnisse von BL/6J-Mäusen im DaLi-Test von Experiment 1. Chronisch mild gestresste Tiere zeigten hierbei in keinem der Verhaltensparameter einen signifikanten Unterschied zu Kontrolltieren.



**Abbildung 3.17:** Verhaltensparameter von BL/6J-Mäusen im DaLi-Test von Experiment 1 nach 11 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=12$ .

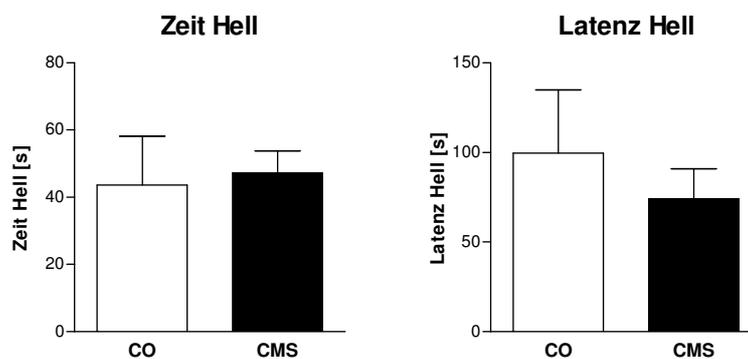
In denselben Tieren wurde im zeitlichen Abstand von 17 Tagen das Verhalten im mHb-Test untersucht, dessen Ergebnisse in Abbildung 3.18 dargestellt sind. Es zeigte sich in keinem der Verhaltensparameter ein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Somit kann gefolgert werden, dass die CMS-Erfahrung zu keiner Veränderung von angstbezogenem Verhalten in BL/6J-Mäusen führte.





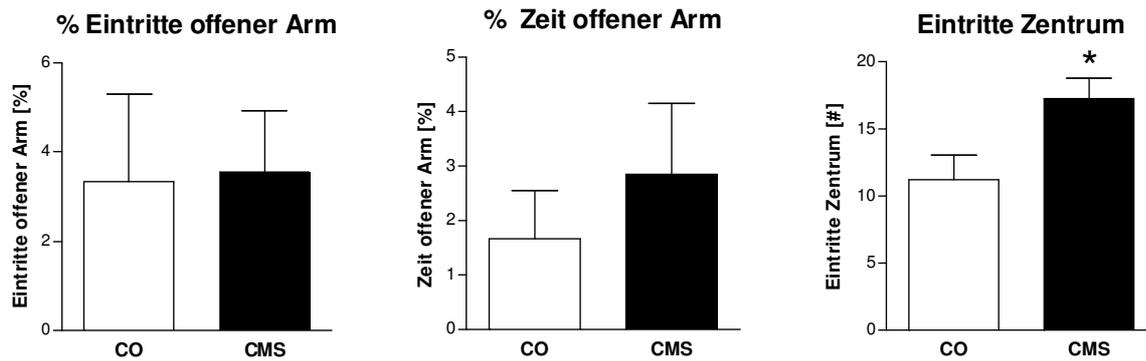
**Abbildung 3.18:** Verhaltensparameter von BL/6J-Mäusen im mHb-Test in Experiment 1 nach 13 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=12$ .

Die in Abbildung 3.19 dargestellten Verhaltensparameter zeigen die Ergebnisse aus dem DaLi-Test von Experiment 5 (4 Wochen nach Stressbeginn). Da die Verhaltensbeobachtung hier nach dem Protokoll von Strekalova et al. erfolgte (Parameter im Tunnel und im Dunklen bei 2 lx nicht erfasst), konnte die Anzahl der Eintritte ins dunkle Kompartiment nicht ermittelt werden. In der Zeit, die die Tiere im Hellen verbrachten und in der Latenz bis zum ersten Eintritt ins helle Kompartiment bestand kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.



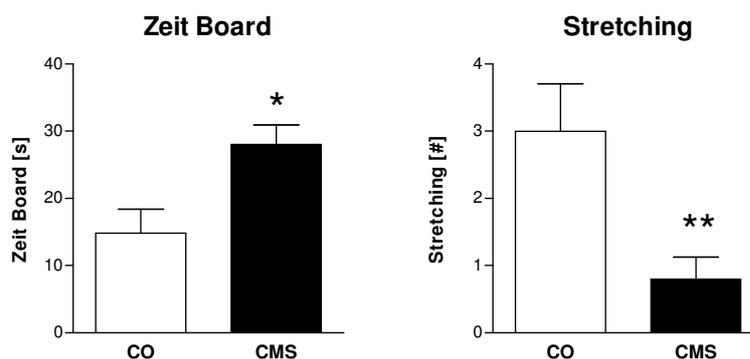
**Abbildung 3.19:** Angstbezogene Verhaltensparameter von BL/6N-Mäusen im DaLi-Test in Experiment 5 nach 4 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=9$  (CO) bzw. 20 (CMS).

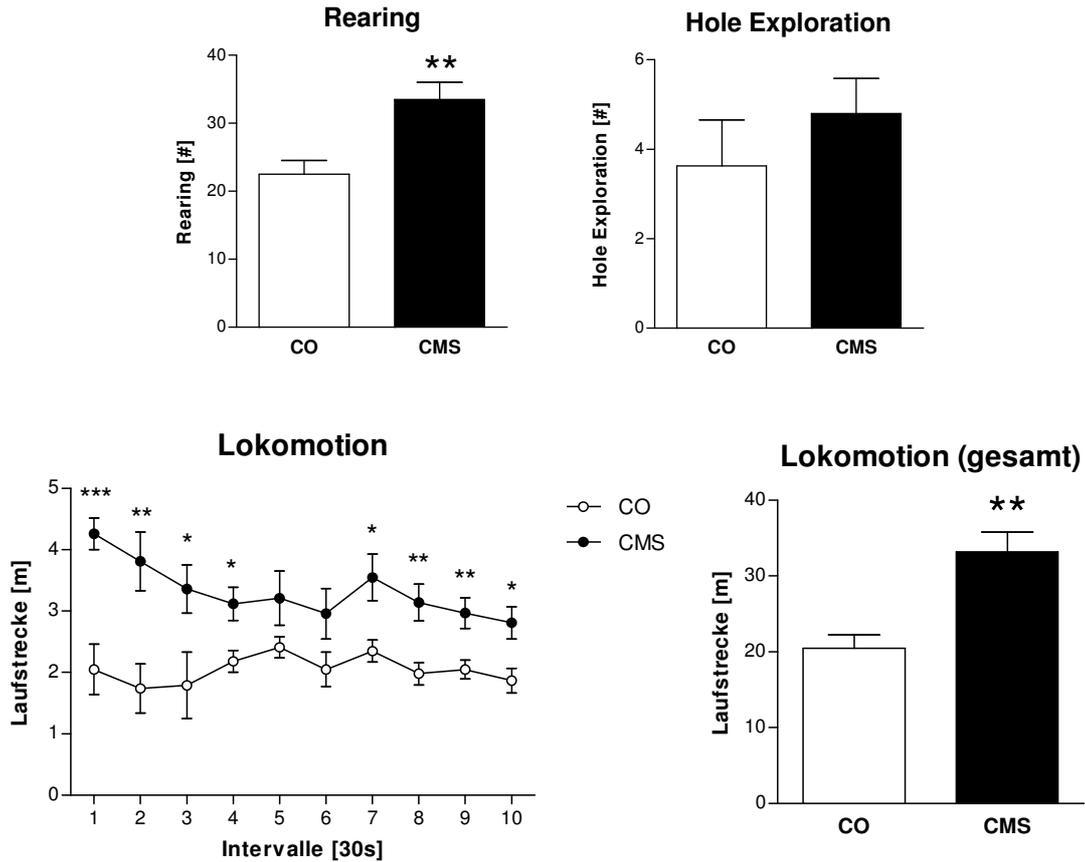
Abbildung 3.20 gibt die Ergebnisse des EPM-Tests von BL/6N-Mäusen in Experiment 5 wieder. Im Anteil der Eintritte auf den offenen Arm und in der anteiligen Zeit auf diesem zeigte sich kein Effekt von CMS. Lediglich die Anzahl der Eintritte ins Zentrum der Apparatur war in gestressten Tieren gegenüber Kontrollmäusen erhöht ( $t_{27}=2,30$ ;  $p<0,05$ ).



**Abbildung 3.20:** Verhaltensparameter von BL/6N-Mäusen im EPM-Test in Experiment 5 nach 4 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=9-20$ . \*  $p<0,05$ .

In Abbildung 3.21 sind die Ergebnisse des mHb-Tests von Experiment 5 dargestellt. Chronisch mild gestresste BL/6N-Mäuse verbrachten hierbei mehr Zeit auf dem *Board* ( $t_{16}= 2,91$ ;  $p<0,05$ ) und zeigten deutlich weniger *Stretching* ( $t_{16}= 3,03$ ;  $p<0,01$ ) im Vergleich zu Kontrolltieren. Bezüglich ungerichteter Exploration zeigten die CMS-Tiere mehr *Rearing* ( $t_{16}= 3,23$ ;  $p<0,01$ ), wobei es in der gerichteten Exploration (*Hole Exploration*) keinen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen gab. Die ANOVA mit Messwiederholungen ergab für chronisch mild gestresste Mäuse eine deutliche Erhöhung der lokomotorischen Aktivität im mHb (Faktor Stress  $F_{1,16}=14,82$ ;  $p<0,01$ ) sowie einen Interaktionseffekt der Faktoren Stress x Zeit ( $F_{9,144}=1,97$ ;  $p<0,05$ ), dessen signifikanten paarweisen Vergleiche in folgender Abbildung markiert sind.

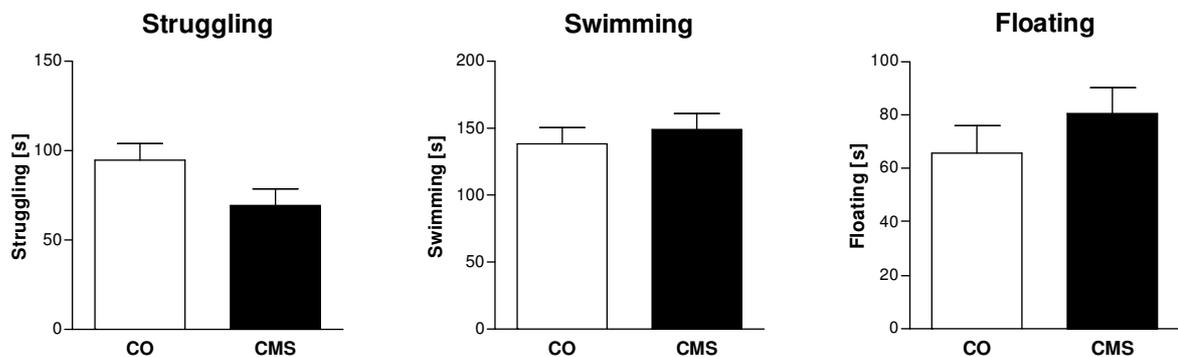




**Abbildung 3.21:** Verhaltensparameter von BL/6N-Mäusen im mHb-Test in Experiment 5 nach 8 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler, Gruppengröße n=8-10. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001

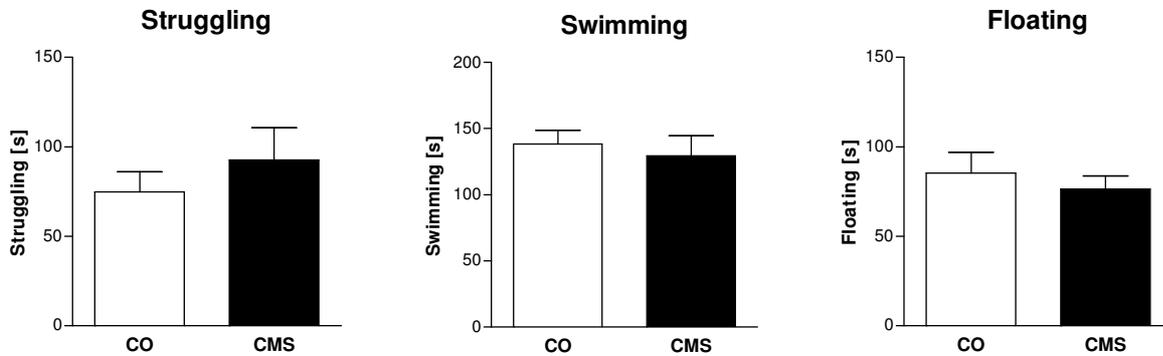
Depressionsbezogenes Verhalten

Im FST in Experiment 1 zeigten die gestressten BL/6J-Tiere nach 12 Wochen CMS eine Tendenz zu vermindertem *Struggling* ( $t_{22}=1,95$ ;  $p=0,064$ ), in den Parametern *Swimming* und *Floating* bestand kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.



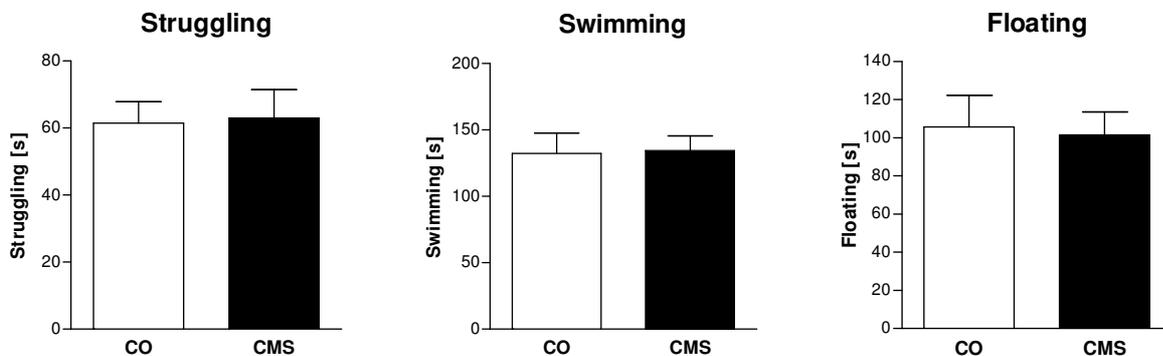
**Abbildung 3.22:** Verhaltensparameter von BL/6J-Mäusen im FST in Experiment 1 nach 12 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler, Gruppengröße n=12.

Die Durchführung des FST in BL6/J-Mäusen nach kürzerer CMS-Erfahrung (4 Wochen, Experiment 3) ergab in allen drei untersuchten Parametern keinen Unterschied zwischen gestressten Mäusen und Kontrolltieren, wie in Abbildung 3.23 gezeigt ist



**Abbildung 3.23:** Verhaltensparameter von BL/6J-Mäusen im FST in Experiment 3 nach 4 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=10$ .

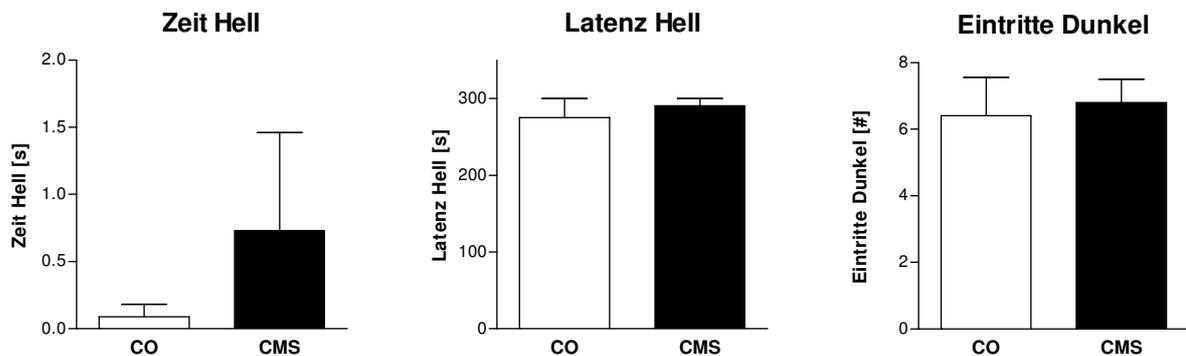
Ebenso wie für die BL/6J-Mäuse ergab die Verhaltenscharakterisierung von BL/6N-Mäusen im FST in allen drei Parametern *Struggling*, *Swimming* und *Floating* keine Veränderung des Verhaltens durch CMS. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 3.24 gezeigt.



**Abbildung 3.24:** Verhaltensparameter von BL/6N-Mäusen im FST in Experiment 5 nach 5 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=10$  (CO) bzw.  $n=20$  (CMS).

**c) Balb/c-Mäuse**Angstbezogenes Verhalten

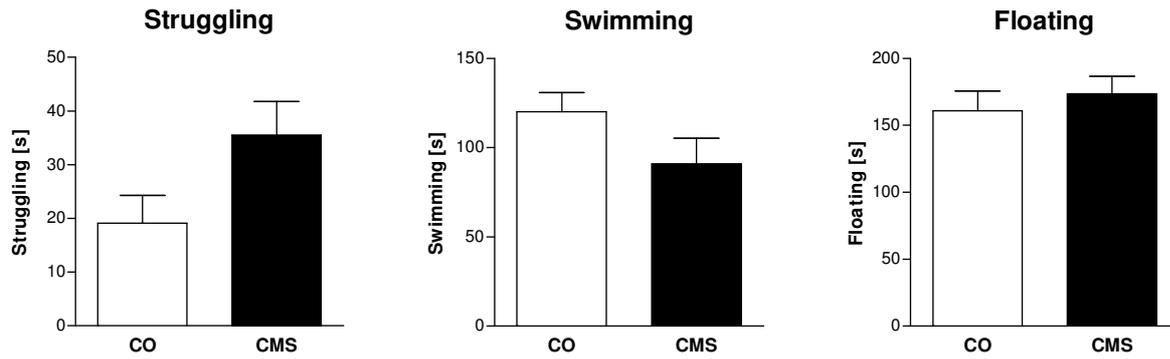
Balb/c-Mäuse wurden in Experiment 3 im *Dark/Light*-Test bereits nach 2 Wochen CMS auf ihre Ängstlichkeit hin getestet. Die Ergebnisse in Abbildung 3.25 zeigen deutlich, dass sowohl Kontroll- als auch CMS-Tiere kaum Zeit im hellen Kompartiment verbrachten. Weder in der Latenz bis zum Betreten von diesem noch in der Zeit, die sie im Hellen verbrachten, unterschieden sich die Versuchsgruppen voneinander. Auch zeigten chronisch mild gestresste Balb/c-Mäuse keine Veränderung in der Anzahl der Eintritte ins dunkle Kompartiment gegenüber der Kontrollgruppe.



**Abbildung 3.25:** Angstbezogene Verhaltensparameter von Balb/c-Mäusen im DaLi-Test in Experiment 3 nach 2 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=10$ .

Depressionsbezogenes Verhalten

Im FST in Experiment 3 wurden Balb/c-Tiere auf depressionsbezogenes Verhalten hin getestet. Dabei verfehlte eine leichte Erhöhung im *Struggling*-Verhalten von gestressten Tieren knapp das Signifikanzniveau ( $t_{16}=2,03$ ,  $p=0,059$ ). In den Parametern *Swimming* und *Floating* hatte CMS keinen Effekt auf das Verhalten im FST.

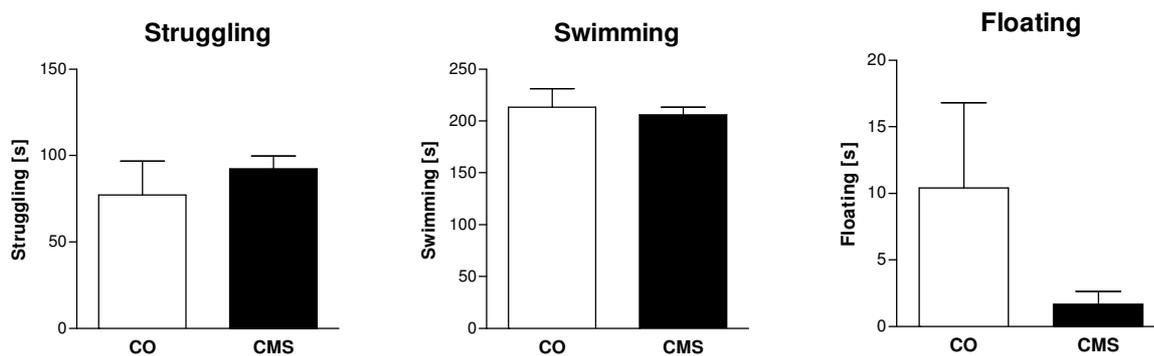


**Abbildung 3.26:** Depressionsbezogene Verhaltensparameter von Balb/c-Mäusen im FST in Experiment 3 nach 4 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=10$ .

#### d) *FVB-Mäuse*

##### Depressionsbezogenes Verhalten

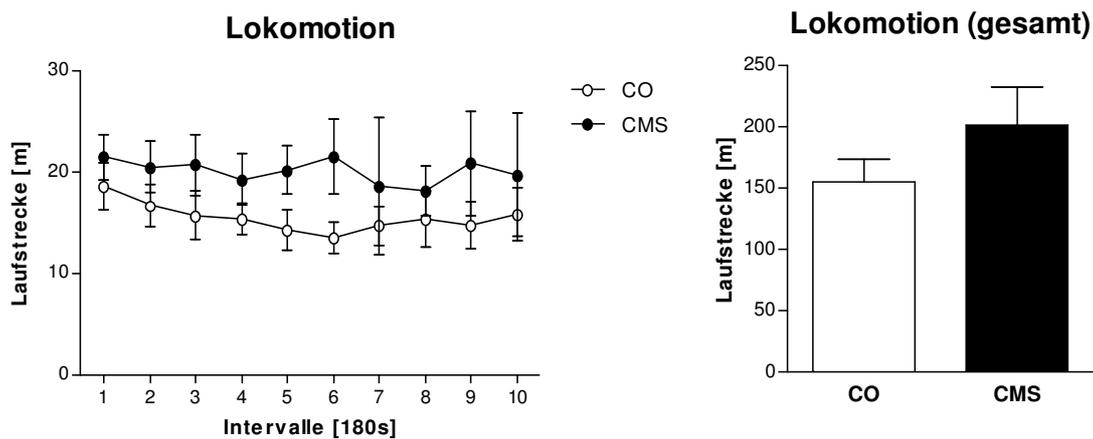
Wie in Abbildung 3.27 dargestellt, ergab sich im FST in FVB-Mäusen (Experiment 4) nach 14 Wochen CMS in keinem der Parameter *Struggling*, *Swimming* und *Floating* ein signifikanter Unterschied im Verhalten von gestressten FVB-Mäusen gegenüber Kontrolltieren.



**Abbildung 3.27:** Verhaltensparameter von FVB-Mäusen im FST2 in Experiment 4 nach 14,5 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=8$ .

Lokomotion

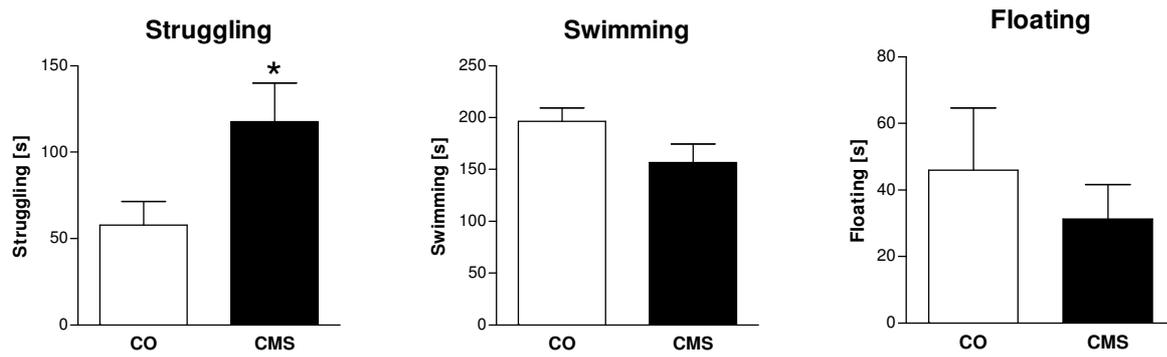
Um Veränderungen in ihrer lokomotorischen Aktivität nach 14 Wochen CMS zu untersuchen, wurden FVB-Mäuse im *Open Field*-Paradigma getestet. Obwohl zu jedem der 10 Zeitpunkte der Mittelwert der lokomotorischen Aktivität der CMS-Gruppe über dem der Kontrollgruppe lag, hatte aufgrund großer Varianz chronisch milder Stress keinen signifikanten Einfluss auf die zurückgelegte Laufstrecke der Tiere im Versuch.



**Abbildung 3.28:** Lokomotorische Aktivität von FVB-Mäusen im *Open Field* in Experiment 4 nach 14 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=7-8$ .

e) **NMRI-Mäuse**Depressionsbezogenes Verhalten

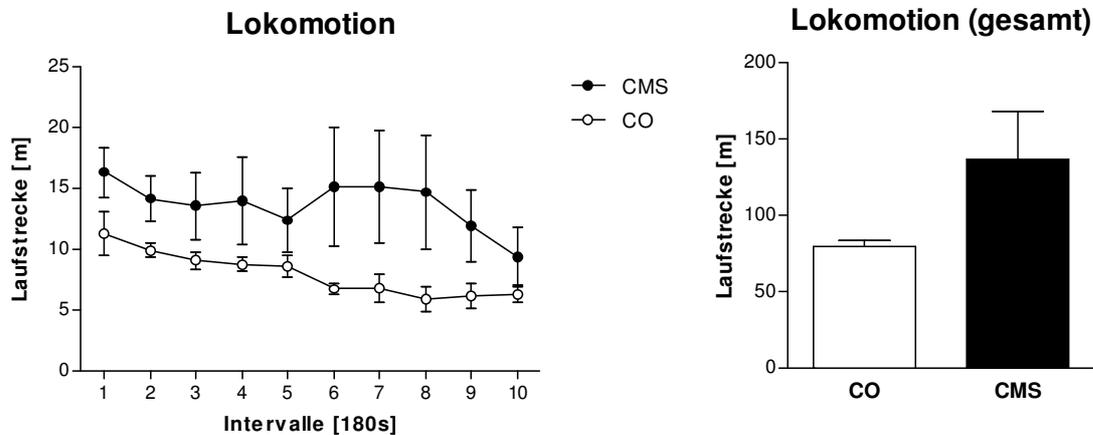
Auf depressionsbezogenes Verhalten von NMRI-Mäusen wurde im FST in Experiment 4 getestet. Die Ergebnisse in Abbildung 3.29 zeigen in gestressten Tieren nach 14 Wochen CMS eine signifikante Erhöhung des *Struggling*-Verhaltens ( $t_{13}=2,20$ ;  $p<0,05$ ). In den anderen Parametern *Swimming* und *Floating* zeigte sich kein Effekt von CMS in NMRI-Mäusen.



**Abbildung 3.29:** Verhaltensparameter von NMRI-Mäusen im FST2 in Experiment 4 nach 14,5 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=7-8$ . \*  $p < 0,05$ .

### Lokomotion

Die lokomotorische Aktivität von NMRI-Mäusen wurde im *Open Field Test* von Experiment 4 untersucht, dessen Ergebnisse in Abbildung 3.30 dargestellt sind. Chronisch milder Stress hatte hierbei aufgrund großer Streuung in der CMS-Gruppe keinen signifikanten Einfluss auf die zurückgelegte Laufstrecke von NMRI-Tieren ( $t_{13}=1,68$ ;  $p=0,116$ ).



**Abbildung 3.30:** Lokomotorische Aktivität von NMRI-Mäusen im *Open Field* in Experiment 4 nach 14 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=7-8$ . Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen hinsichtlich der zurückgelegten Laufstrecke im *Open Field*.

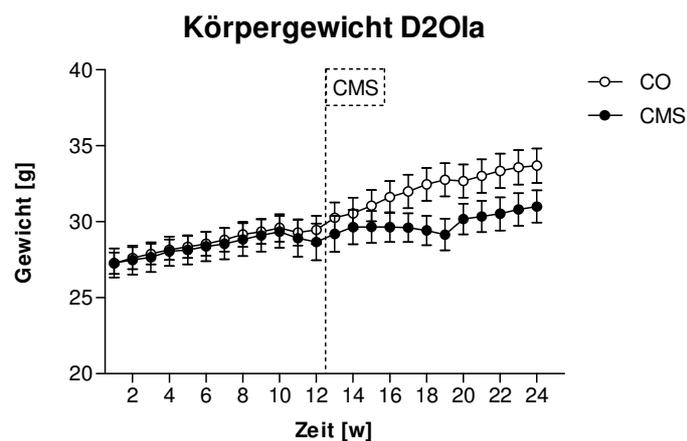
### 3.4.3 Untersuchung von physiologischen und endokrinologischen Parametern in chronisch mild gestressten Mäusen

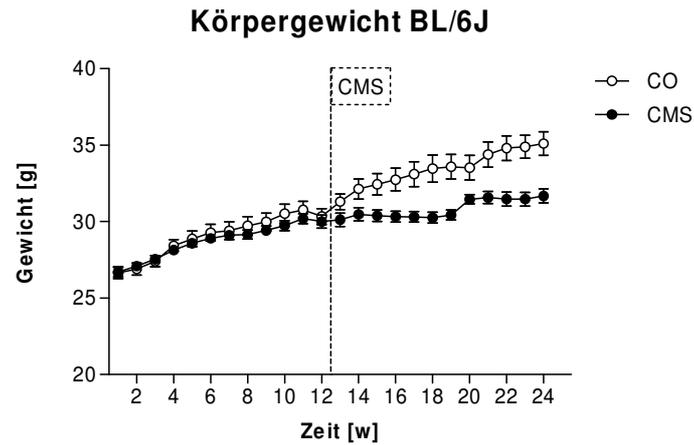
Im Folgenden sind die Daten zu physiologischen und endokrinologischen Parametern der Experimente der Stammcharakterisierung gezeigt. Aufgrund der hohen Bedeutung der Randbedingungen des jeweiligen Experiments (Alter bei Stressbeginn, Zeitpunkt der Blut-/Hirnentnahme, Stresskontext etc.) sind die folgenden Daten nach ihrer Zugehörigkeit zum jeweiligen Experiment und nicht – wie im bisherigen Teil von Kapitel 3 – den Mausstämmen nach geordnet.

#### a) *Beeinflussung des Körpergewichts durch CMS*

##### D201a und BL/6J aus Experiment 1

Zur Auswertung der Körpergewichtszunahme nach Stressbeginn in Experiment 1 wurde die durchschnittliche Steigung der Körpergewichtskurve der in Abbildung 3.31 gezeigten Verläufe zwischen den Messwerten 13 und 24 herangezogen. Für D201a- und für BL/6J-Mäuse ergab sich damit eine Abflachung der Gewichtszunahme durch den Einfluss von CMS ( $t_{21}=2,22$ ;  $p<0,05$  bzw.  $t_{22}=4,00$ ;  $p<0,01$ ).

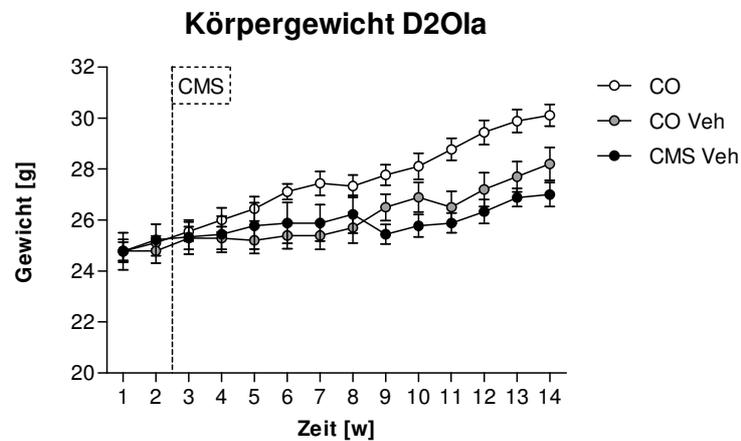




**Abbildung 3.31:** Zeitverlauf des Körpergewichts der D2Ola- und BL/6J-Mäuse aus Experiment 1. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=11-12$ . Trennlinie bedeutet Stressbeginn. Es wurde die durchschnittliche Steigung der Verläufe nach Stressbeginn ausgewertet. CMS zeigte in beiden Stämmen eine Abflachung der Gewichtszunahme (D2Ola:  $p<0,05$ , BL/6J:  $p<0,01$ ).

## D201a aus Experiment 2

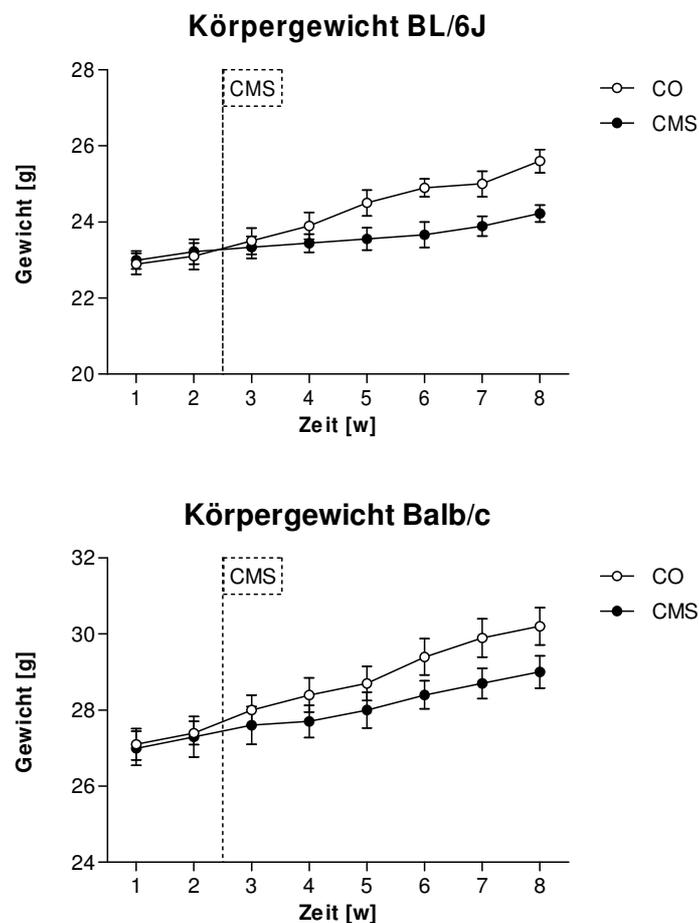
Wie in der folgenden Abbildung dargestellt, wurde für Experiment 2 der durchschnittliche Anstieg des Körpergewichts zwischen den Messwerten 3 und 14 als Maß für den Effekt der Behandlungsgruppen gewählt. Die Einweg-ANOVA ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $F_{2,25}=7,49$ ;  $p<0,01$ ), dessen Lokalisation mithilfe des post-hoc Tests eine Verminderung der Körpergewichtszunahme in der CMS Veh-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe ergab ( $p<0,01$ ) – die Abflachung in den CO Veh-Tieren gegenüber den nicht mit Vehikellösung behandelten Kontrolltieren verfehlte knapp das Signifikanzniveau ( $p=0,079$ ).



**Abbildung 3.32:** Entwicklung des Körpergewichts der D201a-Mäuse in Experiment 2. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße 11 bis 12. Die durchschnittliche Steigung der Gewichtskurven nach Stressbeginn ergab eine signifikante Abflachung gegenüber der CO-Gruppe in den CMS Veh-Tieren ( $p<0,01$ ), die in CO Veh-Tieren kein signifikantes Niveau erreichte.

### BL/6J und Balb/c aus Experiment 3

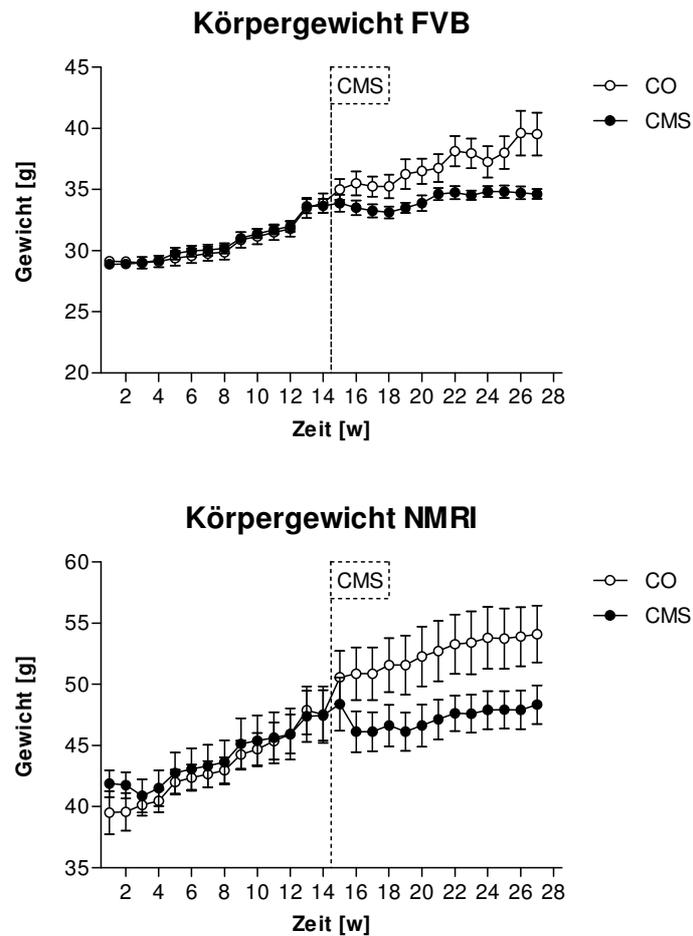
Analog zu Experiment 1 wurde in Experiment 3 die durchschnittliche Steigung der Gewichtszunahme nach Stressbeginn untersucht. Dazu wurden die Gewichtszunahme zwischen den in Abbildung 3.33 gezeigten Messwerten 3 bis 8 gemittelt und die Behandlungsgruppen verglichen. Es ergab sich in Balb/c-Mäusen kein Effekt von CMS, dieser war jedoch in BL/6J-Mäusen aus Experiment 3 in der Lage, die Gewichtszunahme im Stressintervall zu verringern ( $t_{17}=2,93$ ;  $p<0,01$ ).



**Abbildung 3.33:** Zeitverläufe des Körpergewichts von Balb/c- und BL/6J-Tieren aus Experiment 3. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=9-10$ . Trennlinie bedeutet Stressbeginn. Die Auswertung der durchschnittlichen Gewichtszunahme (Messwerte 3 bis 8) nach Stressbeginn ergab eine Abflachung durch CMS in BL/6J-Mäusen ( $p<0,01$ ), in Balb/c-Tieren konnte dieser Effekt jedoch nicht beobachtet werden.

### FVB und NMRI aus Experiment 4

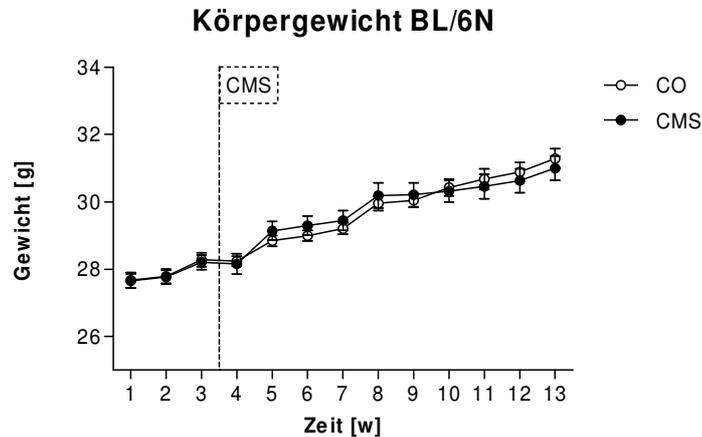
In den in Experiment 4 untersuchten Mausstämmen FVB und NMRI wurde die durchschnittliche Gewichtszunahme nach Stressbeginn ermittelt (siehe Abbildung 3.34). Für beide betrachteten Stämme ergab sich eine verminderte Zunahme des Körpergewichts durch CMS (FVB:  $t_{14}=2,43$ ;  $p<0,05$ ; NMRI:  $t_{13}=2,32$ ;  $p<0,05$ ).



**Abbildung 3.34:** Zeitverlauf des Körpergewichts von FVB- und NMRI-Mäuse aus Experiment 4. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=8$ . Trennlinie bedeutet Stressbeginn. In beiden Mausstämmen verursachte CMS eine verminderte Zunahme des Körpergewichts (beide  $p<0,05$ ).

### BL/6N aus Experiment 5

Die Gewichtszunahme der BL/6N-Mäuse in Experiment 5 blieb im Messintervall (Messwerte 4 bis 13) unbeeinflusst durch CMS, wie in Abbildung 3.35 ersichtlich.

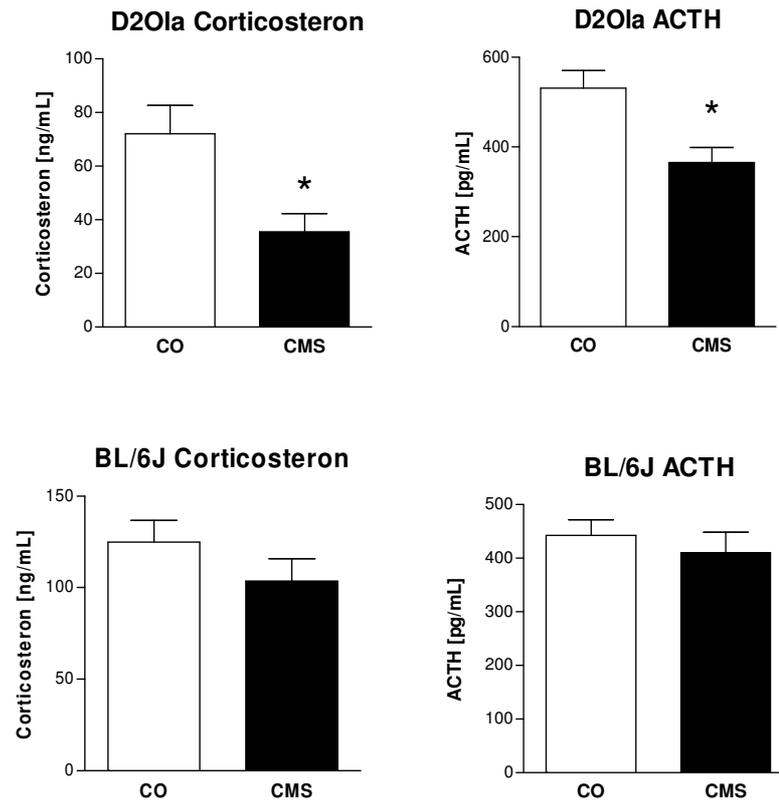


**Abbildung 3.35:** Verlauf des Körpergewichts in BL/6N-Mäusen aus Experiment 5. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=20$ . Es ergab sich kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen.

**b) *Plasmahormonspiegel (Corticosteron & ACTH) und molekularbiologisch erhobene Befunde zu stressrelevanten physiologischen Parametern***

### D201a und BL/6J aus Experiment 1

D201a- und BL/6J-Mäuse mit und ohne 13 Wochen CMS-Erfahrung wurden unmittelbar nach Beendigung des 5minütigen mHb-Tests – durchgeführt zu Beginn der Dunkelphase – getötet und ihnen Blut zur weiteren Verwendung entnommen. Die daraus ermittelten Corticosteron- und ACTH-Plasmaspiegel sind in Abbildung 3.36 dargestellt. Für die D201a-Mäuse ergab sich nach insgesamt 13 Wochen CMS sowohl ein erniedrigter Corticosteron- als auch ein erniedrigter ACTH-Plasmaspiegel im Vergleich zu Kontrolltieren ( $t_{17}=2,64$ ;  $p<0,05$  bzw.  $t_{21}=3,17$ ;  $p<0,01$ ). Diese Verringerung der Stresshormone fand in den BL/6J-Mäusen des gleichen Experimentes nicht in signifikantem Ausmaß statt.

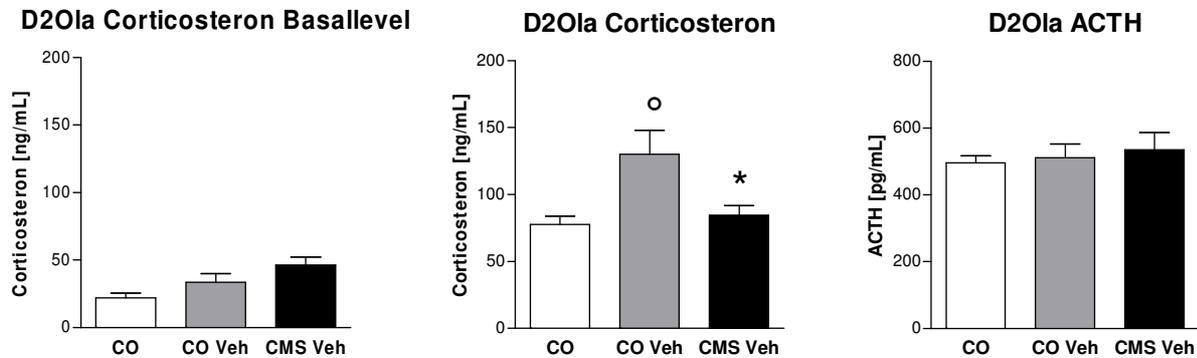


**Abbildung 3.36:** Plasmaspiegel der Stresshormone Corticosteron und ACTH in D20la- und BL/6J-Mäusen unmittelbar nach dem mHb-Test aus Experiment 1 nach 13 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=8-11$ . \*  $p<0,05$  im Vergleich zu Kontrolltieren.

### D20la aus Experiment 2

In Experiment 2 wurde nach vier Wochen CMS – und damit vor Beginn der pharmakologischen Behandlung – die Corticosteronkonzentration im Plasma der Tiere der Versuchsgruppen CO, CO Veh und CMS Veh in einem Zeitintervall ohne akut stressende Manipulationen (morgens 8h) ermittelt (=basal). Die statistische Auswertung mittels Einweg-ANOVA verfehlte knapp das Signifikanzniveau ( $F_{2,42}=2,89$ ;  $p=0,067$ ), so dass kein signifikanter Unterschied des basalen Corticosteronplasmaspiegels feststellbar war, siehe Abbildung 3.37. Jedoch zeigte die Vehikelbehandlung in Kontrolltieren eine tendenzielle Erhöhung des Corticosteronspiegels unter Basalbedingungen, die durch CMS weiter (tendenziell) erhöht wurde. Die Analyse des nach dem finalen Verhaltensexperiment gewonnenen Blutes (Dekapitation unmittelbar nach Beendigung des zweiten FSTs nach 14 Wochen CMS) ergab zwar keine Unterschiede der ACTH-Konzentrationen, die Corticosteronspiegel jedoch unterschieden sich signifikant ( $F_{2,25}=5,55$ ;  $p<0,05$ ). So zeigten CO Veh-Tiere sowohl im Vergleich zu Kontroll- ( $p<0,05$ )

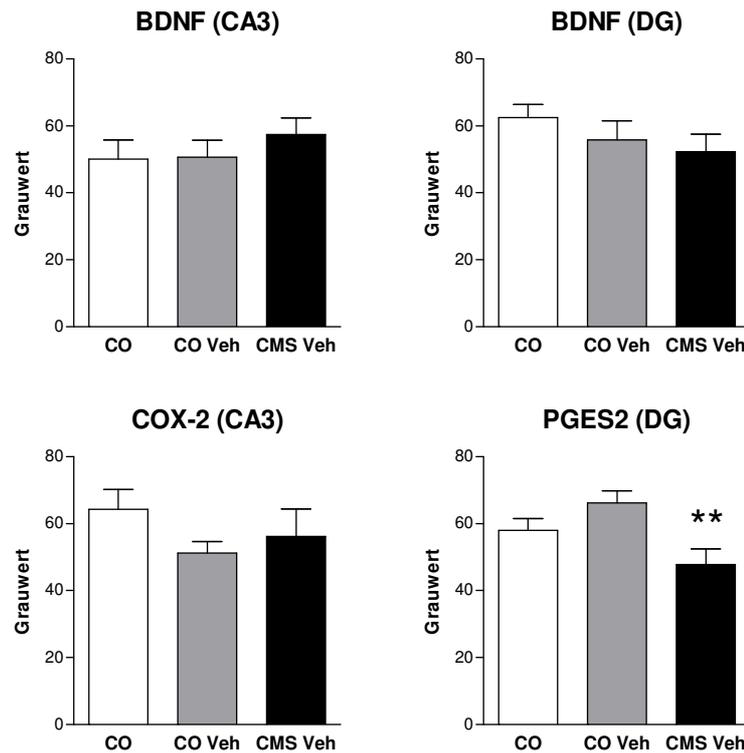
als auch zu CMS Veh-Mäusen ( $p < 0,05$ ) eine erhöhte Konzentration von Corticosteron im Plasma. Dies zeigt deutlich, dass CMS die durch die Vehikelbehandlung erhöhte Corticosteronantwort der Tiere wieder auf das Niveau der CO-Tiere reduziert.



**Abbildung 3.37:** Plasmaspiegel der Stresshormone Corticosteron (inkl. Basallevel) und ACTH in D201a-Mäusen unmittelbar nach dem FST aus Experiment 2 nach 9,5 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=9-11$  bzw. 30 (CMS Veh-Gruppe bei der Bestimmung des Basallevels für Corticosteron). \*  $p < 0,05$  im Vergleich CO Veh zu CMS Veh;  $^{\circ} p < 0,05$  im Vergleich CO zu CO Veh.

### Immunohistochemie: Proteinexpression von BDNF, COX-2 und PGES2 im Hippocampus

In Experiment 2 wurden mittels Immunohistochemie die Strukturen BDNF, COX-2 und PGES2 in drei der vier Behandlungsgruppen aus Experiment 2 (CO, CO Veh, und CMS Veh) in D201a-Mäusen nach 9,5 Wochen CMS untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.38 gezeigt. Für BDNF konnte in zwei Regionen des Hippocampus (*Cornu ammonis 3* und *Gyrus dentatus*) kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen gefunden werden, für COX-2 ebenfalls keiner in der CA3-Region. Lediglich hinsichtlich der PGES2-Expression im *Gyrus dentatus* der CMS Veh-Mäuse konnte ein CMS-Effekt im Vergleich zu CO Veh-Mäusen gefunden werden ( $F_{2,27}=5,43$ ;  $p < 0,01$ ), sie war in dieser Versuchsgruppe durch CMS erniedrigt ( $p < 0,01$ ).



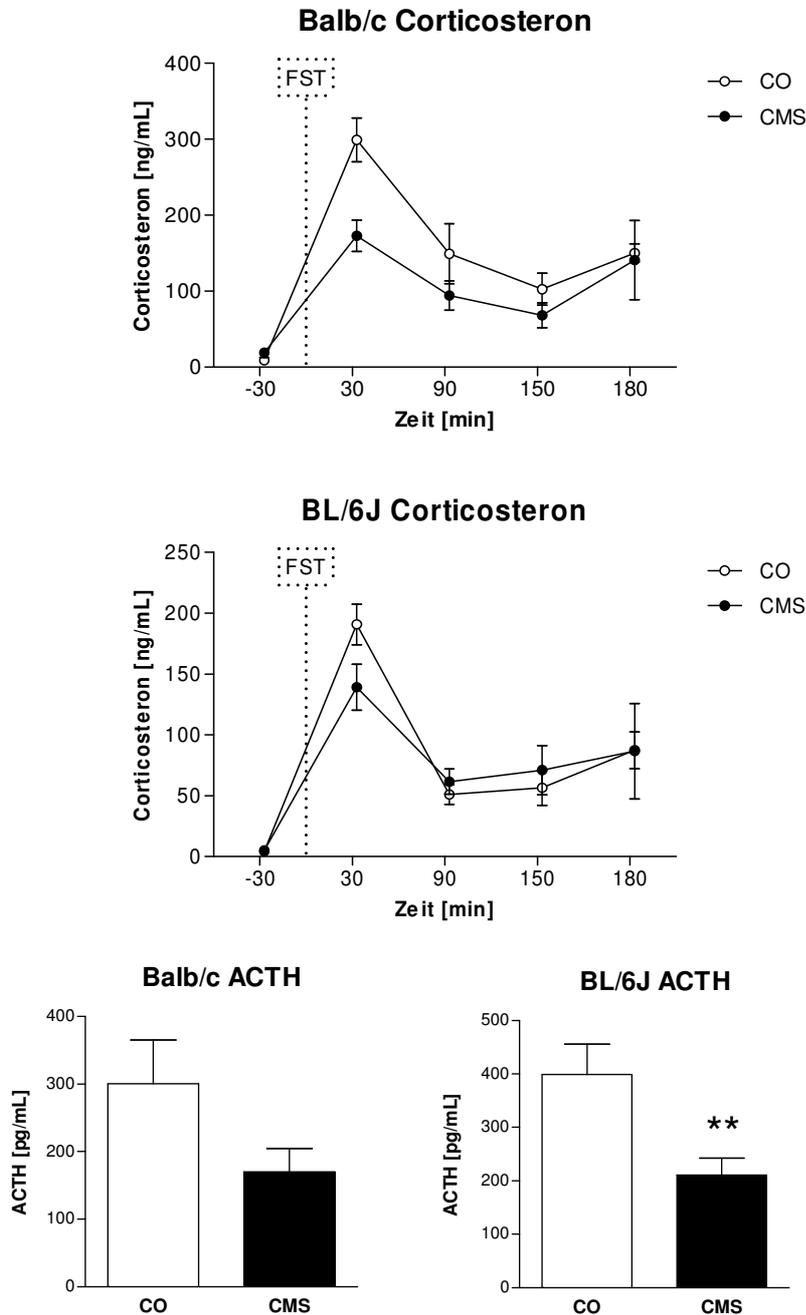
**Abbildung 3.38:** Immunohistochemisch untersuchte Proteinexpression von BDNF, COX-2 und PGES2 im Hippocampus der D20la-Mäuse aus Experiment 2 nach 9,5 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler, Gruppengröße n=10. \*\* p<0,01

### BL/6J und Balb/c aus Experiment 3

In Experiment 3 wurde nach 4 Wochen CMS die Stresshormon-Antwort auf den finalen Verhaltenstest (FST) in Form eines Zeitverlaufs untersucht (siehe Abbildung 3.39). Dazu wurde den Tieren 30 Minuten vor Beginn des FSTs unter möglichst stressfreien Bedingungen (Basalwert) ca. 50 µL Blut aus dem Schwanz abgenommen. Ebenso wurde verfahren zu den Zeitpunkten 30 min, 90 min und 150 min nach Beendigung des Tests. 180 Minuten nach Beendigung des FSTs wurden die Tiere getötet und eine weitere Blutprobe genommen. Sowohl in Balb/c- als auch in BL/6J-Mäusen hatte CMS keine Auswirkung auf den basalen Corticosteronspiegel 30 Minuten vor Testbeginn, in beiden Stämmen wurden Corticosteronwerte unabhängig der Versuchsgruppe zwischen 5 und 10 ng/mL gemessen. Die ANOVA mit Messwiederholungen ergab für die vier dem FST folgenden Zeitpunkte in Balb/c-Mäusen eine niedrigere Auslenkung des Corticosteronwertes in gestressten im Vergleich zu Kontrolltieren ( $F_{1,17}=4,99$ ;  $p<0,05$ ), wohingegen in

BL/6J-Mäusen kein Effekt der Behandlungsgruppe zu beobachten war. In beiden Stämmen hatte CMS keine Auswirkung auf den Zeitverlauf (Interaktion Stress x Zeit).

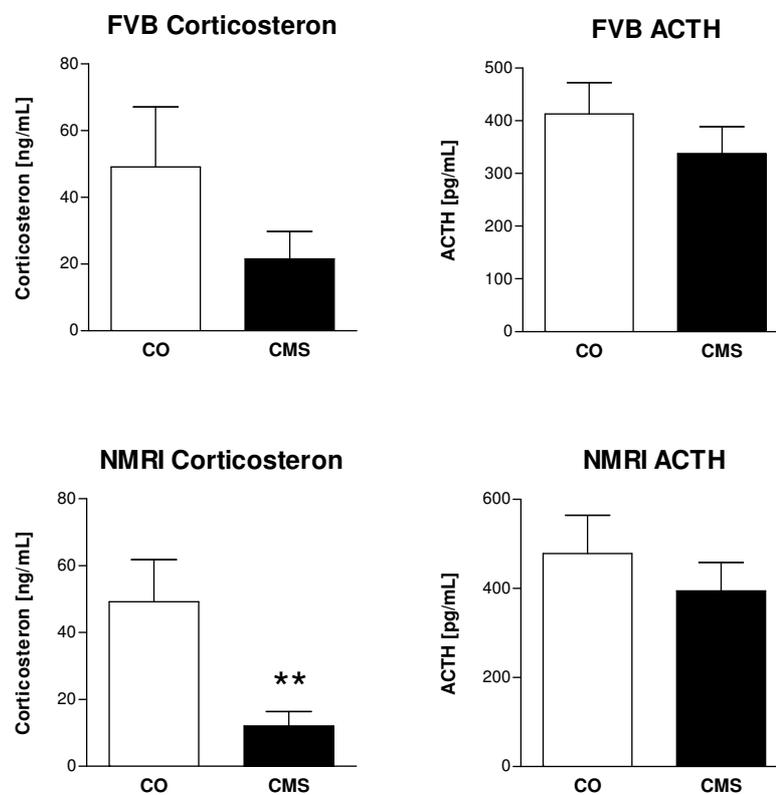
Die ACTH-Konzentrationen im Blutplasma waren 180 Minuten nach dem FST in der CMS-Gruppe der BL/6J-Mäuse erniedrigt im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $t_{18}=2,89$ ;  $p<0,01$ ), in Balb/c-Tieren erreichte dieser Effekt kein signifikantes Niveau.



**Abbildung 3.39:** Zeitverlauf der Corticosteronkonzentration nach dem FST von Experiment 3 und ACTH-Konzentration nach dem anschließenden Töten im Blutplasma von Balb/c- und BL/6J-Mäusen nach 4 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=9-10$ . In den Zeitverlaufdiagrammen für Corticosteron (oben) sind die Corticosteronkonzentrationen unter basalen Bedingungen 30 Minuten vor Testbeginn (FST, siehe Trennlinie) gezeigt. Die vier anschließenden Werte der Zeitreihen stellen den weiteren Verlauf bis zum Tötungszeitpunkt (180 Minuten) dar, zu dem auch die ACTH-Konzentrationen (unten) ermittelt wurden.

FVB und NMRI aus Experiment 4

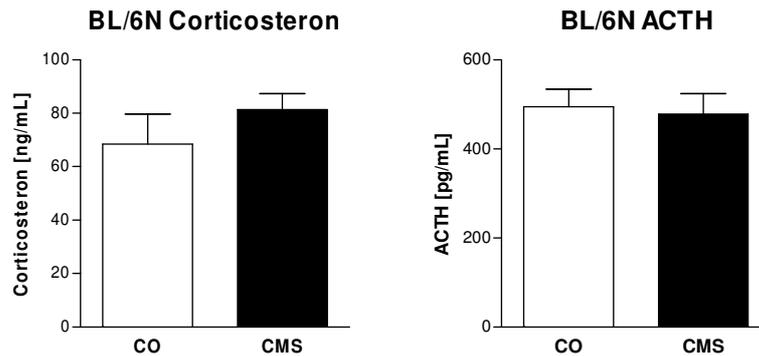
In Experiment 4 wurden FVB- und NMRI-Mäuse auf ihre Plasmahormonkonzentrationen nach dem Töten nach insgesamt 15 Wochen CMS unter akut stressfreien Bedingungen zu Beginn der Dunkelphase hin untersucht. Die Ergebnisse, die in Abbildung 3.40 dargestellt sind, zeigen nur eine Verringerung des Corticosteronspiegels durch CMS in NMRI-Tieren als statistisch signifikantes Ergebnis ( $t_{11}=3,33$ ;  $p<0,01$ ). Weder auf das Plasmacorticosteron von FVB-Mäusen noch auf den ACTH-Spiegel der beiden Stämme hatte der vorangegangene CMS einen signifikanten Einfluss.



**Abbildung 3.40:** Corticosteron- und ACTH-Konzentrationen der FVB- und NMRI-Mäuse aus Experiment 4 unter akut ungestressten Bedingungen und nach 15 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=5-8$ . Das analysierte Blut wurde beim Töten unter Basalbedingungen zu Beginn der Dunkelphase gewonnen. \*\*  $p<0,01$

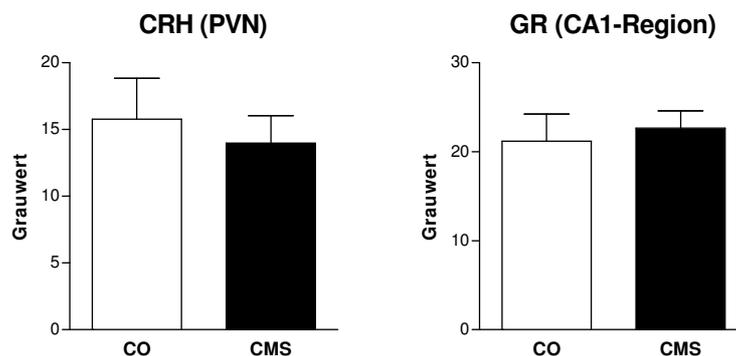
### BL/6N aus Experiment 5

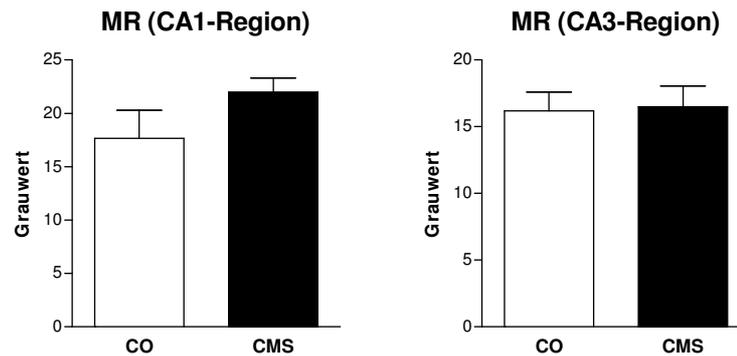
Die unmittelbar nach dem mHb-Test zu Beginn der Dunkelphase nach insgesamt 8 Wochen CMS getöteten BL/6N-Mäuse aus Experiment 5 zeigten unter diesen Bedingungen keinen Effekt von CMS auf Plasmacortisol und ACTH, wie folgende Abbildung zeigt.



**Abbildung 3.41:** Corticosteron- und ACTH-Konzentrationen der BL/6N-Mäuse aus Experiment 5 unmittelbar nach dem mHb-Test und nach 8 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße n=8-10.

Ebenfalls in Experiment 5, in dem die Proteine CRH, GR und MR im PVN bzw. in den Hippocampusregionen CA1 und CA3 in Kontroll- und CMS-Mäusen untersucht wurden, ergab sich kein Unterschied in den entsprechenden Expressionen an mRNA, wie Abbildung 3.42 zeigt.





**Abbildung 3.42:** mRNA-Expression der drei Proteine CRH, MR und GR im Hippocampus (GR und MR) bzw. im PVN (CRH) der BL/6N-Tiere aus Experiment 5 unmittelbar nach dem mHb-Test und nach 8 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=5$ .

#### 3.4.4 Effekte chronischer Paroxetinbehandlung im CMS-Modell

Die Verhaltenseffekte chronischer Paroxetinbehandlung im CMS-Modell wurden in Experiment 2 in D20la-Mäusen ermittelt.

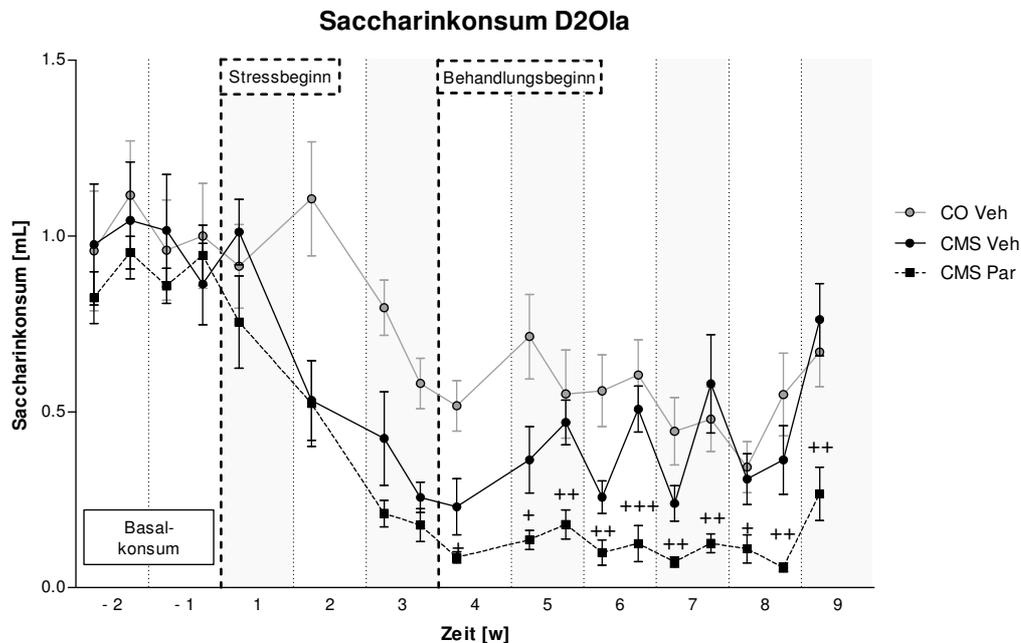
In den folgenden Graphen dargestellt sind die Gruppen CO Veh, CMS Veh und CMS Paroxetin; in die vergleichende Analyse gingen nur die Gruppen CMS Veh und CMS Par ein, die Daten der mit Vehikellösung behandelten Kontrolltiere sind nur zur Illustration mit dargestellt.

##### a) *Verhaltenseffekte chronischer Paroxetinbehandlung im CMS-Modell*

Die Ermittlung des Konsumverhaltens in den D20la-Mäusen gliederte sich in drei Abschnitte: zuerst die Erfassung des Basalkonsums, danach ein dreiwöchiges Intervall, in dem die drei hier beschriebenen Versuchsgruppen mit Vehikellösung behandelt wurden, und zuletzt der Abschnitt, in dem eine der gestressten Gruppen Paroxetin i.g. verabreicht bekam. Die statistische Auswertung beschränkte sich auf den letzten Zeitabschnitt.

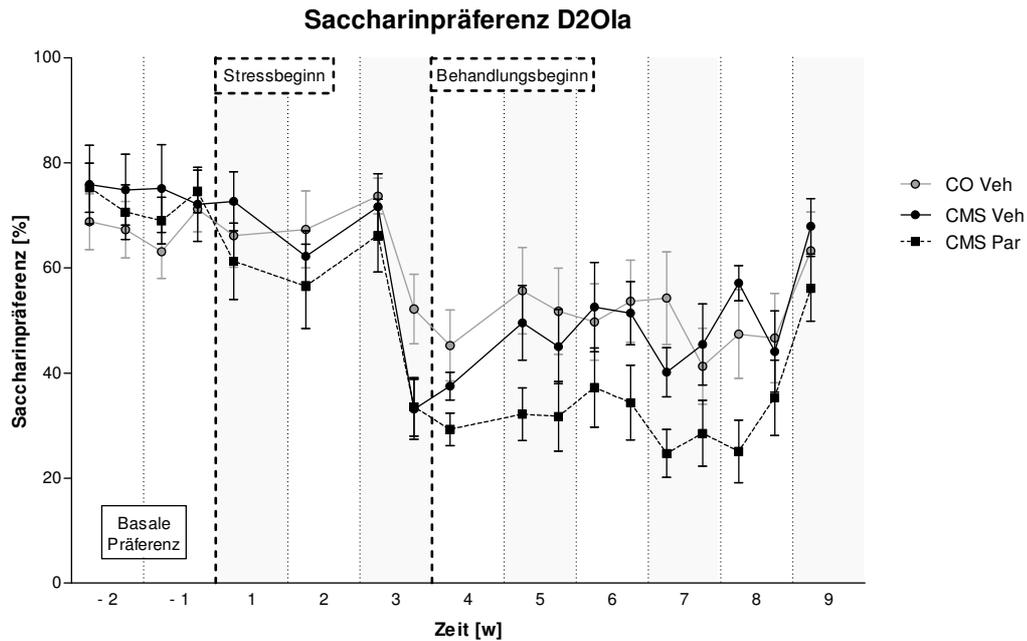
Für den Zeitraum nach Beginn der pharmakologischen Behandlung ergab die Einweg-ANOVA mit Messwiederholungen einen deutlichen Unterschied im Faktor Behandlungsgruppe ( $F_{1,18}=34,43$ ;  $p<0,001$ ) für ihren Saccharinkonsum. Die Tiere aus der mit Paroxetin behandelten Stressgruppe (CMS Par) tranken im Vergleich zu den mit Vehikel behandelten CMS-Tieren (CMS Veh) signifikant weniger Saccharinlösung. Den zeitlichen Verlauf des Saccharinkonsums betrachtet ergab sich ein hoch signifikanter

Interaktionseffekt der Faktoren Behandlungsgruppe x Zeit ( $F_{9,162}=2,95$ ;  $p<0,01$ ;  $\epsilon=0,429$ ). Durchgängig in dem in Abbildung 3.43 betrachteten Zeitabschnitt (d.h. ab Woche 4) ergab sich im Verlauf des Saccharinkonsums eine deutliche Reduktion der getrunkenen Saccharinlösung in CMS Par-Tieren verglichen mit dem Konsum der CMS Veh-Mäuse.



**Abbildung 3.43:** Saccharinkonsum von D20la-Mäusen in Experiment 2. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Saccharinkonsums der für die Untersuchung des Paroxetin-Effekts relevanten Gruppen während der zweistündigen Messintervalle, Gruppengröße  $n=9-11$ . Die statistische Auswertung erstreckt sich nur über den letzten Zeitabschnitt nach Beginn der pharmakologischen Behandlung. +  $p<0,05$ , ++  $p<0,01$ , +++  $p<0,001$  im paarweisen Vergleich (CMS Veh vs. CMS Par).

Analog zu dem im vorigen Abschnitt behandelten Saccharinkonsum wurde auch die Saccharinpräferenz ausgewertet. Auch hier ergab sich ein Behandlungseffekt ( $F_{1,18}=13,38$ ;  $p<0,01$ ) im betrachteten Zeitraum ab Woche 4. Zusammengenommen mit einem fehlenden Interaktionseffekt der Faktoren Behandlungsgruppe x Zeit ergab die Auswertung der betrachteten Saccharinpräferenzen zwar keinen unterschiedlichen Zeitverlauf zwischen den Behandlungsgruppen, jedoch eine Verminderung der Präferenz für Saccharinlösung in CMS Par-Mäusen gegenüber CMS Veh-Tieren, siehe Abbildung 3.44.

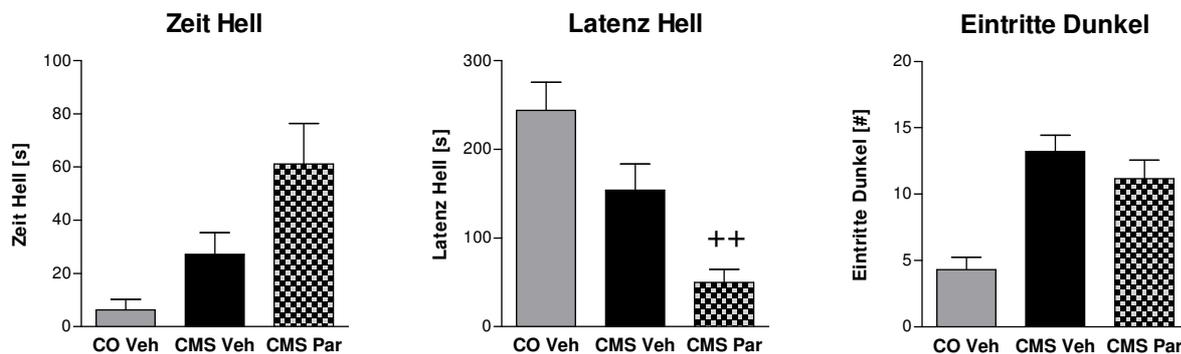


**Abbildung 3.44:** Saccharinpräferenz von D20la-Mäusen in Experiment 2. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Saccharinpräferenz der für die Untersuchung des Paroxetin-Effekts relevanten Gruppen während der zweistündigen Messintervalle, Gruppengröße  $n=9-11$ . Die statistische Auswertung erstreckt sich nur über den letzten Zeitabschnitt nach Beginn der pharmakologischen Behandlung.

Die Paroxetinbehandlung setzte in mit Vehikel behandelten CMS-Tieren den Saccharinkonsum deutlich zu jedem Messzeitpunkt herab. Zusammen mit einer in der Gesamtbetrachtung verringerten Saccharinpräferenz durch Paroxetingabe lässt sich auf einen pro-anhedonischen Effekt von Paroxetin auf das Konsumverhalten schließen.

DaLi Box nach 7,5w CMS und nach 3,5w Paroxetinbehandlung

Im *Dark/Light Box*-Test von Experiment 2 (siehe Abbildung 3.45) wurde der Effekt der Paroxetinbehandlung auf angstassoziierte Verhaltensparameter in CMS Veh-Mäusen untersucht. Dabei ergab sich kein Unterschied in der Zeit, die die Tiere im hellen Kompartiment verbrachten. Paroxetin verkürzte in CMS Veh-Tieren die Latenz bis zum ersten Betreten des hellen Kompartiments ( $t_{18}=3,32$ ;  $p<0,01$ ). Für den Parameter „Anzahl der Eintritte ins Dunkle“ ergab sich kein Effekt der Paroxetinbehandlung.



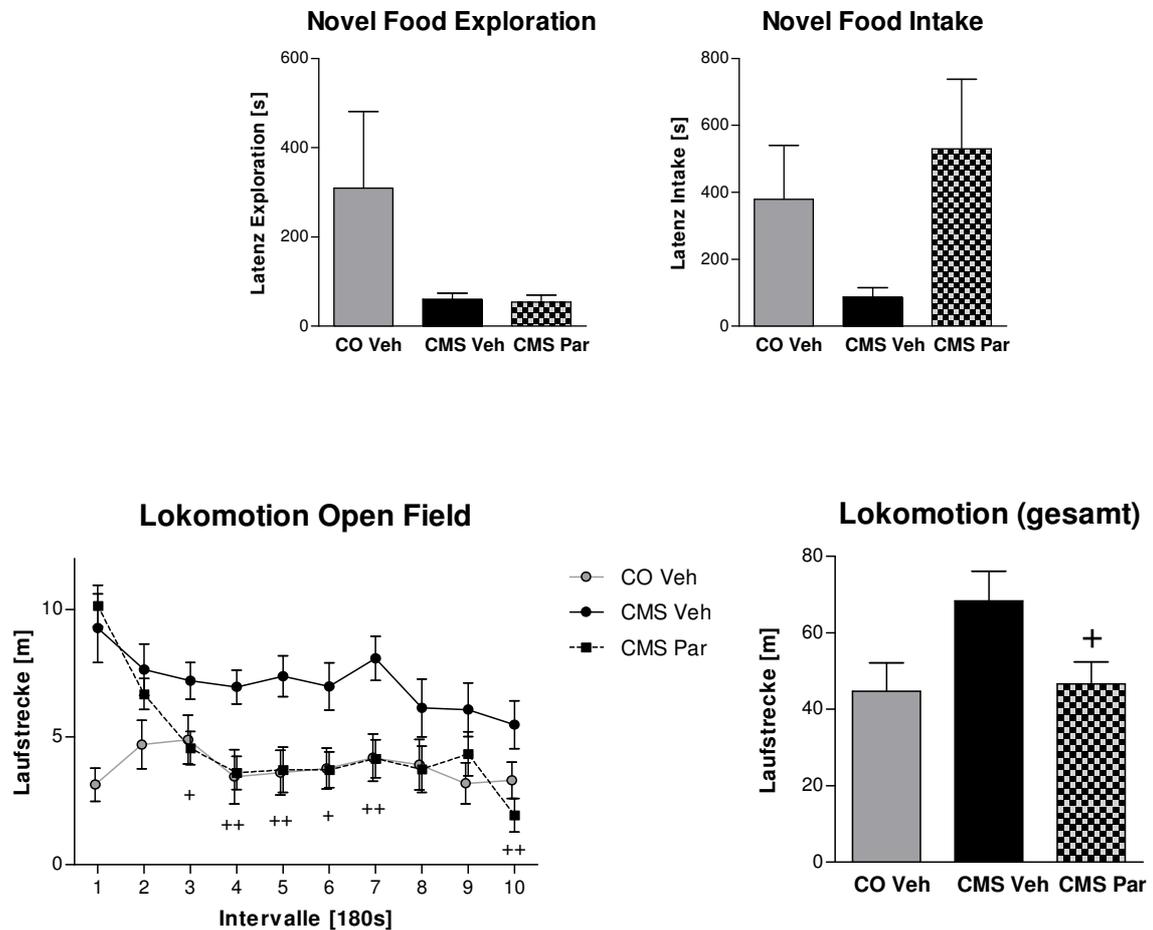
**Abbildung 3.45:** Verhaltensparameter aus dem *Dark/Light Box*-Test in D201a-Mäusen aus Experiment 2 nach 7,5 Wochen CMS und 3,5 Wochen Paroxetinbehandlung. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=9-11$ . ++  $p<0,05$  im paarweisen Vergleich (CMS Veh vs. CMS Par).

Verhaltenswirkungen von chronischer Paroxetinbehandlung in CMS-Tieren im Open Field

Test mit Food Intake Inhibition

Aufgrund hoher Streuung in den Latenzen bis zur Exploration und zum Fressen von unbekanntem Futter (Mandelstückchen) konnte in den Parametern Novel Food Exploration und Novel Food Intake kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen gefunden werden (Abbildung 3.46). In der lokomotorischen Aktivität über die 30 Minuten hinweg unterschieden sich die Behandlungsgruppen im *Open Field* jedoch deutlich (Faktor Behandlungsgruppe  $F_{1,18}=7,58$ ;  $p<0,05$ ): die Paroxetingabe reduzierte die erhöhte lokomotorische Aktivität der CMS Veh-Behandlung. Differenzierter betrachtet gibt der Zeitverlauf in Abbildung 3.46 den Effekt von CMS und dessen Kombination mit Paroxetinbehandlung auf die lokomotorische Aktivität in den untersuchten D201a-Mäusen wieder (Faktoren Behandlungsgruppe  $\times$  Zeit  $F_{9,162}=3,09$ ;  $p<0,05$ ;  $\epsilon=0,433$ ). Ab dem dritten Zeitintervall wurde die durch CMS Veh-Behandlung

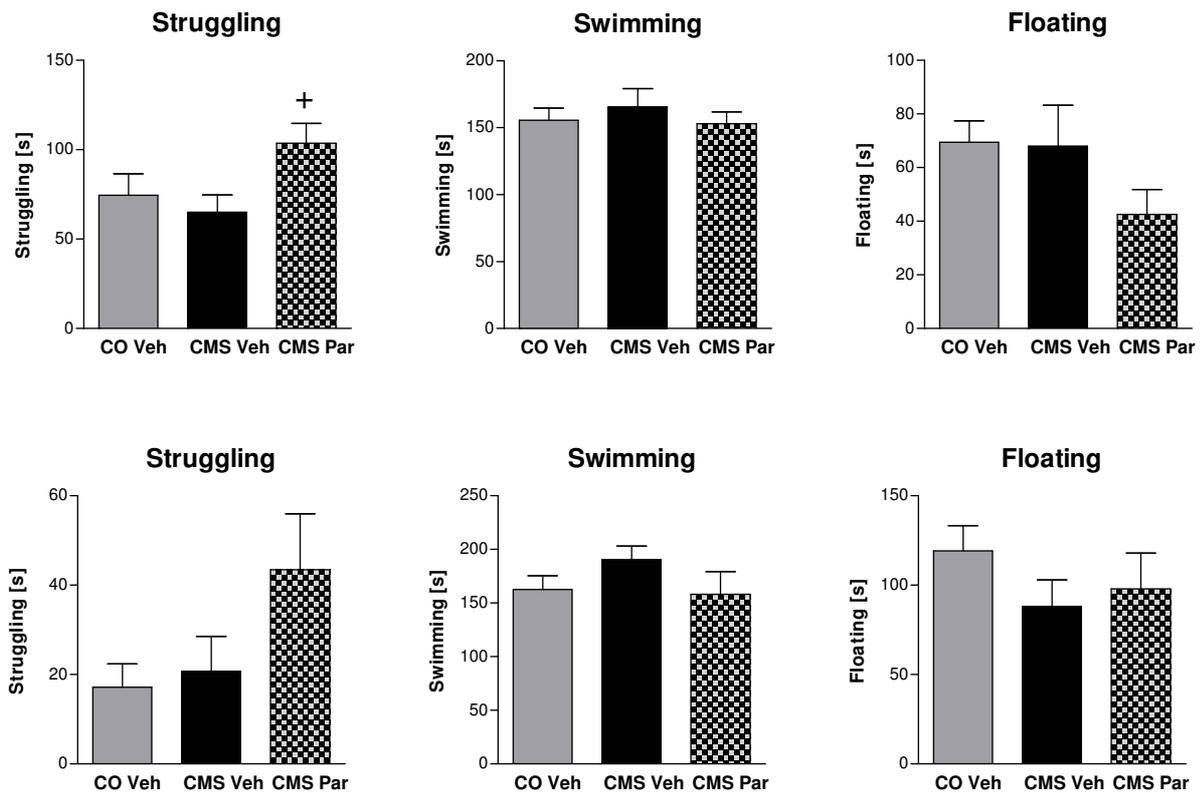
erhöhte lokomotorische Aktivität bis zum Ende des Tests in der Mehrzahl der Intervalle durch Paroxetin reduziert.



**Abbildung 3.46:** Verhaltensparameter aus dem *Open Field*-Test in D201a-Mäusen aus Experiment 2 nach 8,5 Wochen CMS und 4,5 Wochen Paroxetinbehandlung. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=9-11$ . +  $p<0,05$ , ++  $p<0,01$ , im paarweisen Vergleich (CMS Veh vs. CMS Par).

Verhaltenseffekte von chronischer Paroxetinbehandlung in CMS-Tieren im FST

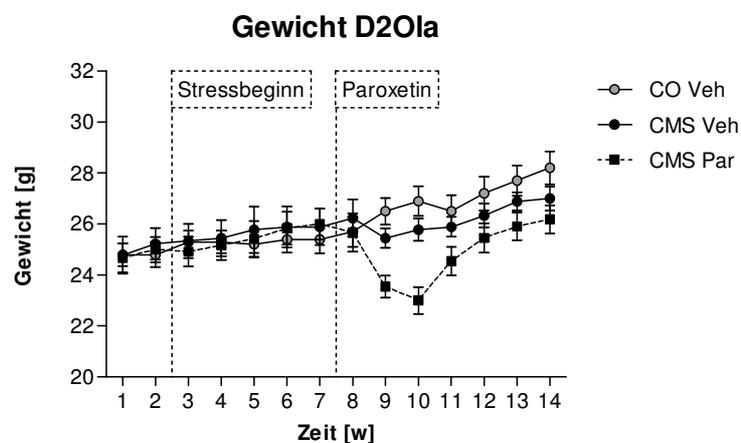
Im Test auf depressionsassoziiertes Verhalten in den beiden FSTs zeigte die Paroxetinbehandlung im ersten FST (siehe Abbildung 3.47) eine Erhöhung des *Struggling*-Verhaltens ( $t_{16}=2,61$ ;  $p<0,05$ ). In keinem weiteren Parameter hatte die Paroxetinbehandlung einen Effekt auf das Verhalten in den beiden FSTs.



**Abbildung 3.47:** Verhaltensparameter des ersten (obere Reihe) und zweiten (untere Reihe) *Forced Swim Tests* der D20la-Mäuse aus Experiment 2 nach 9,5 Wochen CMS und 5,5 Wochen Paroxetinbehandlung. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=9-11$ . +  $p<0,05$  CMS Par vs. CMS Veh

**b) Einfluss der Paroxetinbehandlung auf physiologische Parameter**Entwicklung des Körpergewichts

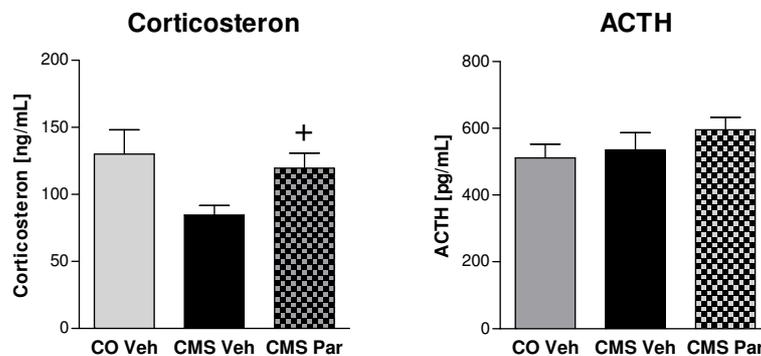
Abbildung 3.48 zeigt die Entwicklung des Körpergewichts der betrachteten Behandlungsgruppen aus Experiment 2. Der Zeitverlauf ist in 3 Segmente unterteilt, wobei nach der ersten Trennlinie jenes Zeitintervall gezeigt ist, in dem für die Tiere der CMS und gleichzeitig die Vehikelbehandlung begann. Nach der zweiten Trennlinie zwischen den Messwerten 7 und 8 begann die Paroxetinbehandlung, deren Effekt im Zeitintervall von Woche 8 bis 14 anhand der mittleren Gewichtszunahme untersucht wurde. In diesem Mittelwert ergab sich kein Effekt der Paroxetinbehandlung. Die in der Grafik erkennbare Verringerung des Körpergewichts der CMS Par-Tiere in den Wochen 9 und 10 wurde mit dieser statistischen Auswertung nicht differenziert erfasst, da die Mäuse in den darauf folgenden Wochen vermehrt an Gewicht zunahmen, im Mittel also keine Veränderung festzustellen war.



**Abbildung 3.48:** Zeitlicher Verlauf des Körpergewichts der betrachteten Behandlungsgruppen aus Experiment 2. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=9-11$ . Die linke Trennlinie bedeutet Stressbeginn, die rechte Trennlinie Behandlungsbeginn mit Paroxetin.

### Corticosteron und ACTH

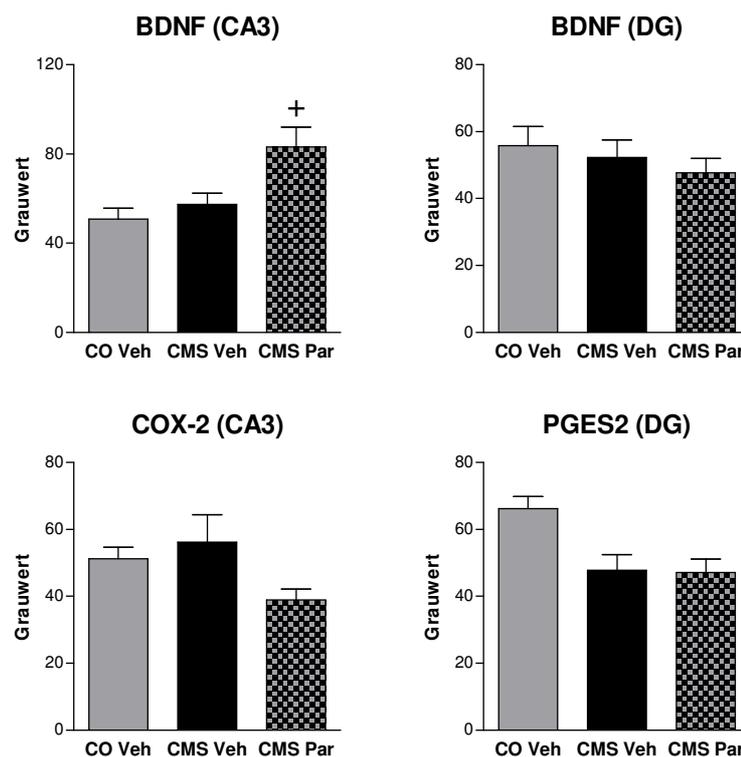
Die in Experiment 2 gewonnenen Plasmahormondaten stammen aus der Analyse des Blutes, das den Tieren unmittelbar nach Beendigung des zweiten FSTs entnommen wurde. Auf S. 79 wurde bereits gezeigt, dass im Vergleich zur CO Veh-Gruppe die CMS-Erfahrung (CMS Veh) den Plasmaspiegel von Corticosteron nach dem zweiten FST verminderte. Die Paroxetinbehandlung im gleichen Experiment erhöhte den Corticosteronspiegel gegenüber CMS Veh-Tieren ( $t_{16}=2,65$ ;  $p<0,05$ ) und brachte ihn somit auf einen zur CO Veh-Versuchsgruppe vergleichbaren Wert. Die Untersuchung des Plasmaspiegels von ACTH ergab keinen Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen, wie folgende Abbildung zeigt.



**Abbildung 3.49:** Plasmahormonwerte von D20la-Mäusen aus Experiment 2 unmittelbar nach dem FST2 nach 9,5 Wochen CMS und 5,5 Wochen Paroxetinbehandlung. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=8-11$ . +  $p<0,05$  CMS Par vs. CMS Veh

Immunohistochemie: Proteinexpression von BDNF, COX-2 und PGES2 im Hippocampus

Die Ergebnisse immunohistochemischer Untersuchungen der in der Depressionsforschung relevanten Strukturen BDNF, COX-2 und PGES2 in den Behandlungsgruppen CO Veh, CMS Veh und CMS Par sind in Abbildung 3.50 gezeigt. Die Proteinexpression von BDNF als neurotrophem Faktor wurde in den Hippocampusregionen *Cornu ammonis 3* (CA3) und *Gyrus dentatus* (DG) untersucht, wobei sich nur in der CA3-Region ein Behandlungseffekt zeigte ( $t_{18}=2,51$ ;  $p<0,05$ ), der eine erhöhte Proteinkonzentration von BDNF durch die Paroxetinbehandlung im Vergleich zu CMS Veh-Mäusen ergab. In der Proteinexpression von COX-2 in der CA3-Region zeigte sich eine tendenzielle Erniedrigung durch die Paroxetingabe ( $t_{18}=1,96$ ;  $p=0,066$ ). PGES2, hier im *Gyrus dentatus* untersucht, wurde durch die Paroxetinbehandlung im Vergleich zu CMS Veh-Tieren in seiner Expression nicht beeinflusst.



**Abbildung 3.50:** Immunohistochemisch untersuchte Proteinexpression von BDNF, COX-2 und PGES2 im Hippocampus der Mäuse aus Experiment 2 nach 9,5 Wochen CMS und 5,5 Wochen Paroxetinbehandlung. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=9-10$ . +  $p<0,05$  im Vergleich CMS Veh vs. CMS Par.

Die Ergebnisse der immunohistochemischen Untersuchungen lassen erkennen, dass die Behandlung mit Paroxetin die Proteinexpression des Wachstumsfaktors BDNF erhöht und die von COX-2 als Syntheseenzym von Prostaglandinen in der CA3-Region des Hippocampus verringert.

### 3.5 Diskussion

Ziel der Untersuchungen in diesem Kapitel war es, verschiedene Mausstämme in ihrem durch die CMS-Prozedur beeinflussten Verhalten und ihrer Physiologie zu charakterisieren, um einerseits die Effektivität des CMS-Protokolls zu untersuchen und andererseits den für die Entwicklung des CMS-Modells in der vorliegenden Arbeit am besten geeigneten Mausstamm zu ermitteln.

Im Rahmen der Modellentwicklung dieser Arbeit war es von Interesse, eine in vivo zu verfolgende und valide Messgröße zu finden, deren Veränderung Auskunft geben kann über einen auftretenden depressionsähnlichen Verhaltensphänotyp in Mäusen. Im Fokus der Betrachtung befand sich dafür die Entwicklung eines anhedonieassoziierten Verhaltens, gemessen anhand des Konsums und der Präferenz von süßen Trinklösungen. In D2Ola-Tieren reduzierte CMS in den ersten 3-4 Wochen nach CMS-Beginn in höchstens der Hälfte der Messpunkte den Saccharinkonsum, die Präferenz unterlag großen Schwankungen und zeigte keinen CMS-Effekt. Ein sehr ähnliches Muster konnte in der verwandten D2Jlco-Zuchtlinie beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Ebenfalls in den ersten 3-4 Wochen nach CMS-Beginn war in BL/6J-Mäusen eine deutliche Reduktion sowohl des Saccharinkonsums als auch der -präferenz durch CMS zu beobachten. Durch Verringerung des Konsums der Kontrolltiere und generell großer Varianz in den Versuchsgruppen hielt dieser Effekt nicht für den Rest der Experimentdauer an. Die wiederholte Untersuchung von BL/6J-Mäusen konnte im gleichen Zeitintervall (1-3 Wochen nach Stressbeginn) einen reduzierten Konsum als CMS-Effekt bestätigen, jedoch keine Unterschiede in der Präferenz zeigen.

Für den in BL/6N-Tieren untersuchten Zuckerkonsum ergab sich keine Reduktion durch CMS, jedoch wurde die Präferenz für die Zuckerlösung ab der 2. Woche nach Stressbeginn durch CMS herabgesetzt, der Wasserkonsum war somit erhöht.

Balb/c-Mäuse reagierten auf CMS mit im Durchschnitt auf die gesamte Experimentdauer gesehen vermindertem Konsum, jedoch war die Varianz des Konsumverhaltens in gestressten und Kontrolltieren groß, so dass sich weder der Konsum zu den einzelnen Messtagen noch die Saccharinpräferenz in CMS-Tieren durch den Einfluss der Stressprozedur unterschieden.

FVB-Mäuse reagierten in den ersten 3 Wochen nach Stressbeginn mit einem verminderten Konsum, zeigten jedoch keinen Einfluss von CMS auf die Saccharinpräferenz.

CMS war in NMRI-Tieren nicht in der Lage, den Saccharinkonsum zu reduzieren, jedoch trat ab der 3. Woche nach Stressbeginn in der Mehrzahl der Messpunkte trotz

großer Varianz in den Versuchsgruppen eine verminderte Präferenz für die Saccharinlösung auf. Das ließ erkennen, dass in gestressten NMRI-Mäusen der Wasserkonsum in diesem Zeitraum erhöht war.

Zusammengenommen ergab sich in BL/6J-, D2Ola- und FVB-Mäusen eine vorübergehende Reduktion des Konsums in den ersten 3-4 Wochen nach Beginn des CMS. Nur in einem Experiment mit BL/6J-Mäusen führte CMS gleichzeitig in diesem Zeitraum zu einer Verringerung der Saccharinpräferenz. Dies bedeutet, dass BL/6J-Mäuse in den ersten 3-4 Wochen nach Stressbeginn ihren Saccharinkonsum zugunsten des Wasserkonsums verschoben, was dem Effekt des klassischen Modells der CMS-induzierten Anhedonie entsprach (Willner, 1997). BL/6J-Mäuse zeigten außerdem schon in den Vorversuchen zur Methodenentwicklung eine Erhöhung des 24h-Konsums, wenn Saccharin anstatt Wasser in einem Einflaschen-Test angeboten wurde. Diese Tiere sind daher als Vertreter eines belohnungssensitiven Stamms einzuordnen (Deacon et al., 2007; Sclafani, 2006) und scheinen am deutlichsten auf einen Anhedonie induzierenden Effekt der CMS-Prozedur anzusprechen. Diese Interpretation wird gestützt durch Befunde von Griffiths et al. und Ducottet et al. (2004; 1992), bei deren Studien der Konsum von wohlschmeckendem Futter durch wiederholten Stress in BL/6J-Tieren vermindert werden konnte. In weiteren CMS-Befunden (Ducottet et al., 2004; Pothion et al., 2004) konnte ebenfalls in BL/6J-Mäusen durch subchronischen und chronischen Stress die Präferenz von der verwendeten Zuckerlösung gesenkt werden. In Kombination mit fehlendem CMS-Einfluss auf das Verhalten von BL/6J-Mäusen in weiteren Verhaltenstests (s.u.) kann die vorliegende Arbeit die Interpretation von Jacobson und Cryan stützen (2007), wonach der reduzierte Konsum einer wohlschmeckenden Flüssigkeit bzw. eines wohlschmeckenden Futters als sensibler Indikator für Stress in BL/6J-Mäusen dienen kann, wohingegen andere Verhaltensparameter in diesem Stamm dazu weniger geeignet sind. Trotzdem bestand sowohl in der vorliegenden Arbeit wie auch in Wiederholungsstudien von Ducottet et al. (2005) die Schwierigkeit, das anhedonische Verhalten von BL/6J-Mäusen zu reproduzieren. Außerdem fällt auf, dass sich auch in anderen Mausstämmen der vorliegenden Arbeit andeutete, ein CMS-Effekt auf das Konsumverhalten könnte nur für etwa 3-4 Wochen anhalten. Dies wurde von der Arbeitsgruppe von Willner et al. (1997) nach dem Umzug ihres Labors ebenfalls beobachtet. Eine vormalig in Ratten funktionierende Generierung eines anhedonischen Verhaltensphänotyps durch CMS gelang in der neuen Umgebung mit derselben Prozedur erst nur noch kurzfristig, später in einigen Fällen gar nicht mehr. Sogar ein in Ratten durch CMS erhöhter Konsum von Zuckerlösung konnte beobachtet werden (Willner, 1997). Als Grund für die schlechte Reproduzierbarkeit wird genannt, dass die Sensitivität CMS gegenüber zwischen den

verwendeten Stämmen variiert (Griffiths et al., 1992; Pucilowski et al., 1993), und sich die Tiere (teilweise) an die CMS-Prozedur nach einigen Wochen gewöhnt haben könnten (Willner, 1997).

Dies kann ebenfalls als Interpretation der in der vorliegenden Arbeit generierten Konsumdaten in den weiteren Mausstämmen dienen. Der nur vorübergehend erniedrigte Konsum von süßer Lösung in D2Ola- und FVB-Mäusen bei gleichzeitig durch CMS unveränderter Präferenz deutete auf eine Verringerung des Gesamtkonsums im 2h-Messintervall hin, die womöglich durch aktivitätsbeeinflussende Effekte der CMS-Prozedur verursacht wurde. Dies ist eine Vermutung, die in Kapitel 4 bei der Untersuchung des Lichtstimulus' als CMS-Komponente weiter verfolgt und durch teilweise erhebliche Schwankungen des Konsums auch in Kontrolltieren (diese wurden im gleichen Tierraum gehalten) gefestigt wurde. Der von Willner und Kollegen in manchen Studien als Hauptindikator für anhedonisches Verhalten benutzte Konsum einer süßen Lösung (Monleon et al., 1995; Willner, 1997) ist gemäß der Einschätzung von Weiss (1997) als alleiniger Wert begrenzt in seiner Aussagefähigkeit, um das Konsumverhalten tatsächlich als anhedonisch werten zu können, da er in Kombination mit der Präferenz interpretiert werden muss (Forbes et al., 1996; Matthews et al., 1995). Dieser Auffassung schließt sich die Interpretation der vorliegenden Konsumdaten an und deutet den reduzierten Konsum von D2Ola- und FVB-Mäusen als eine zwar direkt durch das CMS-Paradigma beeinflussbare Größe – somit als eindeutigen Stresseffekt – in Kombination mit den dazugehörigen Präferenzwerten wird dieser Effekt jedoch nicht als Entwicklung eines anhedonischen Verhaltens in den betrachteten drei Mausstämmen aufgefasst. Er reiht sich vielmehr ein in Ergebnisse von Studien, die ein generell durch Stress vermindertes Konsumverhalten beobachten konnten (Brady et al., 1962; Pare, 1964; Pare, 1965). Forbes et al. (1996) betonen im Rahmen ihrer Kritik an der Verwendung des Zuckerkonsums als alleinigen Index für anhedonisches Verhalten den Einfluss des Körpergewichts der Tiere auf diesen als maßgeblich. Futterdeprivation als Stressor konnte von Forbes et al. (1996) als in Ratten nicht nur nötig sondern auch hinreichend gefunden werden, um sowohl das Körpergewicht der Tiere als auch den Konsum von süßer Lösung zu vermindern. In der vorliegenden Arbeit war dies ein Grund, der gegen die Verwendung von Futterdeprivation im CMS-Protokoll sprach. In der um diese Fehlerquelle bereinigten Messgröße ‚Zuckerkonsum pro Körpergewicht‘ konnte in der Studie mit Ratten jedoch kein CMS-Effekt mehr festgestellt werden (Forbes et al., 1996). CMS-Tiere des D2Ola- und FVB-Stamms der vorliegenden Arbeit zeigten wie von Forbes et al. (1996) gefunden eine verminderte Zunahme des Körpergewichts, die jedoch die gesamte Stressphase über anhielt (Diskussion s.u.) und ohne Futterdeprivation im CMS-

Protokoll entstand. Daher kann die vorübergehende Verminderung des Konsums nicht als in der verminderten Gewichtszunahme der Tiere begründet angesehen werden. Dies wurde bestätigt durch eine fehlende Korrelation des Saccharinkonsums mit dem Körpergewicht der Tiere (Daten nicht gezeigt).

In Balb/c-Tieren erschwert die große Varianz der Konsumdaten eine eindeutige Interpretation. Angesichts einer im untersuchten Zeitraum (3 Wochen CMS) beobachteten generellen Reduktion des Saccharinkonsums bei gleichzeitig unveränderter Präferenz ist ihr durch CMS verändertes Konsumverhalten mit dem der D201a- und FVB-Mäuse vergleichbar, jedoch aufgrund der großen Streuung für die Verfolgung eines CMS-Effekts weniger geeignet als das der anderen drei Stämme. Die Vermutung, Balb/c-Mäuse könnten als Mausstamm mit erhöhter Ängstlichkeit deutlicher einen anhedonieassoziierten Verhaltensphänotyp entwickeln, konnte nicht bestätigt werden.

BL/6N- und NMRI-Mäuse zeigten ab der 2. bzw. 3. Woche nach Stressbeginn bis zum Ende des Experiments eine zu den meisten Messzeitpunkten verminderte Präferenz für die süße Lösung bei durch CMS unbeeinflusstem Konsum. Dies bedeutete einen wenn auch nur tendenziell erhöhten Wasser- und damit ebenfalls erhöhten Gesamtkonsum im 2h-Messzeitraum. Strekalova et al. (2006) deuten in ihrem chronischen Stressmodell, bei dem ebenfalls in gestressten BL/6N-Mäusen ein erhöhter Wasserkonsum beobachtet wurde, diesen als verstärkte Stressantwort der Tiere. Studien in Mensch und Tier über stressinduzierte Polydipsie unterstützen diese Hypothese. So wurde vermutet, verstärkter Durst und dadurch erhöhter Wasserkonsum könnte von einem durch längere Stresserfahrung induzierten Diabetes mellitus (Schoenecker et al., 2000) oder geänderter Neurosekretion des Hypothalamus' und der Hypophyse herrühren (Cole & Koob, 1994; Skuse et al., 1996). Die Überlegungen in dieser Richtung werden bekräftigt durch die verzögerte Entwicklung des erhöhten Wasserkonsums in der vorliegenden Arbeit nach 2-3 Wochen CMS und die Beobachtung im gleichen Mausstamm (BL/6N) wie in der Arbeit von Strekalova et al. Das CMS-induzierte Konsumverhalten in BL/6N- und NMRI-Mäusen ist jedoch mit oder ohne die Entwicklung einer Polydipsie im Vergleich zu den anderen untersuchten Mausstämmen (besonders gegenüber BL/6J-Tieren) aufgrund der großen Varianz (NMRI) und fehlender Verminderung des Konsums der süßen Lösungen (BL/6N und NMRI) für die Modellierung eines anhedonischen Verhaltensphänotyps als ungeeignet einzustufen.

Hinsichtlich des Konsumverhaltens ergab sich somit, dass BL/6J-Mäuse als saccharinsensitive Tiere unter den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mausstämmen am besten geeignet waren zur Entwicklung eines anhedonieassoziierten Verhaltensphänotyps, da die CMS-Prozedur sowohl im Konsum als auch in der Präferenz

eine Verminderung erzielen konnte. Legt man die Verringerung des Konsums süßer Lösungen als hinreichendes Kriterium für ein anhedonieassoziiertes Verhalten fest – wie es in vielen Studien Standard ist (zur Übersicht siehe Willner, 2005) – dann könnte aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit eine bedingte Einsetzbarkeit auch von Mäusen der beiden DBA-Zuchtlinien, des FVB- und Balb/c-Stamms abgeleitet werden. Da jedoch alle beobachteten CMS-Effekte, die sich in Richtung eines anhedonischen Verhaltens hin deuten ließen, nicht von Dauer waren, die Reproduzierbarkeit selbst der BL/6J-Ergebnisse nicht gegeben war, und generell große Schwankungen der Konsumdaten auch in Kontrolltieren auftraten, ist die Aussagekraft dieser Ergebnisse begrenzt. Als alleiniges Readout zur Beurteilung eines durch die CMS-Prozedur verursachten depressionsassoziierten Verhaltensphänotyps sind die mit der in dieser Arbeit entwickelten Messmethode erhobenen Konsumdaten ungeeignet. In Kombination mit anderen Verhaltens- und physiologischen Daten können sie jedoch einen wertvollen Beitrag leisten zur umfassenden Charakterisierung eines (stammabhängigen) Effekts der CMS-Prozedur, der im Konsumverhalten zweifelsfrei festgestellt werden konnte.

Ein ganz anderes Bild eines (stammabhängigen) CMS-Effekts zeichnen die Daten zur Ängstlichkeit, zum Verhalten im FST und zur Exploration und lokomotorischen Aktivität. In D201a-Mäusen führte CMS dazu, dass sich die Tiere vermehrt in angstassoziierten Kompartimenten der Testapparaturen aufhielten und eine erhöhte Exploration zeigten. Die lokomotorische Aktivität war durch CMS (wenn auch nur tendenziell) erhöht. Es zeigte sich im FST kein Hinweis auf einen durch CMS induzierten depressionsbezogenen Verhaltensphänotyp. Ein sehr ähnliches Verhalten bewirkte die CMS-Prozedur auch in D211co-Mäusen, in diesen wurde durch CMS zusätzlich ihr Risikoabschätzungsverhalten vermindert (Daten nicht gezeigt).

In BL/6J-Mäusen konnte in keiner Verhaltensdimension eine Auswirkung von CMS festgestellt werden, BL/6N-Tiere reagierten jedoch empfindlich auf die Stressprozedur. Diese war in diesen Mäusen in der Lage, das Risikoabschätzungsverhalten zu reduzieren, das Explorationsverhalten sowie die lokomotorische Aktivität zu erhöhen, und ähnlich wie in D201a-Mäusen die Aufenthaltsdauer in angstbezogenen Kompartimenten zu verlängern. Im FST zeigte sich kein durch CMS verursachter depressionsassoziiertes Phänotyp in BL/6N-Mäusen.

In den sehr ängstlichen Balb/c-Mäusen konnte aufgrund ihrer hohen Vermeidung des angstbezogenen Kompartiments kein CMS-Effekt gefunden werden. Im FST war CMS in diesen Tieren nicht in der Lage, einen depressionsassoziierten Verhaltensphänotyp zu induzieren.

FVB- und NMRI-Mäuse zeigten im *Open Field Test* eine Tendenz zur Erhöhung der lokomotorischen Aktivität, auf depressionsbezogenes Verhalten hatte CMS in diesen beiden Stämmen keine Auswirkung, lediglich in NMRI-Tieren zeigte sich vermehrtes *Struggling*.

Die als Verringerung der Ängstlichkeit zu interpretierenden Verhaltensveränderungen durch CMS stehen im Gegensatz zu den Befunden vieler CMS-Studien, in denen ein anxiogenes Potential von CMS beobachtet wurde (Willner, 2005). Gesteigerte Ängstlichkeit kann in der Psychiatrie als Begleiterscheinung (Komorbidität) im klinischen Erscheinungsbild der Depression auftreten (Saß & Houben, 1996), unterstreicht daher die Validität solcher CMS-Modelle, die dieses Phänomen im Tier abbilden können. Andere Studien konnten jedoch die scheinbar paradoxe Verminderung der Ängstlichkeit durch chronischen Stress bestätigen (D'Aquila et al., 1994; Sanchez, 1997; Strekalova et al., 2005), deuten dieses Ergebnis als generell von der Qualität der Stressoren abhängig und warnen gleichzeitig vor der Interpretation als anxiolytischem Effekt von chronischem Stress.

In der vorliegenden Arbeit wird der Befund der scheinbar verminderten Ängstlichkeit von CMS-Tieren in Verbindung mit gestörtem Risikoabschätzungsverhalten (vermindertes *Stretching*) und erhöhter lokomotorischer Aktivität interpretiert. FVB- und NMRI-Tiere zeigten eine Tendenz zur lokomotorischen Aktivierung, die sich teilweise in D201a- und besonders in BL/6N-Mäusen als deutlich erwies. Eine damit einhergehende (tendenzielle) Erhöhung des Explorationsverhaltens konnte in diesen Fällen ebenfalls beobachtet werden und wird als Folge der lokomotorischen Aktivierung interpretiert.

Mineur et al. (2006) konnten die paradoxe Hyperaktivität in DBA- und BL/6J-Mäusen beobachten, entweder gepaart mit erhöhter (*Dark/Light Box*) oder unveränderter (EPM) Ängstlichkeit. Die durch CMS gesteigerte Lokomotion wird daher dort nicht als ein angstassoziiertes sondern als depressionsbezogenes Symptom interpretiert, mit Verweis auf das klinische Bild der Depression, in dem sowohl Hyper- als auch Hypoaktivität auftreten kann (Saß & Houben, 1996). Dies kann laut dieser Studie weiterhin bedeuten, dass chronischer Stress in der Maus nicht notwendigerweise Ängstlichkeit nach sich zieht, bzw. die Induktion einer depressionsbezogenen Symptomatik keine Erhöhung der Ängstlichkeit bedingen muss (Mineur et al., 2006). Als praktische Konsequenz ergibt sich aus diesen Überlegungen, dass mehr als ein Test pro Verhaltensdimension durchgeführt werden sollte, bevor eine definitive Schlussfolgerung zum entsprechenden Verhaltensphänotyp gezogen wird (Crawley et al., 1997).

Strekalova et al. (2006) fanden die Hyperaktivität in BL/6N-Mäusen als durch einen unspezifischen chronischen Stresseffekt hervorgerufen und durch hohe

Beleuchtungsintensitäten während der entsprechenden Verhaltenstests ausgelöst. Bei 5lx Lichtstärke oder unter Rotlicht trat in dieser Studie in gestressten Tieren Hypoaktivität auf, wohingegen in der vorliegenden Arbeit selbst bei Rotlicht noch eine in CMS-Tieren erhöhte Lokomotion beobachtet wurde – die Beleuchtungsbedingungen können daher nicht alleiniger Auslöser von CMS-induzierter Hyperreaktivität auf die Testumgebung sein.

Gestörtes Risikoabschätzungsverhalten (vermindertes *Stretching*) kann eine Auswirkung von akutem Stress sein (Quartermain et al., 1996) und wurde – wenn auch nur tendenziell – in fast allen Stämmen der vorliegenden Arbeit beobachtet, die auch lokomotorische Hyperaktivität zeigten. Dass diese gesteigerte Lokomotion als Hyperreaktivität auf eine neue Testumgebung (z.B. EPM, DaLi) in chronisch gestressten Tieren durch Diazepam normalisiert werden konnte, identifiziert sie ebenso wie das oben angeführte Risikoabschätzungsverhalten als gestörte Antwort auf einen akuten Stressor – nämlich den Verhaltenstest (Strekalova et al., 2005). Zusammengefasst lassen sich daher in diesem Sinne die Befunde der Angsttests der vorliegenden Arbeit deuten als Sensibilisierung der D20la-, FVB-, NMRI- und besonders der BL/6N-Mäuse gegenüber einer akuten Stresssituation durch vorangegangenen CMS. In dieses Bild fügt sich die Beobachtung von Strekalova et al. (2006) ein, dass erst eine längere (mindestens 4 Wochen dauernde) chronische Stressprozedur diese Sensibilisierung in Form der Hyperreaktivität auslösen kann.

Die stressinduzierte Hyperaktivität kann möglicherweise andere durch Stress hervorgerufene Verhaltensänderungen vollständig maskieren (Strekalova et al., 2006), was einerseits die klassische Interpretation der Ergebnisse von Angsttests erschwert, andererseits jedoch auch erklären könnte, warum in keinem der durchgeführten FSTs eine depressionsassoziierte Erhöhung der Immobilität (*Floating*) im Gegensatz zu vielen anderen CMS-Studien zu beobachten war (Willner, 2005). Aus der Arbeit von Strekalova et al. (2006) geht nicht eindeutig hervor, wie Hyperaktivität und Beleuchtungsbedingungen sich auf die Dauer des *Floating*-Verhaltens der Tiere im FST auswirken. Jedoch scheint gesichert, dass unspezifische, Hyperreaktivität erzeugende Effekte von chronischem Stress ähnlich wie in Angsttests das Verhalten im FST modulieren können. Ob dadurch eine depressionsassoziierte Erhöhung der Immobilität in den FSTs der vorliegenden Arbeit verschleiert wurde, kann den generierten Daten nicht entnommen werden. Es wird daher davon ausgegangen, dass die verwendete CMS-Standardprozedur nicht in der Lage war, im FST einen depressionsassoziierten Verhaltensphänotyp zu erzeugen.

Die Ergebnisse der Verhaltenstests zeigen, dass der Auswahl der verwendeten Mausstämmen hinsichtlich des Readouts von angst- und depressionsassoziiertem Verhalten eine große Bedeutung zukommt. Die Empfindlichkeit der CMS-Prozedur

gegenüber variiert zwischen den Stämmen und ergibt ein anderes Eignungsprofil der Stämme als bei der Charakterisierung von deren Konsumdaten gefunden wurde. In der vorliegenden Arbeit waren zur Ermittlung eines anhedonieassoziierten Effekts von CMS BL/6J-Mäuse am besten geeignet (vgl. oben), jedoch konnten in diesen keine Auswirkung von CMS auf andere Verhaltensdimensionen erkannt werden. BL/6N-Mäuse hingegen, deren Konsumdaten nicht in Richtung eines anhedonischen Stresseffekts verändert wurden, reagierten auf das CMS-Paradigma am empfindlichsten mit einem differenzierten, wenn auch nicht einfach zu interpretierenden (Angst-)Verhalten. Balb/c-Mäuse als zu ängstlicher Stamm ließen in dieser Hinsicht kein differenziertes Readout zu, können daher basierend auf den erhobenen Verhaltensdaten für diesen Zweck als eher ungeeignet eingestuft werden. D201a-, FVB- und NMRI-Mäuse reagierten auf CMS ebenfalls mit erhöhter Hyperreaktivität in Verhaltenstests, was für die Modellentwicklung und weitere Untersuchungen einen robusten CMS-Effekt bedeutet.

Obwohl in keinem der verwendeten Mausstämmen ein depressionsassoziiertes Verhalten im FST beobachtet werden konnte, so war doch die CMS-Prozedur in Lage, einen robusten (Angst-)Verhaltens-effekt mit deutlichster Ausprägung in BL/6N-Mäusen zu erzeugen. Die Aussagekraft dessen hinsichtlich der Validität des CMS-Paradigmas als Depressionsmodell ist für sich betrachtet zu gering. Falls jedoch die Interpretation des generierten Verhaltensphänotyps in Richtung einer Sensibilisierung auf unbekannte Stressoren zutreffend sein sollte, könnte die CMS-Prozedur Aspekte einer Verhaltensveränderung modellieren, wie sie in der Psychopathologie der Depression im Menschen gefunden wird (Breier, 1989; Burke et al., 2005; Checkley, 1996; Young et al., 2004). Inwieweit diese hinreichend sind, um das Prädikat „Depressionsmodell“ tragen zu dürfen, kann letztendlich nur in Verbindung mit dem Konsumverhalten, den physiologischen Parametern und durch Validierung der Prozedur mittels Antidepressiva-, Stimulantien- und Anxiolytikabehandlung geklärt werden.

Um CMS-Effekte auf physiologischer Ebene zu erfassen, wurden die Stresshormone Corticosteron und ACTH, die Entwicklung des Körpergewichts und in zwei Mausstämmen die mRNA-Expressionen von CRH, GR und MR als Elemente der Stressachse untersucht. D201a-Mäuse zeigten hierbei nach 13 Wochen CMS und dem abschließenden mHb-Test durch CMS verminderte Corticosteron- und ACTH-Spiegel im Blut. Dies konnte in BL/6J-Mäusen im gleichen Experiment nicht beobachtet werden, jedoch zeigte dieser Stamm in Reaktion auf den FST eine verminderte ACTH-Konzentration im Blut. Chronisch mild gestresste Balb/c-Mäuse zeigten im gleichen FST eine verminderte Reaktivität in ihrem Corticosteronplasma-spiegel, ein Effekt, der sich

tendenziell auch im ACTH-Wert niederschlug. CMS hatte keine Auswirkung auf die Corticosteron- und ACTH-Konzentrationen im Blut von BL/6N-Mäusen, die nach dem mHb-Test ermittelt wurden. Unter Basalbedingungen (d.h. während der CMS-Prozedur ohne Einfluss eines akuten Stressors ermittelt) zeigte CMS keinen Einfluss auf die ACTH-Werte von FVB- und NMRI-Tieren, verminderte aber (wenn auch teilweise nur tendenziell) deren Corticosteronspiegel. In BL/6J- und Balb/c-Mäusen war kein Einfluss der vierwöchigen CMS-Behandlung auf den unter Basalbedingungen ermittelten Corticosteronplasmaspiegel zu beobachten.

In D2Ola-, BL/6J-, FVB- und NMRI-Mäusen reduzierte CMS die Zunahme des Körpergewichts. Dieser Effekt konnte in Balb/c- und D2Jlco-Tieren zumindest als Tendenz beobachtet werden. In BL/6N-Mäusen fand sich keine Beeinflussung des Körpergewichts durch CMS.

Auf die mRNA-Expression von CRH, MR und GR im Hippocampus, die in D2Jlco- und BL/6N-Tieren untersucht wurde, hatte CMS keinen Effekt.

Die erhobenen Corticosterondaten zeigten sowohl unter Basalbedingungen (BL/6J, Balb/c, FVB, NMRI) als auch in Reaktion auf einen Verhaltenstest (D2Ola, BL/6J, Balb/c) keine in CMS- gegenüber Kontrolltieren erhöhten Plasmakonzentrationen und damit keine durch CMS verstärkte HPA-Achsen-Aktivität an, wie sie in vielen Studien für chronischen (milden) Stress gefunden wurde (Konkle et al., 2003; Li et al., 2007a; Willner, 2005) und dem klassischen physiologischen Effekt von chronischem Stress entspricht. Nach 4 Wochen CMS waren Corticosteron- und ACTH-Spiegel in BL/6J- und Balb/c-Mäusen zumindest tendenziell nach dem FST gegenüber Kontrolltieren erniedrigt, die Stresshormonantwort auf diese Testsituation wurde durch CMS daher abgeschwächt. Ähnlich reagierten D2Ola- im Vergleich zu Kontrollmäusen nach insgesamt 13 Wochen CMS mit reduzierten Corticosteron- und ACTH-Spiegeln auf den mHb-Test. 15 Wochen lang chronisch mild gestresste NMRI-Tiere zeigten sogar erniedrigte basale Corticosteronwerte, FVB-Mäuse tendenziell ebenfalls. Zusammengefasst zeichnen diese Befunde ein Bild eines CMS-Effekts auf Stresshormone der Mäuse, wie es in der Klinik der atypischen Depression und weiteren chronischen Stresserkrankungen im Menschen beobachtet werden kann (Fries et al., 2005). Nach längerer Stresserfahrung wie z.B. lang anhaltender hoher Arbeitsbelastung, nach Infektionen oder sozialem Stress – einhergehend mit Hypercortisolismus und HPA-Achsen-Hyperaktivität, wie für chronischen Stress beschrieben, vgl. oben – kann sich im Mensch eine verminderte Aktivität der HPA-Achse einstellen, die von einem erniedrigten Cortisolspiegel und Symptomen wie Abgeschlagenheit, Schmerzen und erhöhter Stresssensitivität begleitet wird (Buskila et al., 1998; Fries et al., 2005; Hellhammer & Wade, 1993; Van & Egle,

2004). Anhand eines chronischen Stressmodells in Ratten, basierend auf Morphinentzug, konnte dieser Wechsel von Hyper- zu Hypoaktivität der HPA-Achse nach insgesamt 3 Wochen Stress auf hormonaler Ebene verfolgt werden, sowohl unter Basalbedingungen als auch in Reaktion auf *Restraint Stress* (Fries et al., 2005; Houshyar et al., 2001b; Houshyar et al., 2001a; Houshyar et al., 2003). Neuroendokrinologisch wird eine erhöhte Sensitivität der negativen Rückkopplung auf zirkulierendes Corticosteron für die entstandene HPA-Achsen-Hypoaktivität verantwortlich gemacht und konnte durch den Einsatz eines Dexamethasontests auf Ebene der Hypophyse lokalisiert werden (Houshyar et al., 2001b). Diese Befunde könnten in Einklang mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit stehen. Während nach 4 Wochen CMS kein Unterschied in basalen Corticosteronspiegeln feststellbar war (BL/6J, Balb/c), wohl aber bereits eine abgeschwächte Corticosteron- und ACTH-Antwort auf den FST, zeigte sich nach längerer CMS-Anwendung weiterhin eine verminderte Corticosteron- und ACTH-Reaktion auf einen neuen Stressor (D2O1a im mHb) und eine Reduktion der basalen Corticosteronkonzentration (FVB, NMRI). Ob in der vorliegenden Arbeit zum jeweiligen Beginn der CMS-Prozedur eine HPA-Achsen-Hyperaktivität mit entsprechendem Stresshormonprofil generiert wurde, kann aus den erhobenen Daten kaum abgeleitet werden. Als einziger diesbezüglich erhobener Datenpunkt war der in Experiment 2 (Untersuchungen zur Paroxetinbehandlung) nach 3 Wochen CMS gemessene Basalwert für Corticosteron in CMS Veh-Tieren tendenziell erhöht, was die oben beschriebenen Vermutungen stützt. Die Symptomatik des Hypocortisolismus und die zugrundeliegende HPA-Achsen-Adaption tritt in verschiedenen Stresserkrankungen im Menschen nicht in allen Patienten sondern nur in Subgruppen auf (Heim et al., 2000). Dies mag erklären, warum diese Phänomene in BL/6N-Mäusen nicht beobachtet werden konnten. (Die Reaktivität dieses Stamms und der von D2Jlco-Mäusen auf akute starke Stressoren und Verhaltenstests wird in Kapitel 5 weiter behandelt).

Die HPA-Achse spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Sympathikustonus' (Fries et al., 2005). Endogene Glucocorticoide können diesen während einer Stresserfahrung durch Kontrolle des Katecholaminsatzes, der -synthese und -freisetzung beschränken (Kvetnansky et al., 1993; Pacak et al., 1993). Studien in Ratten konnten zeigen, dass zirkulierende Glucocorticoide einen hemmenden Einfluss auf die CRH-Ausschüttung im *Locus coeruleus* (LC) haben (Pavcovich & Valentino, 1997). Der *Locus coeruleus* ist eine stark noradrenerg innervierte Struktur im Rhombencephalon, die für ein breites Spektrum autonomer Erregung zuständig ist, und deren Aktivität durch CRH beeinflusst wird (Berridge & Waterhouse, 2003; Koob, 1999). Falls nun eine lange CMS-Erfahrung eine gedämpfte Corticosteronantwort auf einen Verhaltenstest als

stressvolle Situation zur Folge hat (s.o.), könnte eine dadurch enthemmte Ausschüttung von CRH im LC zu jener Verhaltensaktivierung führen, wie sie sich in Form gestörten Risikoabschätzungsverhaltens und erhöhter lokomotorischer Aktivität in vielen Verhaltenstests der vorliegenden Arbeit zeigte. Interessant ist hierbei, dass die CRH-abhängige Erregung des LC einen Angriffspunkt für Antidepressivabehandlung darstellt (Curtis & Valentino, 1994; Valentino et al., 1990; Valentino & Curtis, 1991).

Die in den erwähnten Mausstämmen beobachtete Adaption der HPA-Achsen-Aktivität und der Stresshormonausschüttung an die CMS-Prozedur und in Reaktion auf Verhaltenstests kann somit gedeutet werden als Reduktion von schädlichen Effekten, wie sie von einer ständig erhöhten Glucocorticoidkonzentration ausgingen – zum Preis erhöhter Reaktivität auf Stressoren, wie sie in Form von Hyperaktivität beobachtet werden konnte (Fries et al., 2005). Dass die Veränderungen durch CMS auf Ebene der Stresshormone nicht die alleinige Ursache sein konnten für den beobachteten Verhaltensphänotyp, zeigen die Daten der BL/6N-Mäuse. Als weiterer Erklärungsansatz könnten die Ergebnisse der Studie von Cancela et al. dienen, die einen durch das Opiatsystem vermittelten scheinbar anxiolytischen Effekt von chronischem Stress in Form von Hyperaktivität zeigen (Cancela et al., 1995). Die pharmakologische Vorbehandlung mit einem Opiatantagonisten (Naloxon) konnte die Entwicklung einer – wie sie dort gedeutet wird – stressinduzierten Unterdrückung der Verhaltensinhibition verhindern.

In D2Ola-, BL/6J-, FVB- und NMRI-Mäusen reduzierte CMS die Zunahme des Körpergewichts, was einem sehr robusten Effekt von chronischem Stress entspricht (Bielajew et al., 2002; D'Aquila et al., 1997; Ducottet et al., 2003; Konkle et al., 2003; Pothion et al., 2004; Strekalova et al., 2004). Dieser Effekt konnte in Balb/c-Tieren zumindest als Tendenz beobachtet werden, in BL/6N-Mäusen fand sich keine Beeinflussung des Körpergewichts durch CMS. Harris et al. (2002) fanden in Ratten, dass bereits 3 Tage *Restraint Stress* (3h pro Tag) ausreichend sind, um den Futterkonsum und die Zunahme des Körpergewichts langfristig zu reduzieren. Gemäß dieser Studie konnte die Fortführung des Stressprotokolls um weitere 10 Tage keinen zusätzlichen Effekt auf das Körpergewicht der Tiere erzielen. Während der ersten drei Tage zeigte sich eine Erhöhung der mRNA von CRH-verwandten Proteinen als deutliche Stressreaktion im Hirn, die 40 Tage nach Ende der kurzen Stressperiode abgeklungen war. Der Einfluss des 3tägigen Stresses auf das Körpergewicht war jedoch bis zu 80 Tage (!) nach Stressende zu beobachten. Von Harris et al. (2002) wird unter Einbeziehung weiterer Ergebnisse der Studie gefolgert, dass wiederholter akuter Stress eine chronische Veränderung der Körpergewichtsentwicklung bewirkt, die unanhängig von einer

stressinduzierten Verminderung der Futteraufnahme ist und eine allgemeine Veränderung der Homöostase repräsentiert, die durch wiederholte akute Aktivierung des zentralen CRH-Systems initiiert werden könnte. Dies könnte für die Interpretation der physiologischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit insofern relevant sein, als dass bereits die Befunde des Konsumverhaltens sowie der Stresshormondaten nahelegten, ein chronischer Stresseffekt, wie ihn die CMS-Literatur in den meisten Fällen beschreibt (HPA-Achsen-Aktivierung, Verminderung von Konsum und Präferenz, Erhöhung von Ängstlichkeit etc.), könnte sich nur in einer kurzen Zeitspanne von bis zu etwa 4 Wochen nach Stressbeginn zeigen – um sich später durch Adaption der HPA-Achse zu verlieren oder gar in gegenteilige Ergebnisse (z.B. Hyperlokomotion) zu wandeln. Der Einfluss der ersten Stresserfahrung – in der ersten Woche CMS ist jeder Stressor für die Tiere unbekannt, eine sehr schnelle Gewöhnung an die Prozedur in dieser Phase daher unwahrscheinlich – könnte jedoch in Anlehnung an die Befunde von Harris et al. hinsichtlich der Entwicklung des Körpergewichts bereits den entscheidenden Ausschlag geben, dessen Auswirkung noch lange Zeit zu beobachten sein kann, sich durch wiederholte gleichförmige Stresserfahrung nicht verstärkt und selbst bei Beendigung der Prozedur noch längere Zeit nachwirken dürfte (dies wird in Kapitel 5 weiter untersucht). Somit wäre erklärbar, warum in der vorliegenden Arbeit die Verminderung des Körpergewichts der einzige Parameter ist, der vollständig in Einklang mit den Resultaten der meisten (kürzeren!) CMS-Experimente der Literatur steht. Der Befund, dass in BL/6N-Mäusen sich kein CMS-Effekt in der Entwicklung des Körpergewichts zeigte, kann in diesen Erklärungsansatz nicht ohne weitere Untersuchungen eingeordnet werden und kann nur gedeutet werden als stammspezifisches Phänomen, was erneut die Bedeutung der Wahl des Mausstammes für das Readout der CMS-Prozedur unterstreicht.

Die wie postuliert höchstens vorübergehend stattgefundenene HPA-Achsen-Aktivierung mag weiterhin der Grund gewesen sein für das Fehlen jeglicher Effekte von CMS auf HPA-Achsen-relevante Strukturen im Hippocampus und Hypothalamus wie CRH, MR und GR, die erst nach 8 bzw. 15 Wochen CMS ermittelt wurden. Für eine auftretende HPA-Achsen-Hypoaktivität konnte die zu Grunde liegende erhöhte Sensitivität auf Corticosteron auf Ebene der Hypophyse lokalisiert werden (Houshyar et al., 2001b) – die negative Rückkopplung findet somit hauptsächlich zwischen Nebennierenrinde und Hypophyse statt. Dies könnte erklären, warum Strukturen, die in der Stressachse vom Zielorgan Nebenniere weiter entfernt liegen als die Hypophyse (d.h. Hippocampus und Hypothalamus), keine messbaren Unterschiede in der mRNA-Expression von CRH, MR und GR von CMS- und Kontrolltieren aufwiesen. Eventuell wurden diese Ergebnisse aber

auch durch Beschränkungen der Methode bedingt, wie es in Kapitel 5 zur akuten Stresswirkung im Kontext von CMS erörtert wird.

Bereits nach Beendigung des ersten Experiments der vorliegenden Arbeit war von Interesse, wie sich auf die zunächst als unerwartet und paradox befundenen Ergebnisse der CMS-Prozedur (u.a. verminderte Corticosteronantwort auf den mHb-Test) eine Behandlung mit einem Antidepressivum auswirken würde. Da in der Arbeitsgruppe die im ersten Experiment verwendeten D201a-Mäuse als sensitiv in ihrem Verhalten auf CMS beobachtet werden konnten (BL/6N-Tiere wurden erst später untersucht), außerdem zu diesem Mausstamm ein größerer Satz interner Vergleichsdaten auch in Bezug auf Paroxetinbehandlung zur Verfügung stand als zu anderen Stämmen, wurde das nachfolgende Experiment mit Paroxetin als Antidepressivum und mit D201a-Mäusen durchgeführt. Das Versuchsdesign machte das Mitführen einer mit Vehikellösung behandelten Kontrollgruppe nötig, die *per se* in einigen Aspekten einen Verhaltensphänotyp zeigte, wie man ihn von einem Tiermodell für Depression erwarten würde. Daher werden zuerst deren Ergebnisse diskutiert.

Die Vehikelbehandlung zeigte nach 2-4 Wochen eine Verringerung des Konsums an Saccharinlösung, die in Kombination mit CMS noch weiter vermindert wurde und jeweils bis zum Ende des Experiments anhielt. Im gleichen Zeitraum fand auch eine Verminderung der Saccharinpräferenz durch die Vehikelbehandlung statt, die durch CMS nicht verstärkt werden konnte. Die gleichzeitige Reduktion der Präferenz schließt eine Beeinflussung der Konsumdaten durch die forcierte Flüssigkeitsaufnahme an Vehikellösung kurz vor den 2stündigen Messintervallen aus. Denkbar ist an dieser Stelle, dass die intragastrale Verabreichung von Leitungswasser gegen Ende der Lichtphase *per se* bereits den Konsum im darauf folgenden 2stündigen Messintervall herabsetzen könnte (Völlegfühl im Magen). Die langsame Entwicklung des Applikationseffekts über mehrere Wochen in Konsum und Präferenz spricht jedoch gegen eine systematisch fehlerbehaftete Beeinflussung des Konsumverhaltens. In den Verhaltenstests konnte keine signifikante Erhöhung der Ängstlichkeit oder depressionsassoziiertes Verhalten festgestellt werden, jedoch führte die Vehikelbehandlung im Gegensatz zum CMS-Protokoll zu einer verminderten lokomotorischen Aktivität im OF. Zusammengefasst mit einem tendenziell erhöhten basalen Corticosteronspiegel nach 4 Wochen Behandlung, einer dauerhaft reduzierten Zunahme des Körpergewichts und einer erhöhten Corticosteronantwort auf den finalen FST nach 9 Wochen Experimentdauer zeichnet diese Art der Applikation ein Bild eines Phänotyps im Konsumverhalten und in physiologischer Hinsicht, wie es von einem Tiermodell für Depression erwartet würde.

Dieser Ansatzpunkt wird außerhalb des Rahmens der vorliegenden Arbeit weiter untersucht. Hinsichtlich der molekularbiologisch untersuchten Strukturen zeigte sich durch die kombinierte CMS-Vehikelbehandlung eine reduzierte Expression von PGE2-Synthase, einer Isomerase, die Prostaglandin E2 synthetisiert. Deren durch Stress vermindertes Vorkommen und die damit verbundene Reduktion der PGE2-Konzentration in Synapsen des *Gyrus dentatus* könnte zu einer verminderten Langzeit-Potenzierung führen (Chen et al., 2002). Dies wäre weiterhin interpretierbar als eine Verminderung der neuronalen Plastizität durch die CMS Veh-Behandlung, die somit einen Effekt auf molekularer Ebene haben könnte, wie er in kognitiv beeinträchtigten Depressionspatienten gefunden wurde (Fuchs et al., 2004).

Paroxetin konnte das durch 3wöchige CMS-Erfahrung reduzierte Konsumverhalten nicht wieder auf Niveau der Kontrollgruppe (CO Veh) anheben und normalisieren. Vielmehr wurden Konsum und Präferenz noch weiter gesenkt, was einem verstärkt anhedonieassoziierten Verhaltensphänotyp entsprach. Dies könnte einerseits durch die Art der Applikation erklärbar sein. Paroxetin als sehr bittere Substanz hätte bei oraler Applikation nachhaltig in Kombination mit der Saccharinlösung deren Geschmack verändern und somit den Konsum vermindern können. So kann gefolgert werden, dass die Applikationsmethode in Verbindung mit Konsummessungen nicht optimal gewählt wurde, eine parenterale Verabreichung hätte diese Fehlerquelle ausschließen können. Andererseits fanden Shen et al. (1999) ebenfalls einen pro-anhedonischen Effekt von Paroxetin auf den Konsum und die Präferenz von Saccharinlösung, was oben genannte Befunde als nicht (nur) methodisch bedingt erscheinen lässt. Wiederholt kann daher gefolgert werden, dass die alleinige Verwendung des Konsumverhaltens als Index für depressionsassoziiertes Verhalten problematisch ist.

Im FST zeigte die Paroxetinbehandlung aufgrund großer Streuung der Versuchsgruppen keinen Effekt, in den 5minütigen Angsttests konnte die durch CMS verursachte Hyperreaktivität durch chronische Paroxetingabe nicht beseitigt werden. Im OF jedoch, das eine genauere Betrachtung der lokomotorischen Aktivität über 30 Minuten hinweg erlaubte, wurde nach etwa 10 Minuten eine bis zum Testende vollständige Normalisierung der durch CMS hervorgerufenen Hyperaktivität beobachtet. Der Befund für die ersten 10 Minuten steht damit in Einklang mit Ergebnissen der Studie von Brocco et al. (2002), die durch Paroxetin eine Erhöhung der lokomotorischen Aktivität in neuer Umgebung für etwa 10 Minuten feststellen konnten. Dies könnte die im Vergleich zur CMS Veh-Gruppe unverändert hohe lokomotorische Aktivität in den 5minütigen Angsttests erklären. Paroxetinbehandlung führte des Weiteren zu einer Erhöhung von

BDNF in der CA3-Region des Hippocampus, was durch erhöhte Konzentration eines Wachstumsfaktors einer stressinduzierten Atrophie der Hippocampus entgegenwirken kann, somit ein molekularbiologisches Korrelat einer antidepressiven Wirkung darstellt (Govindarajan et al., 2006). Die durch Paroxetinbehandlung in der CA3-Region tendenziell verminderte Proteinexpression von COX-2 kann als Verringerung einer neurodegenerativer Wirkung von COX-2 und daher als weiterer Schutz vor einer stressinduzierten hippocampalen Atrophie gedeutet werden (Fujimi et al., 2007).

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Normalisierung der CMS-induzierten Hyperaktivität im OF durch Paroxetin in Zusammenhang mit einer wiederhergestellten Reaktivität der Corticosteronantwort auf den FST lässt den Schluss zu, dass wesentliche in dieser Arbeit beobachteten CMS-Effekte durch ein Antidepressivum wieder normalisiert werden konnten. Andere durch Paroxetin als Antidepressivum beeinflusste Parameter, wie das Konsumverhalten und Erhöhung der Reaktivität in (5minütigen) Angsttests, ermahnen zu vorsichtiger und differenzierter Interpretation der Ergebnisse und unterstreichen erneut die Bedeutung eines möglichst umfassenden Readouts für die Beurteilung von CMS-Modellen. Die molekularbiologischen Daten zeigen mögliche stressprotektive Effekte der Paroxetinbehandlung.

Die diskutierten Aspekte zur Anwendung der CMS-Prozedur in verschiedenen Mausstämmen sollen abschließend hinsichtlich ihrer für die Modellentwicklung praktischen Bedeutung zusammengefasst werden.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass für die Untersuchung jeder einzelnen Verhaltensdimension unter den verwendeten Mausstämmen jeweils ein am besten geeigneter Stamm gefunden wurde. Dies verdeutlicht, dass bei der Verwendung nur eines Stammes in einem komplexen CMS-Modell die Gefahr groß sein kann, dass sich CMS-Effekte auf bestimmte Verhaltensdimensionen zu undifferenziert oder gar nicht zeigen, was die Interpretation der Ergebnisse erschweren oder fehlleiten kann. Bei längerer Applikation eines wöchentlich sich wiederholenden CMS-Protokolls ist weiterhin zu beachten, dass eine (HPA-Achsen-)Adaption der Tiere an die Prozedur erfolgen kann mit großer Bedeutung für Verhaltens- und für physiologische Parameter (Konsumverhalten, Angstphänotyp, lokomotorische Aktivität, Stresshormonantwort). Um dieser Adaption vorzubeugen, bestehen im Wesentlichen zwei Ansätze: zum einen Optimierung des Protokolls (z.B. stärkere und/oder stets unbekannte Stressoren, Randomisierung), zum anderen Verkürzung der Experimentdauer auf 3-6 Wochen. Beide Ansätze stellen vorläufige Einschätzungen dar und bedürfen umfangreicher weiterer Untersuchungen – die sich stets orientieren sollten an einer in der Depressionspathologie auftretenden

persistierenden Maladaptation an stressvolle Lebensumstände, die häufig Auslöser ist für die klinische Manifestation des Krankheitsbildes. Da die intra- und interindividuelle Varianz der Mäuse in den erfassten Parametern immens sein kann (aufgrund der Fülle der relevanten genetischen Faktoren, Umwelteinflüssen und deren Interaktion), legen die Ergebnisse der Charakterisierung der Mausstämme nahe, mehrere Verhaltenstests pro -dimension zu verwenden, um Missinterpretation vorzubeugen. Die entwickelte Methode zur Ermittlung des Konsumverhaltens ergab mit 2-3 Messungen pro Woche ein differenziertes, wenn auch aufgrund des kurzen Messzeitraumes von 2h möglicherweise störanfälliges Readout. Möglichen Ursachen für die große Varianz der Konsumdaten wird in Kapitel 4 (Veränderungen des Lichtrhythmus' als Komponente im CMS-Protokoll) nachgegangen. Die pharmakologische Validierung eines Stressprotokolls als mögliches CMS-Modell kann, wie gezeigt wurde, durch die Wahl der Applikationsart und somit durch die Umstände der Vehikelbehandlung *per se* entscheidend beeinflusst werden. Die Effekte des Antidepressivums Paroxetin konnten nur in einigen Parametern für Normalisierung eines CMS-induzierten Phänotyps sorgen, im Hauptparameter Konsumverhalten jedoch nicht. Die schlechte Reproduzierbarkeit des CMS-induzierten Konsumverhaltensphänotyps selbst in BL/6J-Mäusen im gleichen Labor begrenzt weiterhin die Aussagekraft der Konsumdaten bzw. des Paradigmas.

Nichtsdestotrotz ergab die Charakterisierung verschiedener Mausstämme wertvolle Hinweise auf deren Besonderheiten im Rahmen der Modellentwicklung, konnte Stärken und Schwächen des angewandten CMS-Protokolls aufzeigen und somit richtungsweisend sein für weitere spezielle Untersuchungen der vorliegenden Arbeit hinsichtlich besonderer Betrachtung von Veränderungen des Lichtrhythmus' als CMS-Komponente (Kapitel 4) und Untersuchungen zu zeitlichen Aspekten und akutem Stress im Kontext von CMS (Kapitel 5). Anhand dieser weiterführenden Untersuchungen soll abschließend eine Gesamtbeurteilung mit Ausblick erfolgen zur Tauglichkeit der vorgestellten CMS-Prozedur zur Entwicklung eines Depressionsmodells.

## 4 Veränderungen des Lichtrhythmus' als CMS-Komponente

### 4.1 Einleitung

Bereits während der ersten Experimente dieser Arbeit und der Auswertung deren Konsumdaten ergaben sich Anhaltspunkte, nach denen die erhaltenen Messwerte durch zeitnah vorangegangene (Stress-)Ereignisse in der CMS-Prozedur beeinflusst werden könnten. Eine Veränderung des Saccharinkonsums wurde vorrangig nach dem Stressor „Lichtwechsel“ beobachtet. Diese Beobachtung war Grundlage für die Annahme, dass Störungen der circadianen Rhythmik zur Änderung der Aktivität der Tiere führt (Benstaali et al., 2001), welche in engem Zusammenhang mit dem Konsumverhalten stehen könnte.

Auch Stressoren von anderer Qualität, so z.B. akuter sozialer Stress, sind in der Lage, physiologische Parameter wie Körpergewicht oder lokomotorische Aktivität in ihrem zeitlichen Verlauf lang anhaltend zu beeinflussen (Meerlo et al., 1999). Chronisch milder Stress als gesamte Prozedur führt ebenfalls nachhaltig zu Störungen der circadianen Rhythmik (Gorka et al., 1996), deren bedeutendster Taktgeber der Licht-Dunkel-Rhythmus ist (Benstaali et al., 2001). Der innerhalb der CMS-Prozedur angewandte „Lichtwechsel“ beinhaltet die Eigenschaften des photischen Stimulus' und Stressors und legte die Untersuchung des Einflusses von Lichtstress auf Aktivitätsveränderungen und möglicherweise damit verbundene Fluktuationen des Konsumverhaltens nahe. Die Relevanz der Untersuchungen von Tag-Nacht-Rhythmusstörungen für den Menschen zeigt sich in Problemen, die z.B. Schichtarbeit mit sich bringt, in Form von Verminderung der Gesamtschlafdauer und erhöhter Tendenz für depressive Verstimmungen (Choobineh et al., 2006; Kaneko et al., 2004; Ribeiro-Silva et al., 2006).

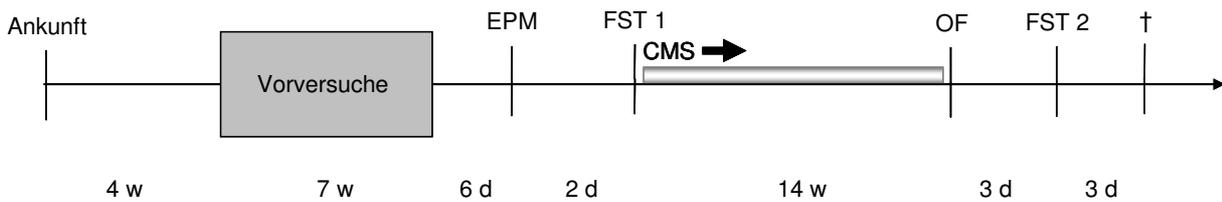
Licht als zeitgebender Reiz für eine Vielzahl rhythmischer physiologischer Prozesse wird im Hirn von Säugetieren im suprachiasmatischen Kern (SCN) des Hypothalamus prozessiert (Maywood et al., 2007). Dort sorgt ein fein aufeinander abgestimmtes Zusammenspiel der Aktivität der *Clock*-Gene für die rhythmische Steuerung von Funktionen wie der Ausschüttung von Hormonen und der Regulation von Körpertemperatur und Herz-Kreislauf-Parametern (Hastings et al., 2007). Als besonders eng mit der Regulation durch den Licht-Dunkel-Zyklus verbunden zeigte sich *Per1*, ein Gen aus der *Period*-Unterfamilie (Albrecht et al., 1997). Dessen Aktivität im SCN erreicht in Mäusen ihren Höhepunkt 6h nach Beginn der Lichtphase und ihren tiefsten Wert in der Mitte der Nacht (Takahashi et al., 2001). Im PVN, einer Komponente der HPA-Achse, ist *Per1* ebenfalls exprimiert, wobei dort die Genaktivität gegen Beginn der Dunkelphase ihr Maximum erreicht. Die *Per1*-mRNA-Expression in diesen beiden Hirnregionen gibt

Hinweise darauf, wie die lokomotorische Aktivität der Tiere (u.a. durch Lichtreize) zu verschiedenen Tageszeiten zentralnervös gesteuert wird, und – im Zusammenhang mit vorliegender Arbeit von besonderem Interesse – wie physischer Stress zusätzlich die Genaktivität von Per1 im PVN der Tiere erhöhen kann (Takahashi et al., 2001).

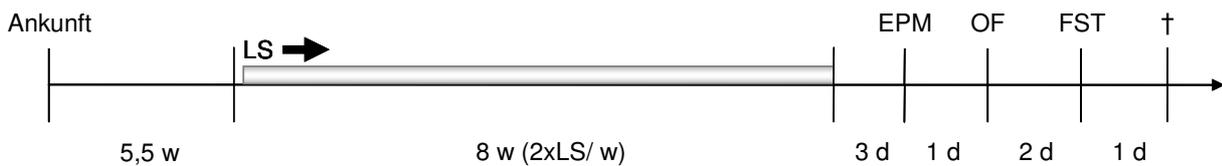
So sollte in diesem Kapitel erörtert werden, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen Veränderungen des Lichtrhythmus' und dem Konsumverhalten der Tiere besteht. Zum einen wurde dazu (A) der Lichtstimulus aus dem sonst unveränderten CMS-Paradigma gestrichen und untersucht, ob dies auch auf lange Sicht auf Stresshormone oder das Körpergewicht der Tiere einen Einfluss hat. Zum anderen sollte (B) erörtert werden, welchen Effekt der Lichtstress als alleiniger, wiederholt angewandter Stressor auf das Konsumverhalten, die Aktivität im Heimkäfig, den Verhaltensphänotyp in Angsttests und auf physiologische Parameter der Tiere hat. Molekularbiologische Untersuchungen von Per1 in PVN und SCN sollten weiter Aufschluss geben, welche Qualität Lichtstress als Stressor (u.a. im Vergleich zu *Social Interaction*) und welche als aktivitätsverändernder Stimulus hat (Takahashi et al., 2001).

## 4.2 Versuchsdurchführung

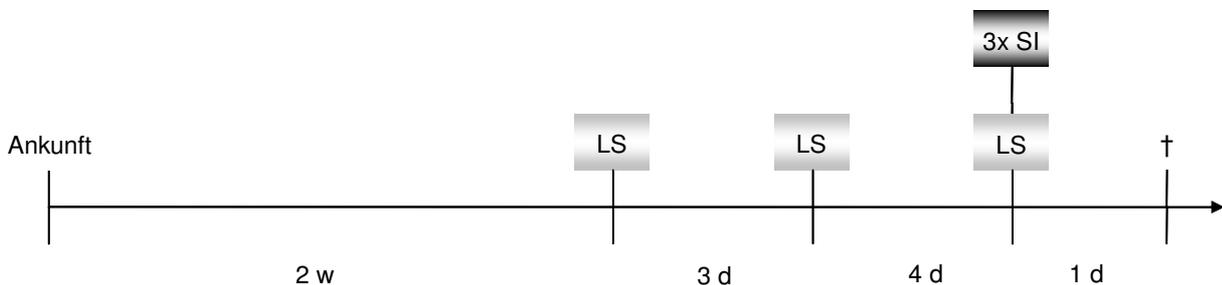
Die in diesem Kapitel behandelten Daten entstammen den Experimenten 4, 7 und 8. Entsprechend der Fragestellung (A) wurde in Experiment 4 eine zusätzliche CMS-Versuchsgruppe mitgeführt, die abweichend von der CMS-Standardprozedur keinem Lichtstress ausgesetzt wurde („CMS ohne LS“). Die systematische Untersuchung der Frage (B), inwieweit Störungen des Lichtrhythmus alleine (1) das Konsumverhalten im Messzeitraum, (2) kurzfristig die lokomotorischen Aktivität und (3) langfristig die Ängstlichkeit sowie depressionsbezogenes Verhalten der Tiere beeinflussen, wurde mit BL/6J-Mäusen durchgeführt und durch molekularbiologische Untersuchungen zur mRNA-Expression von Per1 ergänzt.

**Experiment 4**

**Abbildung 4.1:** Experiment 4 wurde mit je 24 FVB- und NMRI-Mäusen durchgeführt, die in Gruppen von 8 zu Beginn der CMS-Phase eingeteilt wurden: jeder Mausstamm in eine Gruppe, die der CMS-Standard-Prozedur folgte, in eine zweite Gruppe, die ebenfalls dem CMS-Protokoll folgte, bei der aber der Lichtstress weggelassen wurde, und in eine ungestresste Kontrollgruppe. Alle Verhaltensversuche fanden zu Beginn der Dunkelphase unter Rotlichtbedingungen statt. Der CMS endete einen Tag vor dem OF-Test.

**Experiment 7**

**Abbildung 4.2:** Experiment 7 wurde mit 76 BL/6J-Mäusen durchgeführt, die nach 5,5 Wochen (wiederum basierend auf ihrem basalen Flüssigkeitskonsum) in zwei Gruppen eingeteilt wurden: in 40 Tiere, die dem Lichtstress (LS) wie in Kap. 2.4.1 beschrieben ausgesetzt wurden, und in 36 Kontrolltiere, die ungestresst mit ungestörtem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten wurden.

**Experiment 8**

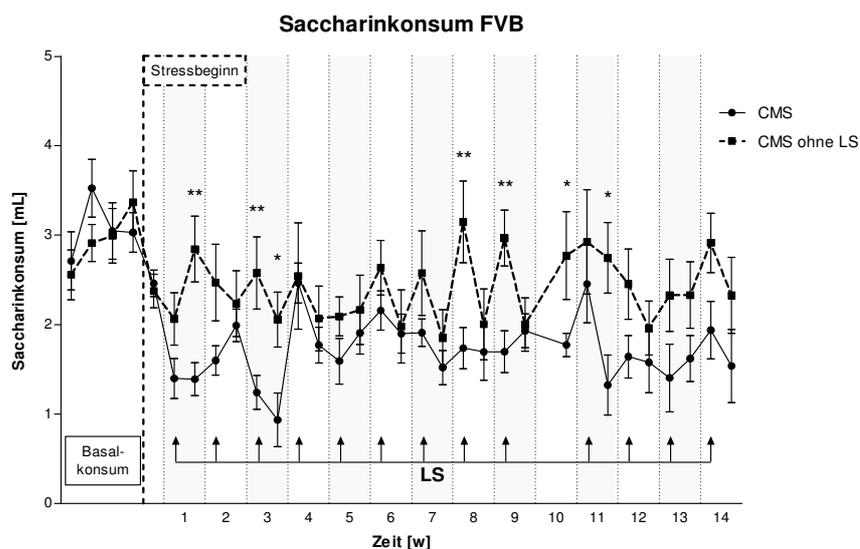
**Abbildung 4.3:** Experiment 8 wurde mit insgesamt 30 BL/6J-Mäusen durchgeführt, die nach der zweiwöchigen Habituationsphase in 3 Gruppen zu je 10 Tieren eingeteilt wurden: eine Versuchsgruppe erhielt in einer Woche insgesamt 3x den Lichtstimulus (LS) über Nacht (siehe Abbildung), eine weitere Versuchsgruppe wurde einen Tag vor dem Experimentende 3x der *Social Interaction*-Prozedur (SI) unterworfen, und die restlichen 10 Tiere dienten als ungestresste Kontrolle. Jeweils die Hälfte der Versuchsgruppen (5 Tiere) wurde in der Licht- bzw. in der Dunkelphase (mit 6h zeitlichem Abstand) getötet und die Per1-Expression im SCN untersucht.

### 4.3 Ergebnisse

#### 4.3.1 Konsumverhalten

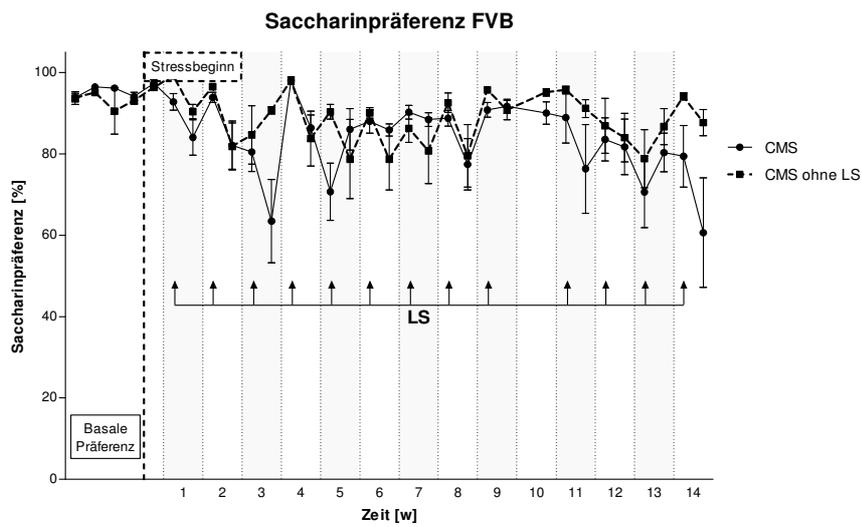
##### CMS ohne LS

Die Konsumdaten aus Experiment 4, in denen die zwei CMS-Gruppen mit und ohne Lichtstress miteinander verglichen wurden, sind in den folgenden Abbildungen dargestellt. Die statistische Analyse mittels ANOVA mit Messwiederholungen ergab hierbei für den Saccharinkonsum der FVB-Tiere (Abbildung 4.4) einen signifikanten Interaktionseffekt der Faktoren Versuchsgruppe x Zeit ( $F_{27,378}=2,13$ ;  $p<0,05$ ;  $\epsilon=0,322$ ). So tranken zu den in folgender Abbildung markierten Zeitpunkten jene CMS-Tiere weniger Saccharinlösung, die im Rahmen der CMS-Prozedur einem Lichtstress ausgesetzt waren.

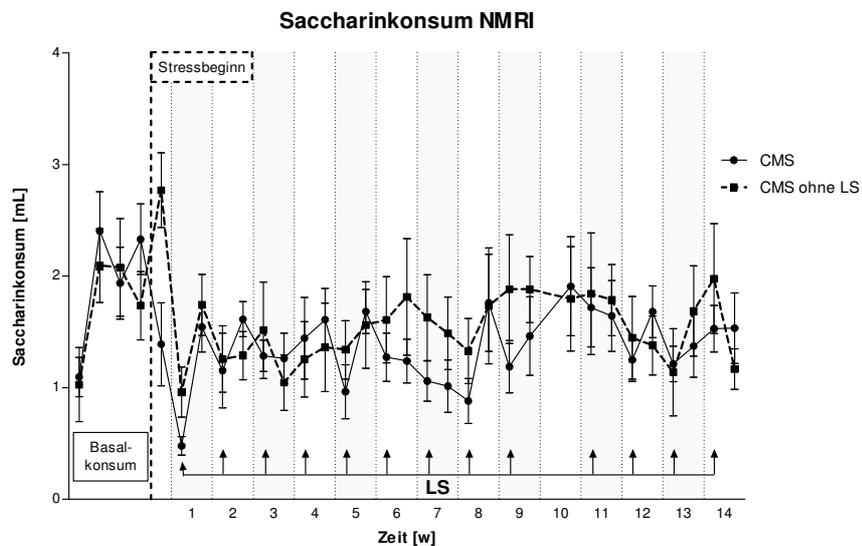


**Abbildung 4.4:** Saccharinkonsum der FVB-Mäuse der beiden CMS-Gruppen aus Experiment 4. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=8$ . Die Messwerte, die nach der Anwendung von LS ermittelt wurden, sind durch Pfeile gekennzeichnet. \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$

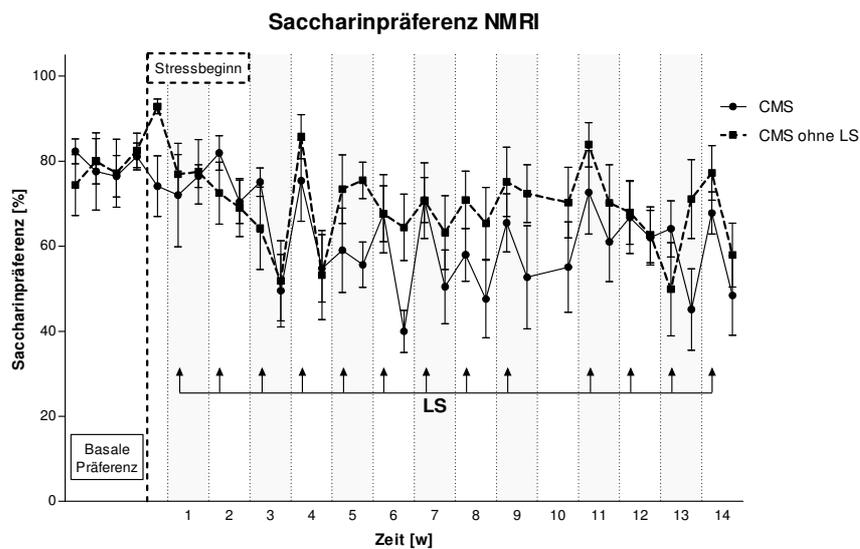
Analog dazu wurden die Daten, die in den folgenden drei Abbildungen gezeigt sind, ausgewertet. Weder in der Saccharinpräferenz der FVB-Mäuse noch im Saccharinkonsum bzw. in der -präferenz von NMRI-Tieren ergab sich ein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. Ebenso wenig konnten signifikante Interaktionseffekte der Faktoren Lichtstress x Zeit festgestellt werden.



**Abbildung 4.5:** Saccharinpräferenz der FVB-Mäuse der beiden CMS-Gruppen aus Experiment 4. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=8$ . Die Messwerte, die nach der Anwendung von LS ermittelt wurden, sind durch Pfeile gekennzeichnet



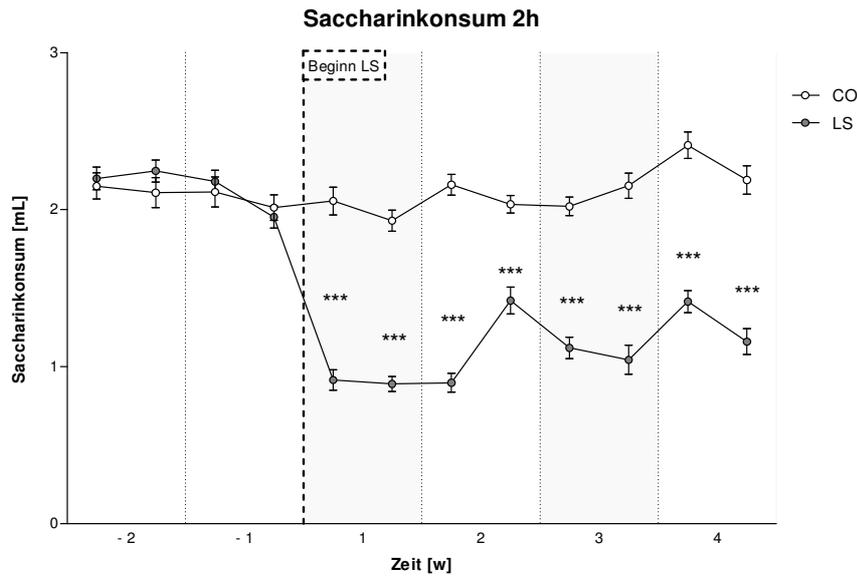
**Abbildung 4.6:** Saccharinkonsum der NMRI-Mäuse der beiden CMS-Gruppen aus Experiment 4. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=8$ . Die Messwerte, die nach der Anwendung von LS ermittelt wurden, sind durch Pfeile gekennzeichnet



**Abbildung 4.7:** Saccharinpräferenz der NMRI-Mäuse der beiden CMS-Gruppen aus Experiment 4. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=8$ . Die statistische Auswertung ergab weder einen Behandlungs- noch einen Interaktionseffekt der Faktoren Behandlungsgruppe  $\times$  Zeit.

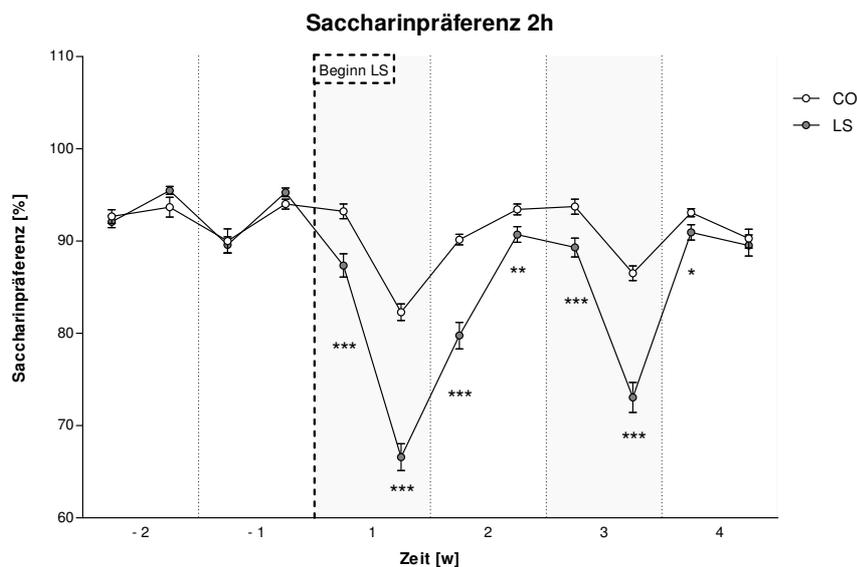
### LS als alleiniger Stressor

Die Daten zum Konsumverhalten der BL/6J-Mäuse aus Experiment 7 sind im Folgenden gezeigt als 2h-Messwerte (der ersten 2h der Dunkelphase, entsprechend der Standardprozedur dieser Arbeit, Abbildung 4.8 und Abbildung 4.9) und 24h-Messwerte (die Konsumdaten der anschließenden 22h der jeweiligen Messtage wurden zu den genannten 2h-Messwerten addiert, Abbildung 4.10 und Abbildung 4.11). Bereits nach erster Lichtstressexposition fiel der Saccharinkonsum der LS-Tiere deutlich ab (Behandlungseffekt  $F_{1,74}=185,96$ ;  $p<0,001$ ) und verblieb für den Gesamtzeitraum des Experiments bei wiederholter Exposition auf diesem gegenüber den Kontrolltieren reduzierten Niveau (Interaktionseffekt Gruppe  $\times$  Zeit  $F_{7,518}=6,22$ ;  $p<0,001$ ;  $\epsilon=0,715$ ).



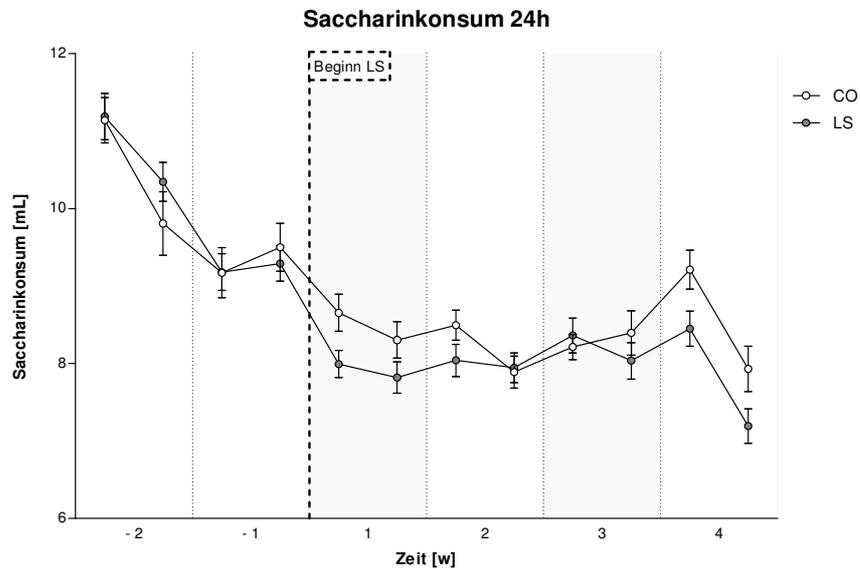
**Abbildung 4.8:** Saccharinkonsum der BL/6J-Mäuse im 2h-Messintervall in Experiment 7. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=36-40$ . \*\*\*  $p<0,001$

Ein ähnliches Resultat ergab die statistische Auswertung der Saccharinpräferenz für das 2h-Intervall. Sofort nach Beginn des Lichtstresses reduzierte sich in LS-Tieren die Präferenz für Saccharin (Gruppeneffekt  $F_{1,74}=61,97$ ;  $p<0,001$ ). Dieser Effekt von LS blieb in stets signifikantem Ausmaß für 6 weitere Messpunkte des Experiments bestehen (Interaktionseffekt LS x Zeit  $F_{7,518}=19,40$ ;  $p<0,001$ ;  $\epsilon=0,827$ ), wie Abbildung 4.9 zeigt.



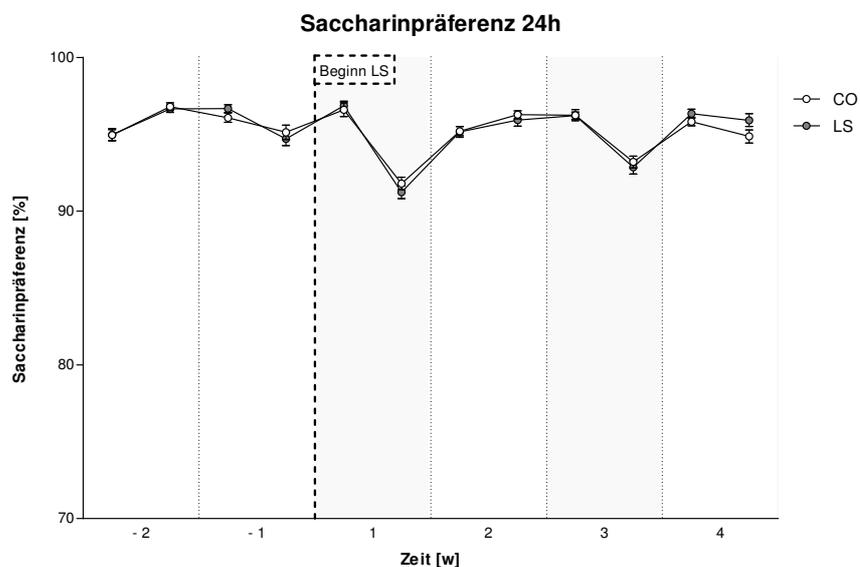
**Abbildung 4.9:** Saccharinpräferenz der BL/6J-Mäuse im 2h-Messintervall in Experiment 7. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=36-40$ . \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$

Die Messwerte der 24h-Intervalle betrachtet (siehe Abbildung 4.10), verfehlte der verminderte Saccharinkonsum in LS-Tieren in diesem Zeitraum knapp das Signifikanzniveau im Faktor Versuchsgruppe ( $F_{1,74}=3,60$ ;  $p=0,062$ ), ein Interaktionseffekt von Lichtstress x Zeit konnte nicht beobachtet werden.



**Abbildung 4.10:** Saccharinkonsum der BL/6J-Mäuse aus Experiment 7 während der 24h-Messintervalle. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=36-40$ .

Hinsichtlich der in Experiment 7 untersuchten Saccharinpräferenz im 24h-Intervall ergab sich keinerlei Unterschied im Vergleich der Versuchsgruppen, wie folgende Abbildung zeigt.



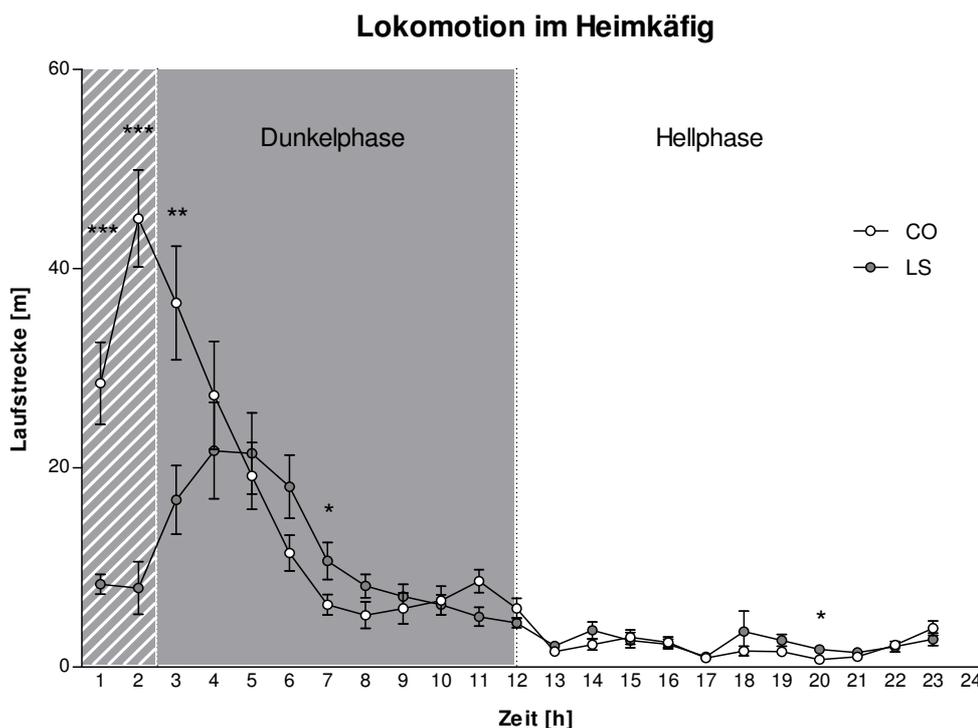
**Abbildung 4.11:** Saccharinpräferenz der BL/6J-Mäuse aus Experiment 7, gemessen im 24h-Intervall. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=36-40$ .

Zusammengenommen lassen die Ergebnisse erkennen, dass LS als alleiniger Stressor in der Lage ist, im nachfolgenden 2h-Messintervall sowohl den Konsum als auch die Präferenz von Saccharinlösung deutlich zu reduzieren. Dieser Einfluss konnte nach weiteren 22h auf die 24h-Konsumdaten nicht mehr festgestellt werden, die LS-Tiere hatten also in diesem Intervall den Saccharinkonsum aufgeholt.

### 4.3.2 Kurzfristige Verhaltenseffekte von Lichtstress: Aktivitätsmessungen im Heimkäfig

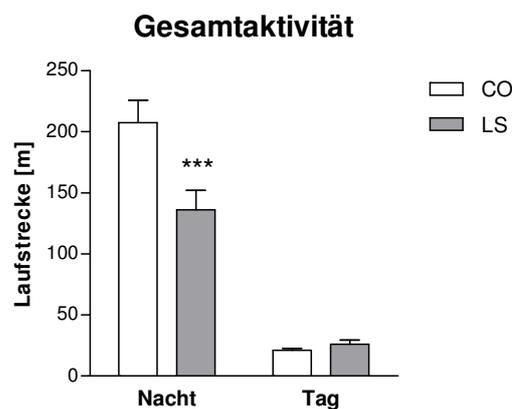
Die hier dargestellten Aktivitätsmessungen fanden in jenen Zeitabschnitten statt, in denen den Tieren die Saccharinlösung angeboten worden ist.

Abbildung 4.12 zeigt die Lokomotion der Tiere im Heimkäfig. LS-Tiere waren dabei während des gesamten Zeitraums weniger aktiv (Behandlungseffekt  $F_{1,62}=6,73$ ;  $p<0,05$ ), wobei die genaue Lokalisation der Unterschiede im Zeitverlauf (Interaktion Faktoren Lichtstress x Zeit  $F_{22,1364}=12,25$ ;  $p<0,001$ ;  $\epsilon=0,149$ ) eine deutlich verminderte Aktivität während der ersten drei Stunden ergab (siehe Abbildung 4.12): in einem Zeitraum also, in dem die Konsumparameter für das 2h-Intervall erhoben wurden, und in dem die Aktivitätsspitze der Kontrolltiere fiel. Ihre maximale lokomotorische Aktivität erreichten die LS-Tiere erst zwischen der vierten und fünften Stunde ab Messbeginn, wobei deren Spitzenwert deutlich unter dem der Kontrolltiere lag.



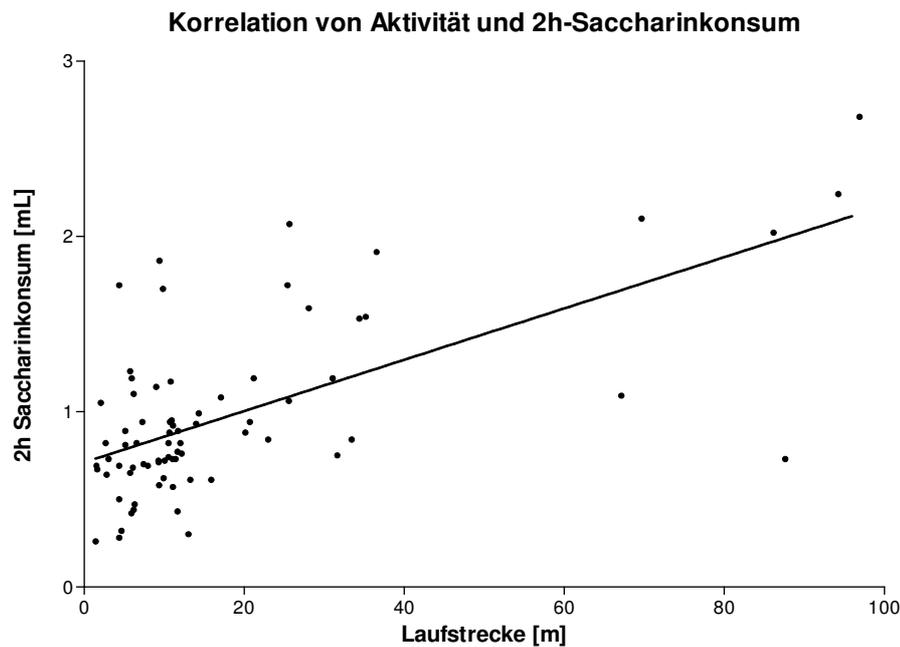
**Abbildung 4.12:** Lokomotorische Aktivität im Heimkäfig von BL/6J-Mäusen aus Experiment 7. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=30-34$ . Vorangegangener Lichtstress zeigt im betrachteten Zeitraum von 23 Stunden einen deutlichen Effekt in Form verringerter Aktivität im Heimkäfig ( $p<0,05$ ). Deutlich erkennbar zum einen die Reduktion der Aktivität in LS-Tieren während der ersten drei Stunden (das Intervall für die Erhebung des 2h-Messwerts innerhalb der Dunkelperiode ist schraffiert dargestellt), zum anderen die Verzögerung der Maximalaktivität um ca. 2-3h in LS-Mäusen. Der Spitzenwert der Aktivität in LS-Tieren ist deutlich geringer als jener der Kontrollgruppe. \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$

Die in der vorhergehenden Abbildung dargestellten Zeitverläufe wurden für die Dunkel- und für die Hellphase getrennt integriert, um den Effekt von Lichtstress auf die Gesamtaktivität in der Nacht und am Tag zu untersuchen. Dabei zeigte sich, wie in der folgenden Abbildung dargestellt, eine Verringerung der Gesamtaktivität in der Nacht durch vorangegangenen Lichtstress, die tagsüber nicht zu beobachten war (Interaktionseffekt LS x Tageszeit  $F_{1,62}=10,86$ ;  $p<0,01$ ).



**Abbildung 4.13:** Integrierte Gesamtaktivität der Mäuse aus Experiment 7. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=30-34$ . \*\*\*  $p<0,001$  gegenüber Kontrolltieren.

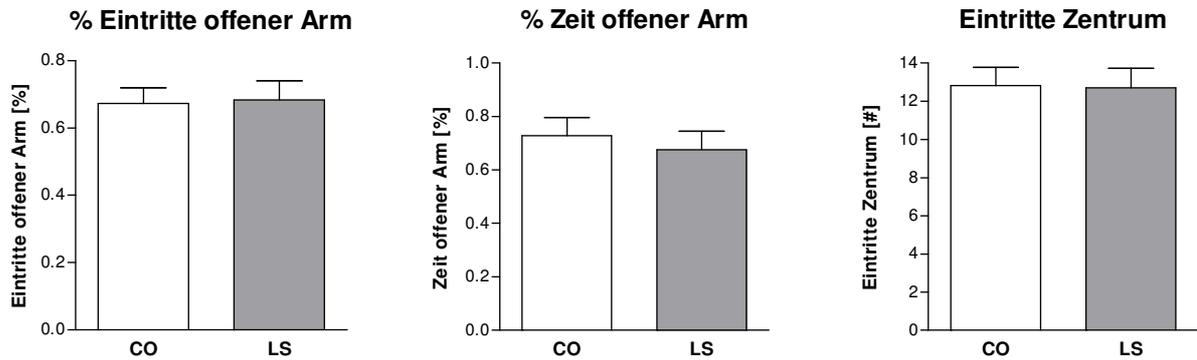
Um die lokomotorische Aktivität während des zweistündigen Messintervalls zur getrunkenen Saccharinmenge im gleichen Zeitraum in Beziehung zu setzen, wurde eine Korrelation nach Pearson gerechnet, deren Ergebnis in Abbildung 4.14 gezeigt ist. So steht der hier betrachtete 2h-Saccharinkonsum deutlich in Korrelation zur lokomotorischen Aktivität im Heimkäfig im gleichen Messzeitraum (Pearson  $r=0,637$ ,  $p<0,001$ ).



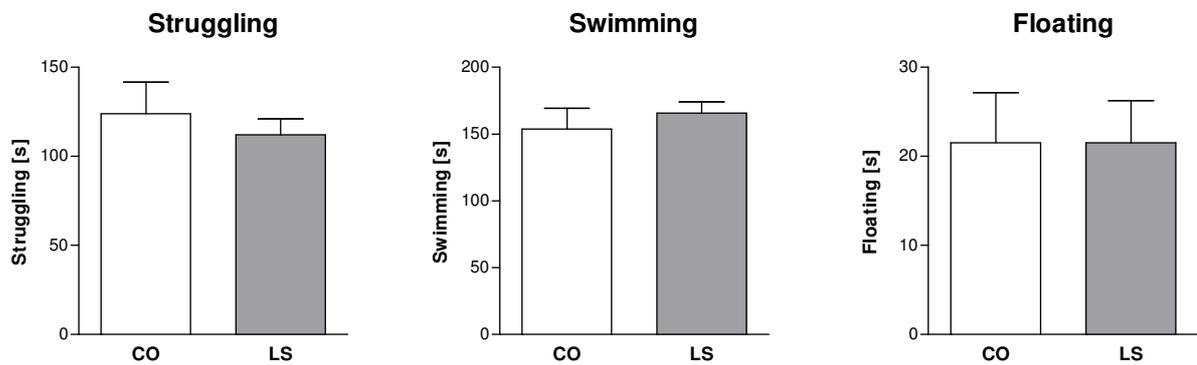
**Abbildung 4.14:** Korrelation des Saccharinkonsums während des zweistündigen Messintervalls zu Beginn der Dunkelphase in Experiment 7 mit der Aktivität im Heimkäfig im gleichen Zeitraum. Gezeigt ist der Plot der Einzelwerte (n=76) mit Regressionsgerade. Pearson's  $r=0,637$ ,  $p<0,001$

### 4.3.3 Langfristige Verhaltenseffekte von chronischem Lichtstress

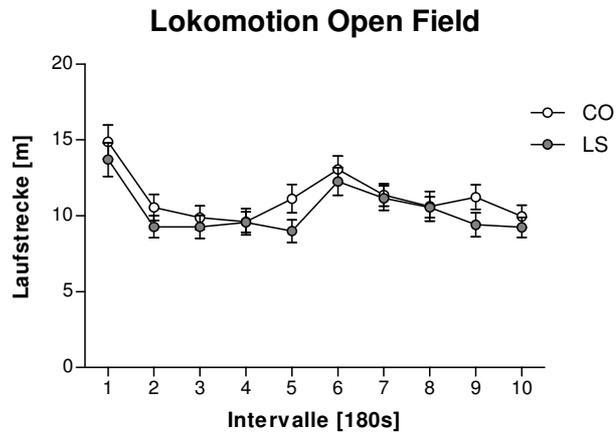
Nach insgesamt acht Wochen Lichtstress wurden die BL/6J-Mäuse aus Experiment 7 mit drei bis sechs Tagen Abstand zum letzten Lichtstressor im EPM, OF und FST auf langfristige Verhaltenseffekte von chronischem Lichtstress hin untersucht. Die Tests fanden zu Beginn der Dunkelphase statt. Wie in den folgenden drei Abbildungen dargestellt ist, zeigt sich in keinem der Tests weder in angst-, depressions- oder lokomotionsassoziierten Parametern ein Langzeiteffekt (>3 Tage) von Lichtstress.

Angstassoziertes Verhalten im EPM

**Abbildung 4.15:** Verhaltensparameter aus dem EPM-Test in Experiment 7, 3 Tage nach Beendigung des 8wöchigen Lichtstresses. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=12$  (CO) bzw. 20 (LS).

Depressionsassoziertes Verhalten im FST

**Abbildung 4.16:** Verhaltensparameter aus dem *Forced Swim Test* in Experiment 7, 6 Tage nach Beendigung des 8wöchigen Lichtstresses. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=12$  (CO) bzw. 20 (LS).

Lokomotorische Aktivität im OF

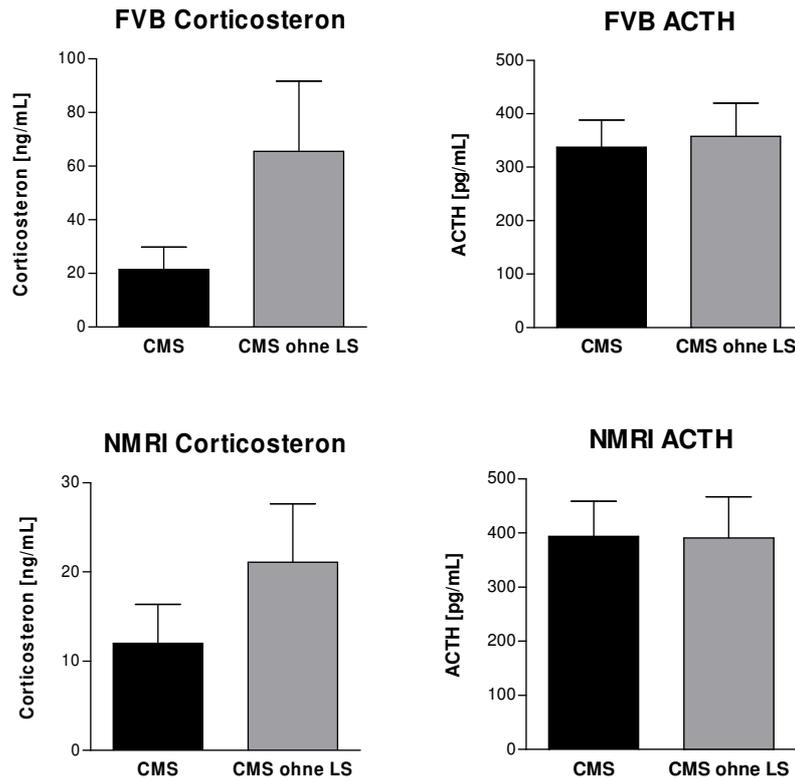
**Abbildung 4.17:** Lokomotorische Aktivität im OF-Test in Experiment 7, 4 Tage nach Beendigung des 8wöchigen Lichtstresses. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=12$  (CO) bzw. 20 (LS).

#### 4.3.4 Physiologische Parameter

##### a) *Langfristiger Effekt von Lichtstress als Komponente im CMS-Paradigma auf physiologische Parameter: Ergebnisse aus Experiment 4*

##### Corticosteron und ACTH

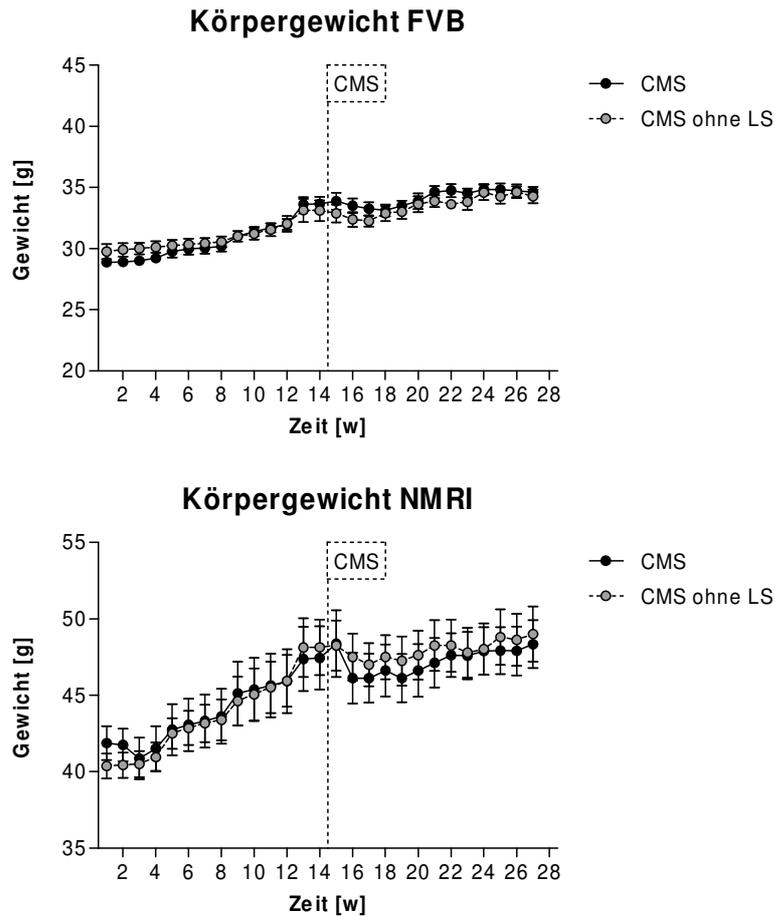
In Experiment 4 wurden die Plasmakonzentrationen von Corticosteron und ACTH für die Versuchsgruppen CMS und CMS ohne LS bestimmt. Das verwendete Blut wurde den Tieren beim Töten am Tag nach FST 2 zu Beginn der Dunkelphase entnommen. Die nachfolgende Analyse ergab, dass fehlender LS im CMS-Paradigma keine langfristige Veränderung des Corticosteron- oder ACTH-Plasmaspiegels zur Folge hatte (siehe Abbildung 4.18).



**Abbildung 4.18:** Plasmahormonkonzentrationen von Corticosteron und ACTH in gemäß Standardprotokoll gestressten Mäusen (CMS) und in Tieren, bei denen der LS aus der Prozedur gestrichen wurde (CMS ohne LS) – die Daten stammen von FVB- und NMRI-Mäusen aus Experiment 4 und wurden unter akut ungestressten Bedingungen zu Beginn der Dunkelphase nach 15 Wochen CMS erhoben. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=6-8$ .

### Körpergewicht

Weder auf die Entwicklung des Körpergewichts in gestressten FVB- noch in gestressten NMRI-Mäusen hatte der fehlende LS in der Prozedur einen Einfluss, wie folgende Abbildung zeigt.

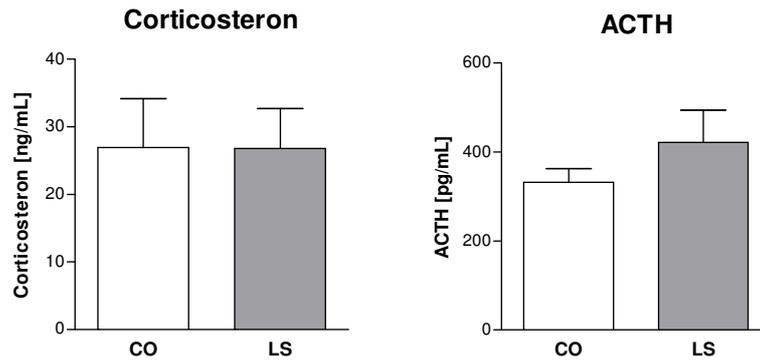


**Abbildung 4.19:** Entwicklung des Körpergewichts von FVB- (oben) und NMRI-Mäusen (unten) aus Experiment 4. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=8$ .

**b) Effekte von Lichtstress als alleinigem Stressor (LS) auf physiologische Parameter: Ergebnisse aus Experiment 7**

Corticosteron und ACTH

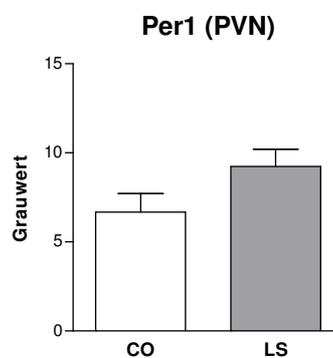
Nach insgesamt 8 Wochen Lichtstress und einer Woche Verhaltenstests wurden die Tiere aus Experiment 7 einen Tag nach dem FST zu Beginn der Dunkelphase getötet und ihnen Blut entnommen. Dessen Analyse hinsichtlich der Plasmaspiegel von Corticosteron und ACTH ergab für beide Hormone keinen langfristigen Effekt von LS auf deren Konzentration im Plasma von LS-Tieren, wie folgender Abbildung zu entnehmen ist.



**Abbildung 4.20:** Plasmahormonkonzentrationen von Corticosteron und ACTH von BL/6J-Mäusen in Experiment 7, unter akut ungestressten Bedingungen 8 nach insgesamt 8 Wochen LS und einer Woche Verhaltenstests. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=12$  (CO) bzw. 20 (LS).

#### Langzeitauswirkung von chronischem LS auf die Per1-Expression im PVN

Die Untersuchung des Expressionslevels von Per1 mRNA im PVN der chronisch mit LS gestressten Tiere aus Experiment 7 ergab eine zwar tendenzielle, aber nichtsignifikante Erhöhung ( $p=0,11$ ) durch die LS-Prozedur.

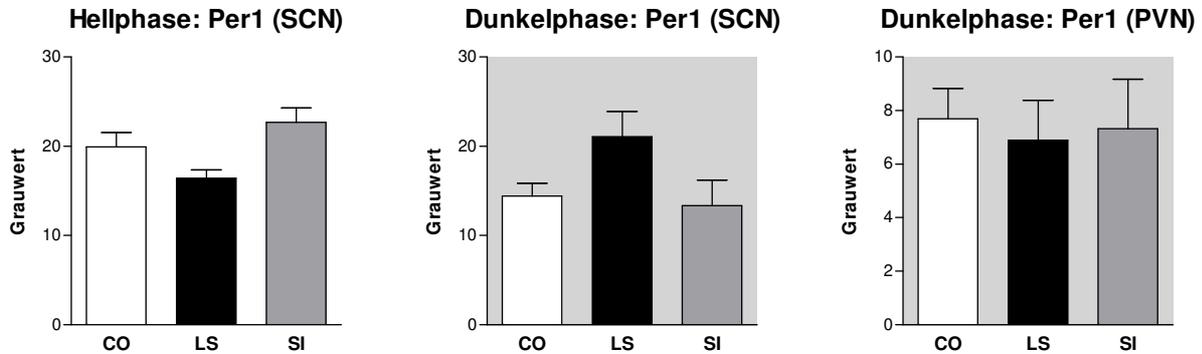


**Abbildung 4.21:** mRNA-Expressionslevel von Per1 im PVN der Mäuse aus Experiment 7 nach insgesamt 8 Wochen LS und einer Woche Verhaltenstests. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=5$ .

#### Kurzfristiger Effekt von (sub)akutem LS auf die Per1-Expression in PVN und SCN

Wie in Abbildung 4.22 dargestellt, wurde die Per1-Expression in PVN und SCN der Mäuse aus Experiment 8 6h nach Beginn der Hellphase und zu Beginn der Dunkelphase auf einen unterschiedlichen Einfluss von subakutem LS gegenüber subakutem SI hin untersucht. Es ergab sich dabei jeweils in der Einweg-ANOVA kein signifikanter Effekt der

Behandlungsgruppen, für die Ermittlung der Per1-Expression im PVN in der Hellphase war die Expression unter dem Detektionslimit, weswegen die entsprechenden Daten nicht gezeigt sind.



**Abbildung 4.22:** mRNA-Expressionslevel von Per1 in PVN und SCN der Tiere aus Experiment 8. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße n=5.

#### 4.4 Diskussion

Die Ergebnisse der Versuche aus Experiment 4 zeigen, dass das Fehlen des Lichtstresses als Komponente im CMS-Paradigma zwar nach einigen Wochen zu geänderten Fluktuationen im Konsumverhalten führte, generell das Auftreten von deutlichen Schwankungen aber nicht verhinderte. Dass nach fehlendem Lichtstress die erhobenen Messwerte im Vergleich innerhalb der Gruppe oftmals erhöht waren (zumindest tendenziell in FVB-Mäusen), wurde als weiteres Indiz gewertet, Lichtstress könnte akuten Einfluss auf die nachfolgende Konsummessung haben. Da sich der Saccharinkonsum in seinem Zeitverlauf nur in den FVB-Mäusen und nur zu wenigen Zeitpunkten signifikant zwischen den Gruppen unterschied, kann nicht von einer bedeutenden und langfristig wirksamen Eigenschaft der Lichtkomponente als Stressor im Rahmen des CMS-Paradigmas ausgegangen werden. Dies wird durch fehlende Unterschiede in den Corticosteron- und ACTH-Plasmaspiegeln und die gleiche Entwicklung des Körpergewichts der beiden Stressgruppen sowohl in FVB- als auch in NMRI-Mäusen untermauert.

In der Betrachtung der wiederholten Beleuchtung über Nacht als ausschließlichem Stimulus bzw. Stressor (LS) in Experiment 7 zeigte sich eine deutliche Reduktion im Konsumverhalten von süßer Lösung im 2h-Messintervall zu Beginn der Dunkelphase. In den darauf folgenden 22 Stunden holten die dem Lichtstress ausgesetzten Tiere diesen verminderten Konsum wieder auf, so dass in der Summe die 24h-Messwerte keinen Unterschied der Versuchsgruppen ergaben. In der Saccharinpräferenz zeigte sich der gleiche Effekt: Erniedrigung im 2h-Intervall und kein Unterschied mehr im 24h-Gesamtwert.

Die Tatsache, dass während der ersten zwei Stunden der Dunkelphase die Aktivität von nachtaktiven Nagern am höchsten ist, wurde schon von D'Aquila et al. (1997) gezeigt und zur Optimierung der Konsummessungen verwendet. Die Befunde dieser Originalarbeit bezüglich der Aktivität der Tiere konnten hier bestätigt und dahingehend erweitert werden, dass Lichtstress die Aktivität im Heimkäfig während der ersten zwei Stunden der folgenden Dunkelphase deutlich erniedrigte und den Zeitpunkt der (verringerten) Maximalaktivität in den LS-Tieren um etwa zwei bis drei Stunden verzögerte.

Die Ergebnisse zeigten in der Korrelationsanalyse, dass die zeitliche Verschiebung des Konsumverhaltens sehr deutlich mit der ebenfalls durch Lichtstress verschobenen Aktivität im Heimkäfig der Tiere zur gleichen Zeit assoziiert war. Die Korrelation von Aktivität und Konsum stimmt überein mit Befunden aus der Literatur (z.B. Minematsu et al., 1995). Daher überraschte es nicht, dass eine zeitliche Verschiebung in der lokomotorischen Aktivität im Heimkäfig ein verzögertes Konsumverhalten nach sich zog. Die Verringerung der Saccharinpräferenz im 2h-Messintervall passt nicht zu diesem Erklärungsansatz, denn unabhängig von der absoluten Trinkmenge zeigte diese die Verschiebung hin zu vermehrtem Wasserkonsum an und ist somit theoretisch interpretierbar als anhedonisches Verhalten. Jedoch war in LS-Tieren der absolute Saccharinkonsum in dieser Zeit gegenüber Kontrollmäusen so niedrig, dass artefaktische Ungenauigkeiten im Wasserkonsum große Auswirkung auf die Präferenz haben konnten. Dies stünde in Zusammenhang mit einem von Weiss (1997) postulierten Minimalkonsum von Wasser, der im Zweiflaschenmodell gegenüber Saccharin oder Zucker stets vorhanden ist und nicht weiter reduziert werden kann. Eine alternative Erklärung für die Beobachtung kann aufgrund der Datenlage nicht gegeben werden. In Zusammenhang mit der nach 24h gemessenen und durch Lichtstress völlig unbeeinflussten Saccharinpräferenz wird weiterhin das Konsumverhalten als Ganzes interpretiert.

Da sowohl Konsum als auch Aktivität recht schnell wieder in den ursprünglichen circadianen Takt zurückfanden – in den 24h-Konsummesswerten und in der Tagaktivität ergab sich kein Unterschied mehr zwischen den Behandlungsgruppen – ließ sich nach 24h keine mehr durch Licht gestörte circadiane Rhythmik oder ein als Anhedonie interpretierbares Verhalten erkennen.

So war die akute Aktivitätsverschiebung der einzige signifikante Verhaltenseffekt des Lichtstimulus', denn es ergaben sich in Experiment 7 keinerlei Hinweise auf einen langfristig ausschließlich durch Lichtstress veränderten Phänotyp hinsichtlich lokomotorischer Aktivität im *Open Field Test* oder im angst- oder depressionsassoziierten Verhalten. Dies spiegelt sich auch in den Plasmakonzentrationen von Corticosteron und ACTH wieder.

Physischer Stress ist in der Lage – zumindest kurzfristig – die Per1-Expression im PVN zu erhöhen (Takahashi et al., 2001). Die diesen Gedanken aufgreifende Untersuchung der Per1-Aktivität im PVN, um auch mögliche Langzeit-Stresseffekte der Störungen des Lichtrhythmus' auf molekularer Ebene erfassen zu können, ergab keine signifikante Erhöhung in LS-Tieren. Dies lässt in Zusammenhang mit den anderen Befunden zum Verhaltensphänotyp der LS-Tiere in Experiment 7 den Schluss zu, dass die Störungen des Lichtrhythmus' alleine keine robusten langfristigen Stressorqualitäten haben. Kurzfristig jedoch zeigten sich in der Per1-Expression im SCN zumindest Tendenzen, wie man sie bei Verschiebungen der circadianen Rhythmik erwarten würde (Takahashi et al., 2001). Im Vergleich dazu ergaben sich diese Verschiebungen beim *Social Interaction*-Stress nicht, der als lichtunabhängiger Stressor mit untersucht wurde.

Die molekularbiologischen Daten stützen daher die Schlussfolgerung, nach der der verwendete Lichtstimulus eher Qualitäten zur kurzfristigen Verschiebung der lokomotorischen Aktivität hat, als dass er die Eigenschaften eines (langfristig effektiven) Stressors repräsentiert. Als Komponente des in dieser Arbeit verwendeten CMS-Protokolls steht seine kurzfristige und deutliche Beeinflussung der lokomotorischen Aktivität der Tiere im Vordergrund, die weiter direkte Auswirkung auf das Konsumverhalten im kurzen Messzeitraum (von z.B. 2h) der anschließenden Dunkelphase haben kann. Die Interpretation der so nach Beleuchtung über Nacht erhobenen Konsumdaten – gar als zentralem Readout des hier vorgestellten CMS-Modells – in Richtung anhedonischem Phänotyp ist angesichts der maßgeblichen Abhängigkeit von Aktivitätsverschiebungen durch Störungen des Lichtrhythmus' kaum zu vertreten.

## 5 Akuter Stress im Kontext des CMS

### 5.1 Einleitung

Die Stressvorerfahrung eines Organismus und damit dessen Reaktivität auf und Anpassungsverhalten an eine unbekannte Stresssituation ist Gegenstand extensiver Untersuchungen. In der psychiatrischen Forschung sind im Besonderen pränatale und frühkindliche Stresseinflüsse in Hinblick auf die Entwicklung von affektiven Störungen (z.B. Angsterkrankungen, Depression und Schizophrenie) von Interesse (Anisman et al., 1998b; de Kloet et al., 2005; Gutman & Nemeroff, 2002; Millstein & Holmes, 2007; Reser, 2007; Sullivan et al., 2006; Vergne & Nemeroff, 2006; Weinstock, 1997). In Bezug auf die Modellentwicklung der vorliegenden Arbeit war in diesem Zusammenhang von Bedeutung, inwieweit die CMS-Vorerfahrung eine Vorbedingung (*priming factor*) für akuten unbekanntem Stress darstellt. Zum einen würde eine nachhaltige Wirkung des CMS-Protokolls über dessen Beendigung hinaus die Validität unterstreichen können (ein depressiver Patient gesundet schließlich nicht nur durch die Beseitigung stressvoller Lebensumstände), zum anderen sollten die scheinbar paradoxen Verhaltensbefunde der Hyperreaktivität auf Testparadigmen in einem erweiterten Zusammenhang untersucht werden. Den Gedanken von Pijlman et al. (2003a; 2003b; 2002) aufgreifend, wäre es denkbar, dass sich der Zeitpunkt der Erhebung der Verhaltensdaten (Konsum, Ängstlichkeit, Lokomotion) zu nahe an der Stressprozedur befand, somit nur schlecht eine Aussage über Langzeiteffekte getroffen werden konnte. Zur Beurteilung, wie in diesem Zusammenhang der robuste Befund der Hyperaktivität einzuordnen ist, sollte untersucht werden, wie sich das Verhaltensreadout einer länger zurückliegenden (und gleichzeitig kürzeren) CMS-Erfahrung von dem eines kontinuierlichen CMS-Paradigmas unterscheidet. Könnte das in der vorliegenden Arbeit entwickelte CMS-Protokoll nur eine Aneinanderreihung von (sub)akuten bzw. mittelfristigen Stresseffekten darstellen, so dass nach Beendigung der Prozedur die Auswirkung der Stressoren recht schnell an Bedeutung verliert? Durch Stress gestörtes Risikoabschätzungsverhalten wurde z. B. von Quartermain et al. (1996) als nur vorübergehende Erscheinung nach akutem Stress gefunden. Oder kumuliert vielmehr die wiederholte Stresserfahrung in der CMS-Standardprozedur, bis sich ein entsprechender Verhaltensphänotyp ausbildet (McEwen, 2001) – mit mutmaßlich lang anhaltenden Auswirkungen? Nach der Arbeit von McEwen (2001) führt (chronischer) Stress erst dann zu Maladaptation und damit zu einer depressiven Symptomatik, wenn ein individueller Grad an Stressqualität und akkumulierter -quantität überschritten wird („allosteric load“).

Besonders interessant waren diese Fragen in Verbindung mit dem Auftreten von unbekanntem akutem Stress. Generell wird davon ausgegangen, dass chronischer Stress eine Vorbelastung darstellt, die den Umgang mit neuen, akuten Stressoren verschlechtert (Bhatnagar & Dallman, 1998). Bereits in Experiment 3 wurde die Auslenkung des Corticosteronplasmaspiegels in Balb/c- und BL/6J-Mäusen durch einen für die Tiere neuartigen Stressor (*Forced Swim Test*) untersucht. Im Gegensatz zu den meisten Befunden in der Literatur (Bhatnagar & Dallman, 1998) wurde dabei eine verminderte Responsivität des Corticosteronplasmaspiegels von CMS-Mäusen gegenüber dem von Kontrolltieren festgestellt. Es konnte außerdem in keinem der durchgeführten Experimente nach dem jeweils finalen Verhaltensexperiment ein durch CMS erhöhter Plasmaspiegel an Corticosteron oder ACTH festgestellt werden. Ebenso wie die Hyperaktivität in Verhaltenstests waren dies Befunde, die ebenso von anderen Arbeitsgruppen publiziert wurden (Marin et al., 2007), jedoch nicht in das klassische Konzept von chronischem Stress passten (van Praag, 2004).

Pijlman et al. (2003b) konnten hierzu die Qualität der Stressoren differenzieren in physische und emotionale, mit jeweils gegensätzlichen Effekten auf Konsumverhalten und lokomotorische Aktivität. So war physischer Stress in der Lage, die Saccharinpräferenz und die lokomotorische Aktivität im *Open Field Test* zu senken, emotionaler Stress hingegen erhöhte beide Verhaltensparameter (Pijlman et al., 2003b), wie schon bei der Charakterisierung der Mausstämme in der vorliegenden Arbeit diskutiert wurde. Dieser Ansatz sollte im Folgenden auf das Zusammenwirken von chronischem und akutem Stress erweitert werden. Möglicherweise könnten sich daraus weitere Antworten auf oben genannte Fragestellungen ergeben, indem man die Reaktivität der CMS-Mäuse auf einen für die Tiere unbekanntem, akuten und starken Stressor untersuchte.

Im Besonderen waren dabei folgende Fragestellungen von Interesse:

- Gibt es persistierende Effekte einer 7wöchigen CMS-Erfahrung auf das Konsumverhalten, auf angst- und depressionsassoziiertes Verhalten?
- Sind solche Effekte auch hinsichtlich der Reaktivität auf einen unbekanntem Stressor zu beobachten?
- Kann ein neuartiger, akuter Stressor eine längerfristige (> 2h) Erhöhung der Stresshormonkonzentrationen in CMS-Tieren bewirken?
- Welchen Einfluss hat hierbei eine längere Zeit zurückliegende CMS-Erfahrung?

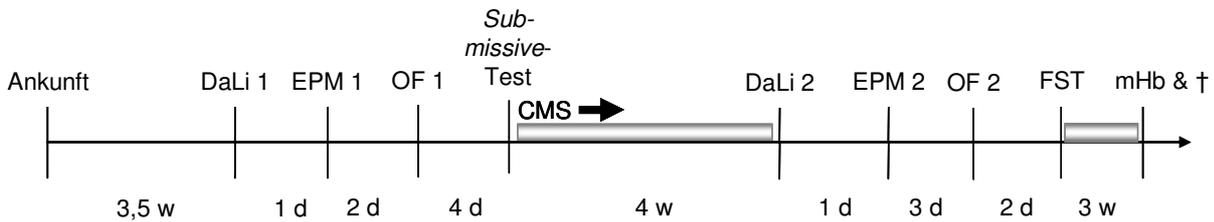
- Welche für die Modellentwicklung richtungsweisenden Ansätze können daraus abgeleitet werden?

## 5.2 Versuchsdurchführung

Die in diesem Kapitel untersuchten Daten wurden in den Experimenten 5 und 6 generiert. Um den Einfluss einer längere Zeit zurückliegenden CMS-Erfahrung, die mit sieben Wochen Dauer auch gegenüber der CMS-Vergleichsgruppe verkürzt war, auf Verhalten und auf physiologische Parameter zu ermitteln, wurde in Experiment 6 das CMS-Paradigma für die entsprechende Versuchsgruppe (im folgenden als „CMS temp“ bezeichnet) nach 7 Wochen beendet und die Tiere für weitere 7 Wochen wie Kontrollmäuse behandelt.

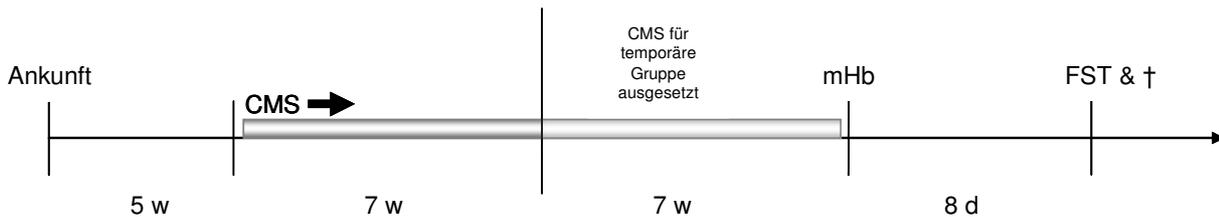
In beiden Experimenten (5 und 6) wurde im finalen Verhaltenstest jeweils eine Untergruppe von CO- und CMS-Tieren (Experiment 5) bzw. CO-, CMS- und CMS temp-Mäusen (Experiment 6) einer Vorbehandlung mit einem akuten und für die Tiere bis dato unbekanntem Stressor unterzogen. Im Fall von Experiment 5 bestand dieser aus einer einmaligen *Footshock*-Applikation 3h vor dem mHb-Test; in Experiment 6 wurden die Tiere 5h vor dem mHb-Test und dem FST für jeweils zwei Stunden immobilisiert (*Restraint Stress*). In die statistische Auswertung gingen die Ergebnisse aller Untergruppen mit ein, um eine möglichst umfassende Aussage zu ermöglichen. Die in Kapitel 5.3.2a) gezeigten Daten des Konsumverhaltens wurden in den zwei Stunden zwischen der Applikation des akuten Stresses und dem anschließenden mHb-Test ermittelt. *Footshock* oder *Restraint Stress* ist in den entsprechenden Untergruppen mit „+“ gekennzeichnet.

### Experiment 5



**Abbildung 5.1:** Experiment 5 wurde mit 40 BL/6N-Mäusen durchgeführt, die zu Beginn der CMS-Phase in Gruppen zu 20 Tieren aufgeteilt wurden: eine CMS-Gruppe, die dem Standardprotokoll nach gestresst wurde und in eine ungestresste Kontrollgruppe. Vor DaLi 2 wurde die Kontrollgruppe weiter unterteilt in 10 Tiere, die weiter in Verhaltensexperimenten getestet wurden, und in 10 solche, die von da an völlig ungestört gehalten wurden. In der Woche der Tests DaLi 2, EPM 2, OF 2 und FST wurde die Stressprozedur ausgesetzt und für weitere 3 Wochen zwischen FST und mHb angewandt. Der Stress endete einen Tag vor dem mHb-Test. Alle Verhaltenstests bis auf mHb (dort Beleuchtungsstärke 30 lx) fanden zu Beginn der Dunkelphase unter Rotlichtbedingungen statt.

### Experiment 6



**Abbildung 5.2:** Experiment 6 wurde mit 72 D2Jlco-Mäusen durchgeführt. Nach 5 Wochen Habitationsphase mit Messungen des basalen Flüssigkeitskonsums wurden die Tiere auf diesem basierend gleichmäßig in 3 Gruppen aufgeteilt: in (a) 24 Tiere, die für 14 Wochen dem CMS-Standardprotokoll gemäß gestresst wurden, (b) 24 Tiere, die nur 7 Wochen gestresst wurden, danach ebenso ungestresst gehalten wurden wie (c) die dritte Gruppe der 24 Kontrolltiere.

Für die beiden Verhaltensexperimente mHb und FST wurden alle 3 Gruppen nochmals unterteilt in jeweils Tiere, die akut vor den Tests *Restraint Stress* (s. Kap. 2.4.2) durchliefen und in Tiere, die akut ungestresst getestet wurden. Die CMS-Gruppen wurden dazu halbiert, die Kontrollgruppe gedrittelt, um mit der dritten Untergruppe bis zum Ende von Experiment 6 acht völlig stressnaive Tiere mitführen zu können. Diese Tiere wurden weder im mHb noch im FST getestet. Die Lichtbedingungen der beiden Tests – beide zu Beginn der Dunkelphase durchgeführt – entsprachen für mHb 30lx, für den FST wurde Rotlicht gewählt.

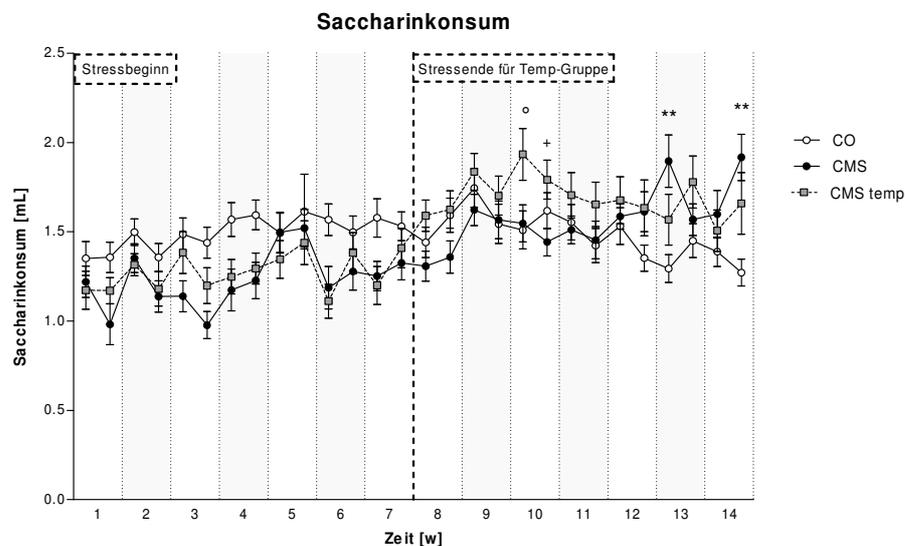
## 5.3 Ergebnisse

### 5.3.1 Längere Zeit (7 Wochen) zurückliegende im Vergleich zu aktueller CMS-Erfahrung

#### a) *Verhaltenseffekte*

##### Konsumverhalten

Zur Untersuchung, inwieweit CMS-Vorerfahrung eine langfristige Veränderung des Konsumverhaltens bewirkt, wurde in D2Jlco-Mäusen in Experiment 6 für eine der drei Versuchsgruppen der CMS beendet (Gruppe CMS temp) und ihr Konsumverhalten für weitere sieben Wochen im Vergleich zu dem der CMS-Gruppe und den Kontrolltieren ausgewertet (siehe Abbildung 5.3). Betrachtet man in dieser Abbildung die CMS temp-Gruppe gesondert, so kann ein Anstieg des Saccharinkonsums nach Beendigung der CMS-Prozedur für diese Tiere beobachtet werden. Zum Maximum dieses Anstiegs in der dritten Woche nach CMS-Ende zeigte sich der Saccharinkonsum dieser Gruppe signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe. Insgesamt ergab sich für den beobachteten Zeitraum von Woche 8 mit 14 lediglich ein Interaktionseffekt der Faktoren Versuchsgruppe x Zeit ( $F_{26,884}=4,15$ ;  $p<0,001$ ;  $\epsilon=0,713$ ), wobei kein konsistenter Effekt der Gruppen in paarweisen Vergleichen feststellbar war. Vorzeitig beendeter CMS hatte somit auf den Saccharinkonsum im Vergleich zu den beiden übrigen Behandlungsgruppen keinen Einfluss.

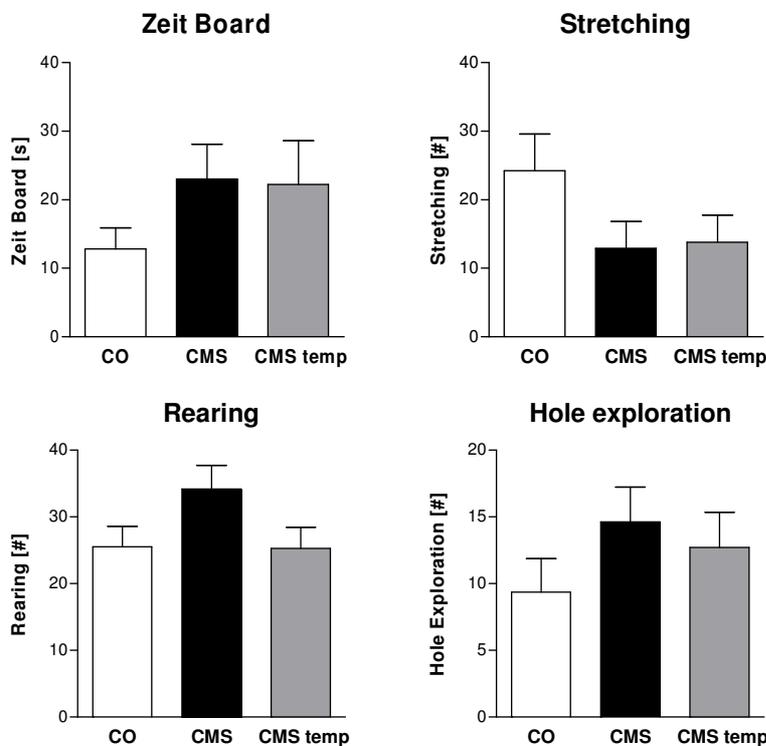


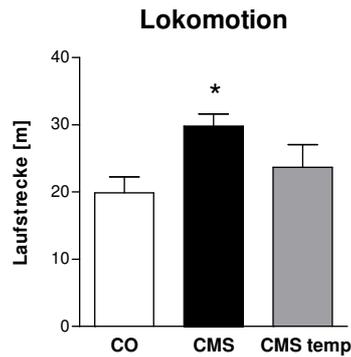
**Abbildung 5.3:** Saccharinkonsum der durchgängig und temporär gestressten D2Jlco-Mäuse aus Experiment 6. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=24$ . °  $p<0,05$  CO vs. CMS temp; +  $p<0,05$  CMS vs. CMS temp; \*\*  $p<0,01$  CO vs. CMS.

Analog zum Saccharinkonsum wurde auch die -präferenz ausgewertet: Für den betrachteten Zeitraum zwischen Woche 8 und 14 ergab die ANOVA mit Messwiederholungen weder einen Effekt für die Behandlung noch einen für die Interaktion der Faktoren Gruppe x Zeit. Die Beendigung des CMS für die CMS temp-Gruppe nach sieben Wochen ergab somit für die folgenden sieben Wochen keinen Unterschied in der Saccharinpräferenz im Vergleich zu den beiden anderen Versuchsgruppen.

### Verhalten im mHb

Der Einfluss der unterschiedlichen Dauer der Stressvorerfahrung wurde im mHb hin nach insgesamt 14 Wochen Experimentdauer getestet. Abbildung 5.4 zeigt die Ergebnisse der CMS temp-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu jenen Tieren, die für 14 Wochen kontinuierlich CMS erfahren hatten. Die statistische Auswertung mittels Einweg-ANOVA ergab nur für die lokomotorische Aktivität im mHb einen signifikanten Effekt ( $F_{2,27}=3,42$ ;  $p<0,05$ ), der für den Vergleich von CO- mit CMS-Tieren eine Aktivitätssteigerung durch CMS zeigte ( $p<0,05$ ), die in der CMS temp-Gruppe nicht beobachtbar war.

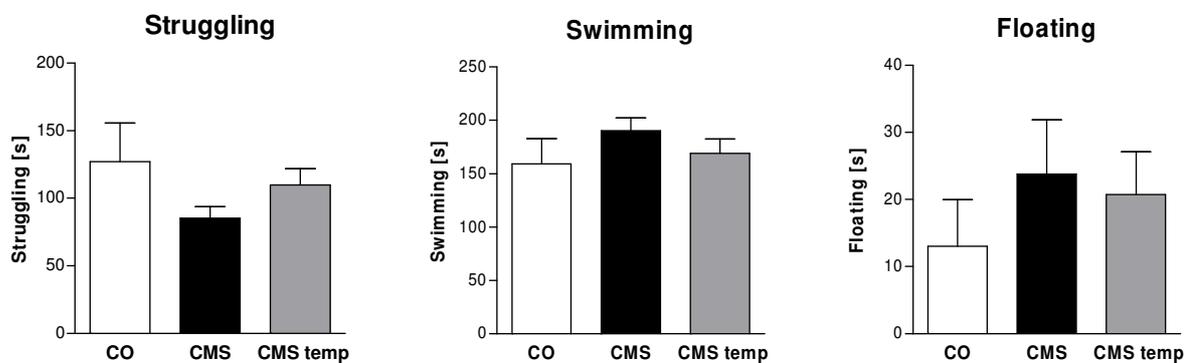




**Abbildung 5.4:** Verhaltensparameter aus dem mHb-Test der Gruppen Kontrolle (CO), durchgängig gestresst (CMS) und temporär gestresst (CMS temp) aus Experiment 6. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=8-12$ .

### Depressionsassoziiertes Verhalten (FST)

In keinem der in Abbildung 5.5 gezeigten Parameter aus dem FST – ebenfalls mit D2Jlco-Mäusen in Experiment 6 durchgeführt – ergab sich ein signifikanter Behandlungseffekt für die Versuchsgruppen.

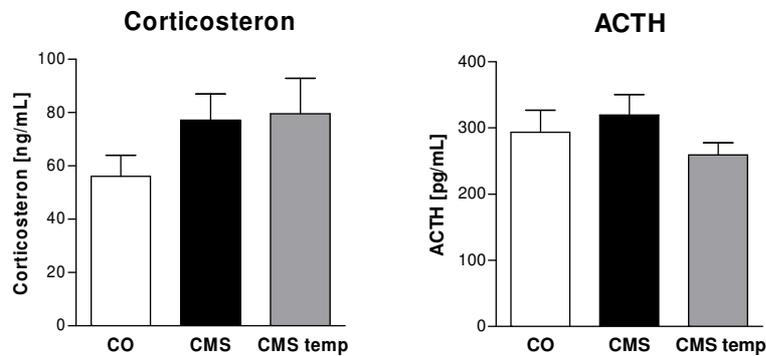


**Abbildung 5.5:** Verhaltensparameter aus dem FST der Gruppen Kontrolle (CO), durchgängig gestresst (CMS) und temporär gestresst (CMS temp). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=7-12$ .

### **b) Physiologische Parameter**

Die in folgender Abbildung gezeigten Stresshormonkonzentrationen im Blutplasma der D2Jlco-Tiere aus Experiment 6, das beim Töten der Tiere unmittelbar nach dem FST (3h

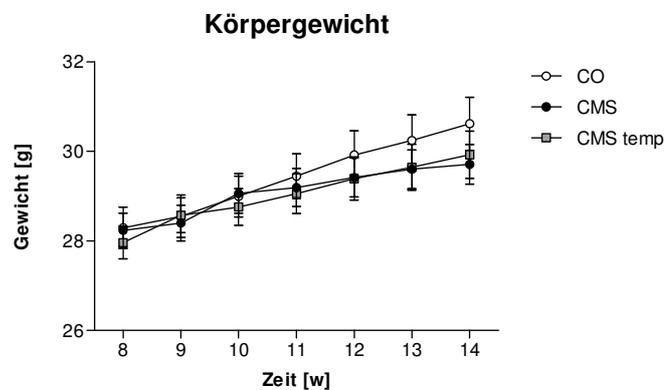
nach Beendigung des *Restraint Stress*) gewonnen wurde, wurden weder für Corticosteron noch für ACTH durch CMS bzw. temporären CMS signifikant beeinflusst.



**Abbildung 5.6:** Corticosteron- und ACTH-Plasmakonzentrationen der Gruppen Kontrolle (CO), durchgängig gestresst (CMS) und temporär gestresst (CMS temp) aus Experiment 6. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=8-11$ .

### Beeinflussung des Körpergewichts

In Abbildung 5.7 ist die signifikant unterschiedliche Entwicklung des Körpergewichts der Gruppen Kontrolle (CO), durchgängig gestresst (CMS) und temporär gestresst (CMS temp) für die zweite Hälfte von Experiment 6 dargestellt (ANOVA:  $F_{2,68}=3,63$ ;  $p<0,05$ ). Kontrolltiere zeigten dabei im Vergleich zur CMS-Gruppe einen steileren durchschnittlichen Anstieg des Körpergewichts (*post-hoc*  $p<0,05$ ), der in CMS temp-Tieren schwächer ausgeprägt war und sich somit von keiner der beiden anderen Gruppen unterschied.



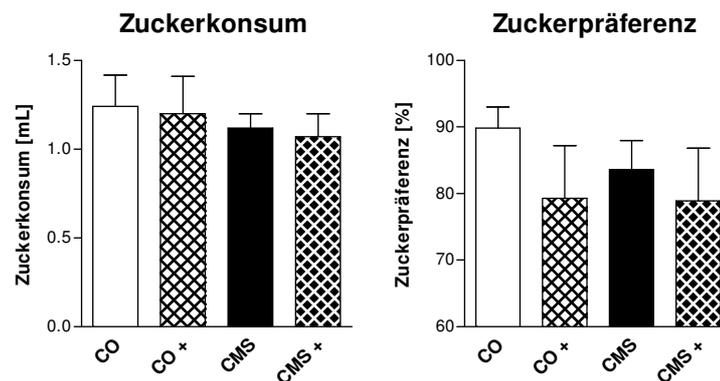
**Abbildung 5.7:** Entwicklung des Körpergewichts der Gruppen Kontrolle (CO), durchgängig gestresst (CMS) und temporär gestresst (CMS temp) nach Beendigung der CMS Prozedur für die Gruppe CMS temp (Wochen 8-14). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=24$ .

### 5.3.2 Akuter Stress im Kontext von CMS

#### a) *Verhaltenseffekte*

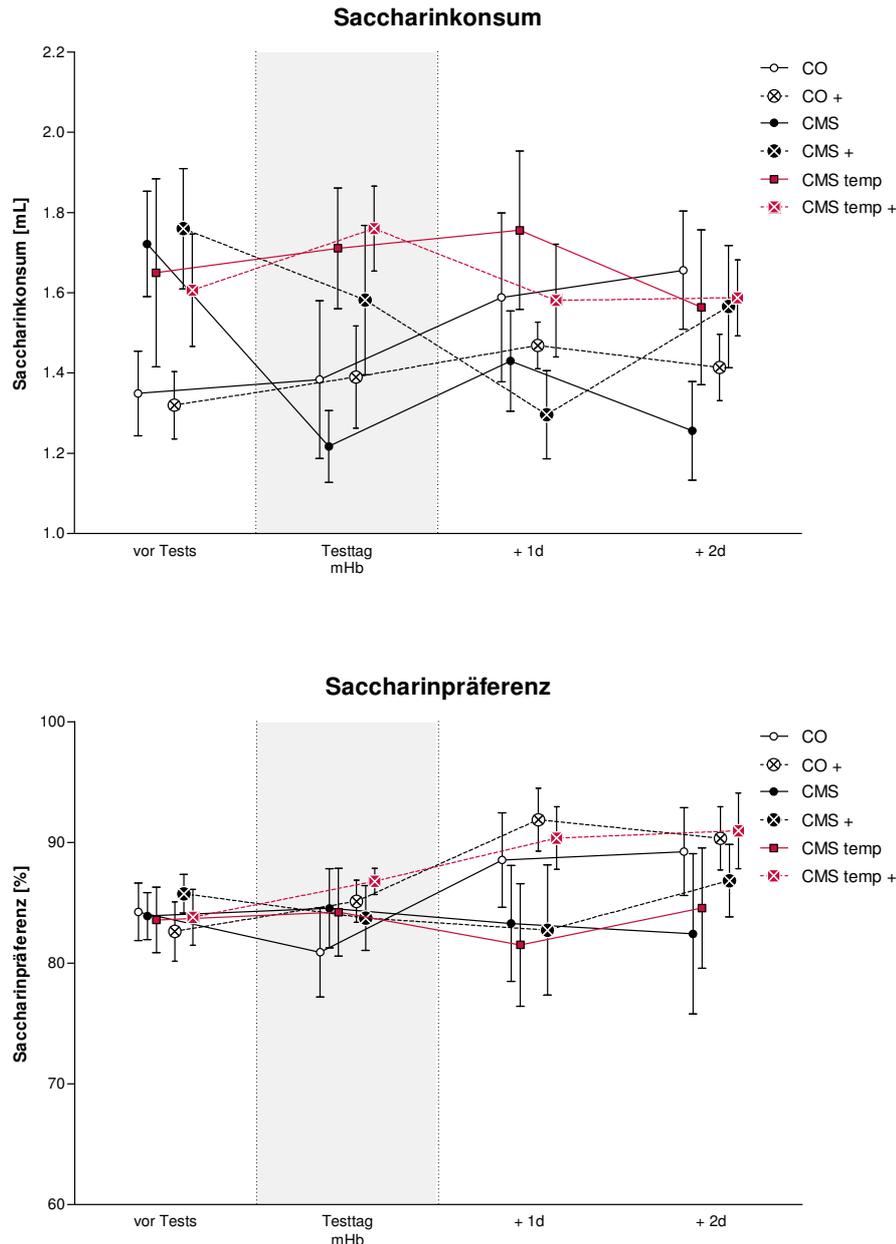
##### Einfluss von akutem Stress auf das Konsumverhalten im CMS-Paradigma

Am Ende von Experiment 5 wurde in BL/6N-Mäusen untersucht, wie sich unmittelbar vorhergehender, akuter *Footshock Stress* auf das Trinkverhalten während des üblichen zweistündigen Messintervalls auswirkt. Wie im vorherigen Verlauf in diesem Experiment wurde den Tieren Zuckerlösung zur Konsummessung gegeben. Die statistische Auswertung der beiden Faktoren Stressprozedur und *Footshock* ergab in den 4 Behandlungsgruppen keinerlei Effekt – weder chronischer noch akuter Stress beeinflusste den Zuckerkonsum oder die Zuckerpräferenz in den hier betrachteten BL/6N-Mäusen, wie folgende Abbildung zeigt.



**Abbildung 5.8:** Konsumdaten der BL/6N-Mäuse aus Experiment 5 im zweistündigen Messintervall unmittelbar nach akutem *Footshock Stress* und 8 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=8-10$ . +: *Footshock*

In Experiment 6 wurde ebenfalls die Auswirkung von akutem Stress auf das nachfolgende Konsumverhalten untersucht. Als akuter Stressor diente hierbei *Restraint Stress* in Kombination mit dem mHb-Test zum Ende dieses Experiments. Zur Ermittlung der Konsumdaten wurde den Tieren Saccharinlösung gegeben. Um den Beobachtungszeitraum ein wenig zu erweitern, wurden die Konsumdaten für zwei weitere Tage erfasst. Die Analyse der Zeitverläufe mittels zweifaktorieller ANOVA mit Messwiederholungen ergab für Saccharinkonsum und -Präferenz keinen signifikanten Effekt der Faktoren Stressprozedur und *Restraint Stress* bzw. der hier relevanten Interaktionen.

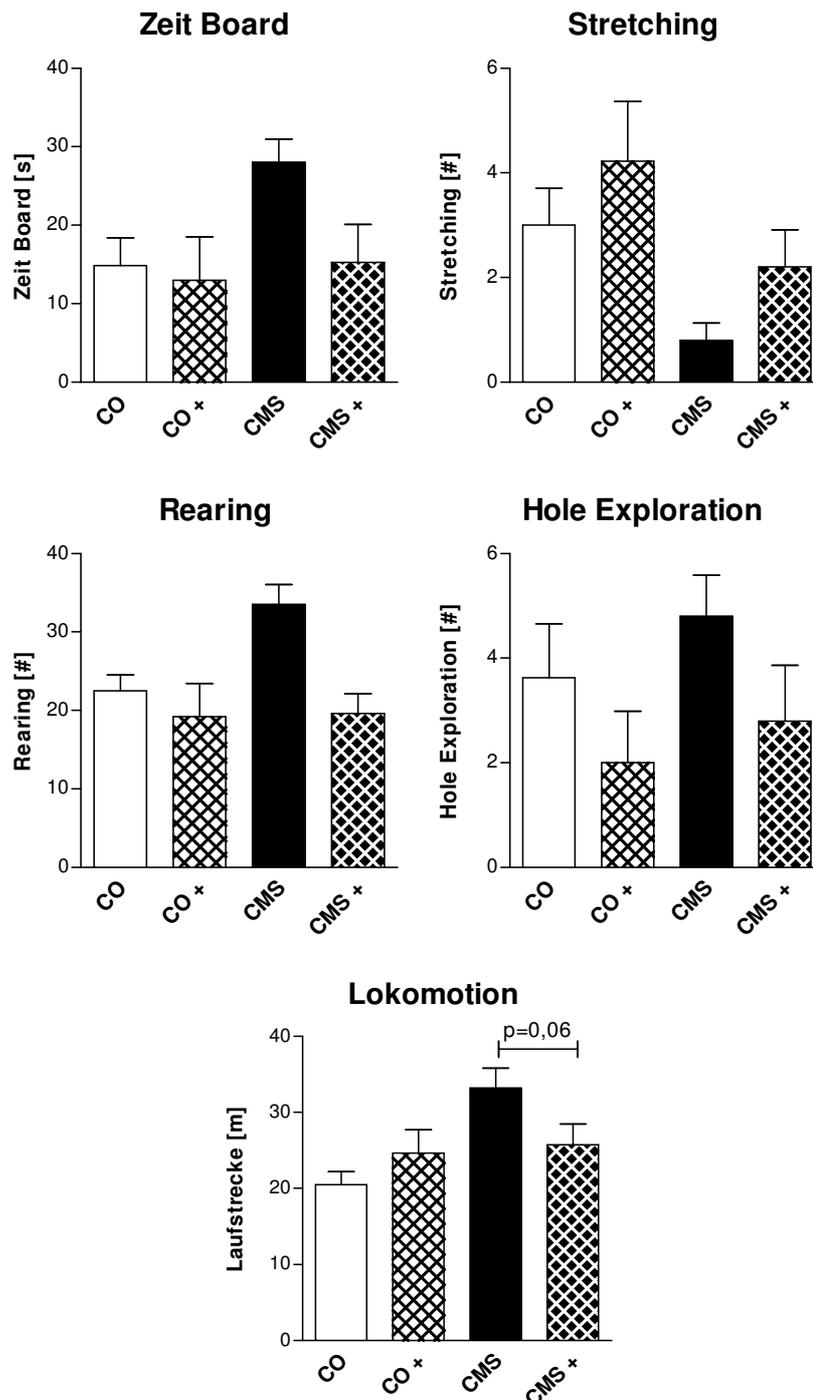


**Abbildung 5.9:** Zeitverlauf der Konsumdaten kurz vor und nach dem mHb-Test (in Kombination mit akutem *Restraint Stress*) der Gruppen Kontrolle (CO), durchgängig gestresst (CMS) und temporär gestresst (CMS temp) aus Experiment 6. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=8-12$ . +: *Restraint Stress*

### Verhaltens-effekte von akutem Footshock Stress im mHb-Test von Experiment 5

Akuter *Footshock Stress* hatte im mHb-Test von Experiment 5 zur Folge, dass akut gestresste Tiere tendenziell weniger Zeit auf dem *Board* verbrachten ( $F_{1,33}=2,80$ ;  $p=0,10$ ) und tendenziell vermehrtes Risikoabschätzungsverhalten in Form von *Stretching* zeigten ( $F_{1,33}=2,94$ ;  $p=0,09$ ). Sowohl ungerichtetes als auch gerichtetes Explorationsverhalten (*Rearing* und *Hole Exploration*) wurde durch akuten *Footshock* vor dem mHb-Test in

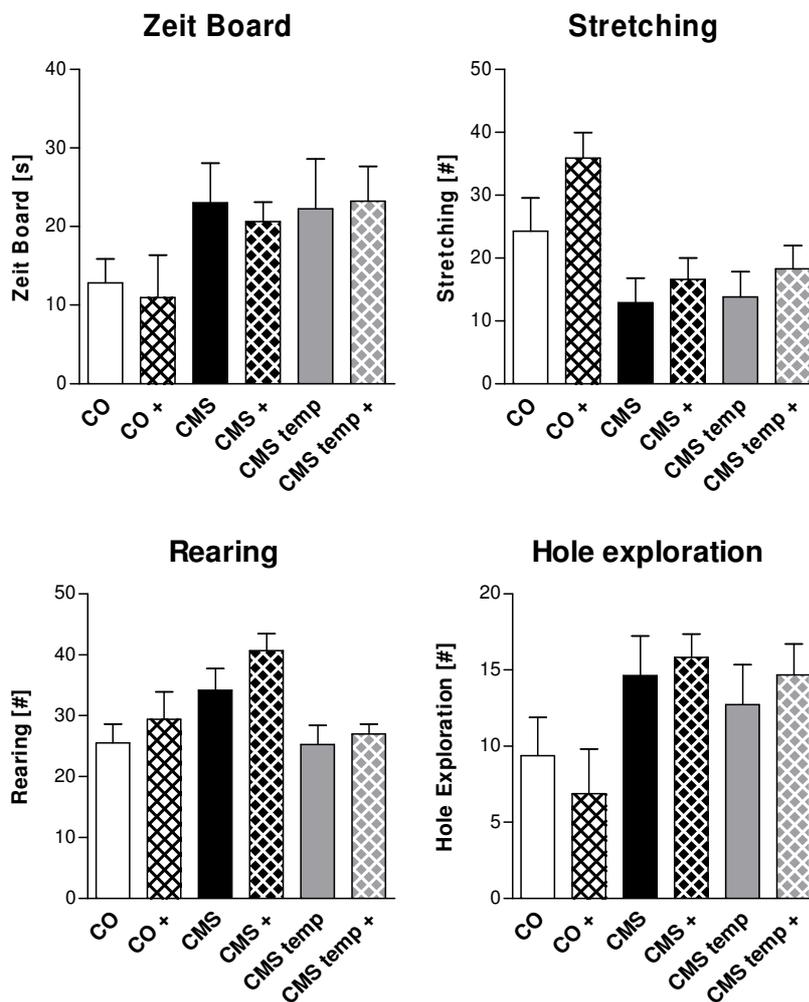
diesem (tendenziell) verringert ( $F_{1,33}=8,31$ ;  $p<0,01$  bzw.  $F_{1,33}=3,46$ ;  $p=0,07$ ). Bezüglich der lokomotorischen Aktivität zeigte sich ein Interaktionseffekt der Faktoren Stressgruppe x *Footshock* ( $F_{1,33}=4,85$ ;  $p<0,05$ ). So war der akute Stressor in der Lage, in CMS-Tieren die lokomotorische Aktivität tendenziell zu verringern ( $p=0,06$ ), was in Kontrolltieren nicht möglich war.

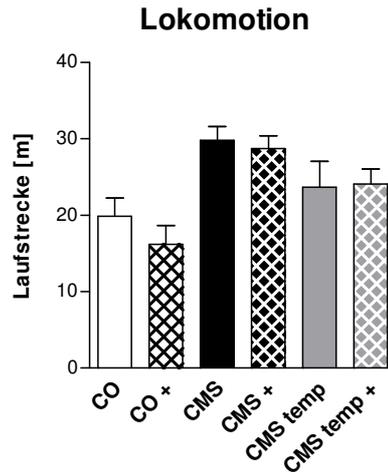


**Abbildung 5.10:** Verhaltenseffekte von akutem Stress (*Footshock*) im mHb-Test in Experiment 5 nach 8 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=8-10$ . +: *Footshock*

Verhaltenswirkungen von akutem Restraint Stress im mHb-Test von Experiment 6

Für zwei Stunden vor Beginn des mHb-Tests in Experiment 6 wurde ein Teil der Versuchsgruppen durch *Restraint Stress* akut gestresst. Auf keinen der fünf betrachteten Verhaltensparameter im nachfolgenden mHb-Test hatte dieser akute Stress einen signifikanten Einfluss. Auftretende Effekte des Faktors Stressprozedur (CO vs. CMS vs. CMS temp) wurden hier nicht betrachtet, da sie schon in Kapitel 5.3.1a) behandelt wurden.

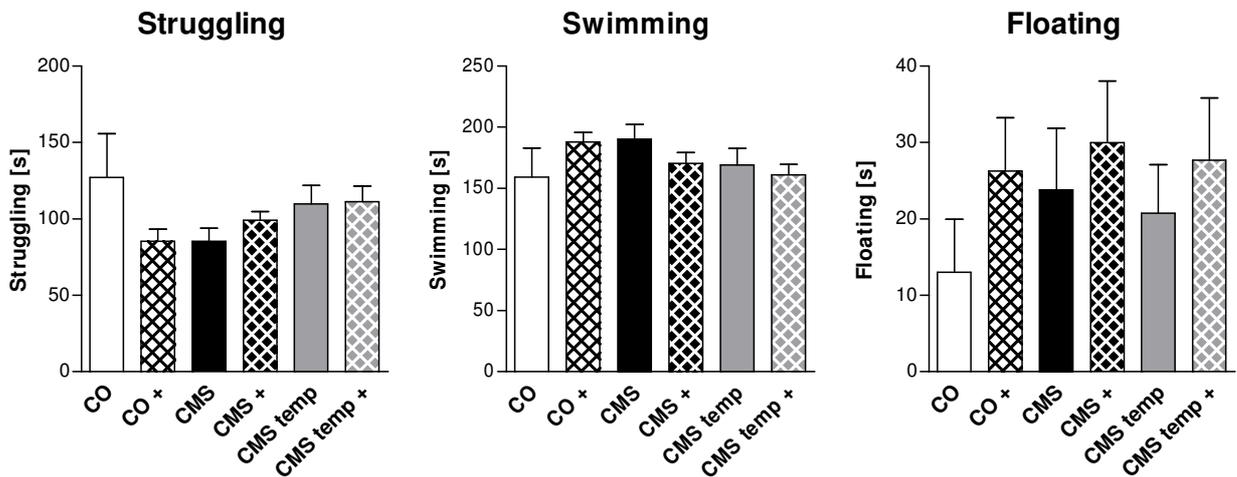




**Abbildung 5.11:** Verhaltenseffekte von akutem *Restraint Stress* im mHb-Test von Experiment 6. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=8-12$ . + *Restraint Stress*.

*Verhaltenseffekte von akutem Restraint Stress im Forced Swim Test von Experiment 6*

Analog zum vorhergehend beschriebenen Experiment wurde auch im FST von Experiment 6 akuter *Restraint Stress* in einem Teil der Versuchsgruppen angewandt. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die drei Verhaltensparameter des nachfolgenden FSTs, wie folgende Abbildung zeigt.

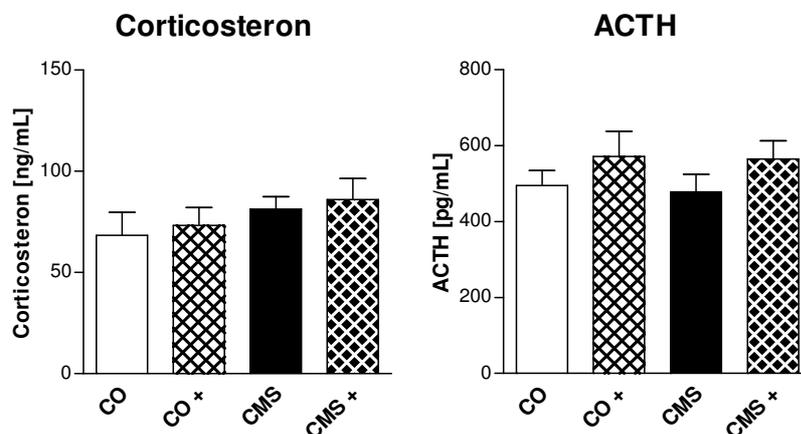


**Abbildung 5.12:** Verhaltenseffekte von akutem *Restraint Stress* im *Forced Swim Test* von Experiment 6. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=8-12$ . Auf keinen der drei gezeigten Verhaltensparameter hatte akuter Stress einen Effekt. + *Restraint Stress*

## b) Physiologische Parameter

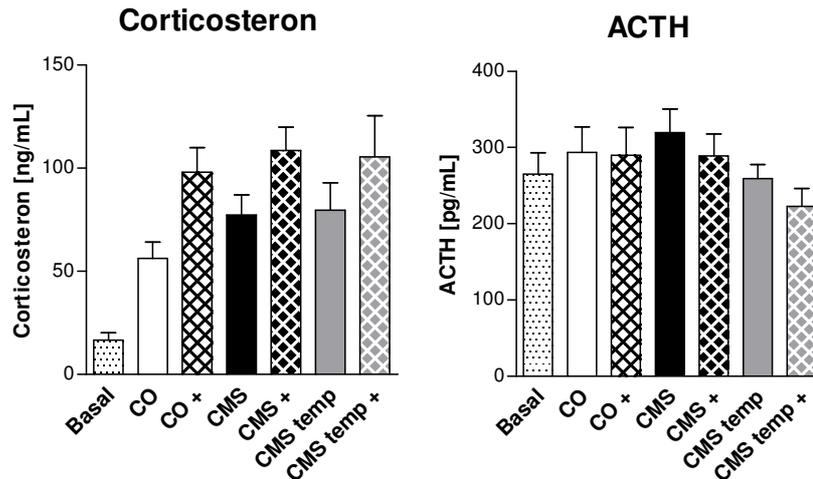
### Corticosteron und ACTH

Das in Experiment 5 nach dem mHb-Test gewonnenen Blut der Tiere wurde in den vier Versuchsgruppen auf die Plasmakonzentrationen von Corticosteron und ACTH hin untersucht. In den gemessenen Corticosteronkonzentrationen ergab sich kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. Akuter Stress in Form eines *Footshocks* zeigte eine leichte Tendenz ( $F_{1,33}=2,55$ ,  $p=0,120$ ), den ACTH-Spiegel in den getesteten Tieren (3h nach dessen Applikation) zu erhöhen.



**Abbildung 5.13:** Effekt von akutem Stress (*Footshock*, 3h vor Blutentnahme) und nachfolgendem mHb-Test auf Corticosteron- und ACTH-Plasmaspiegel der BL/6N-Tiere aus Experiment 5 nach 8 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=8-12$ . + *Footshock*

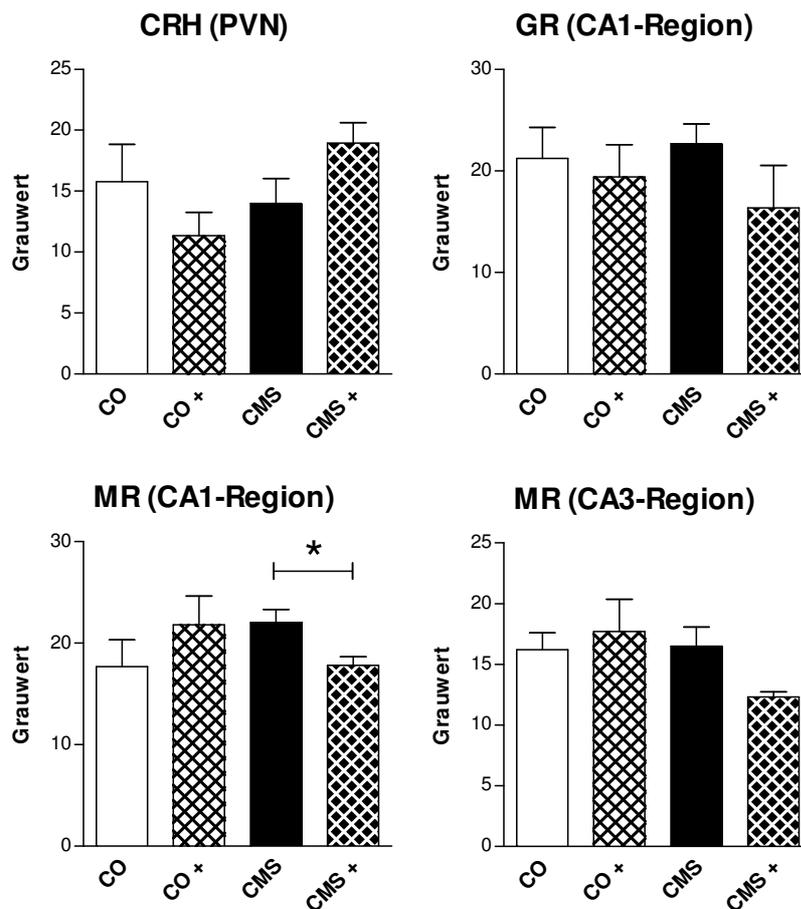
In Experiment 6 wurde vor dem finalen FST *Restraint Stress* als akuter Stressor angewandt, dessen Auswirkung in Kombination mit dem FST auf den Corticosteron- und ACTH-Plasmaspiegel der D2Jlco-Mäuse zum Tötungszeitpunkt in folgender Abbildung dargestellt ist. Akuter Stress bewirkte hierbei eine signifikante Erhöhung des Corticosteronplasmaspiegels ( $F_{1,56}=8,18$ ;  $p<0,01$ ) unabhängig von der Stressvorerfahrung. Auf die Konzentration von ACTH im Plasma der Tiere hatte er keinen Einfluss.



**Abbildung 5.14:** Effekt von akutem Stress (*Restraint Stress*) und nachfolgendem FST auf Corticosteron- und ACTH-Plasmaspiegel der D2Jlco-Tiere aus Experiment 6 (Blutentnahme 3h nach *Restraint Stress* und unmittelbar nach dem FST). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße n=8-12. + *Restraint Stress*

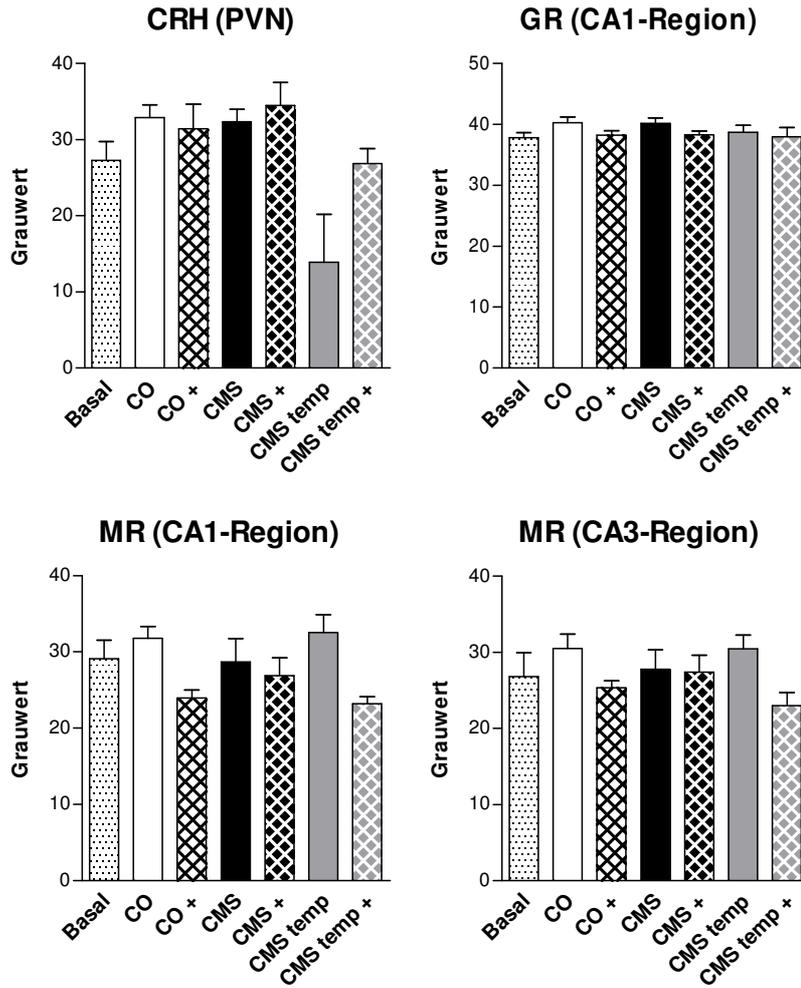
Expression der stressrelevanten Strukturen CRH, GR und MR in PVN bzw. Hippocampus

Auf keine der in folgender Abbildung gezeigten Zielstrukturen der Stressachse hatte akuter *Footshock* eine signifikante Auswirkung, jedoch zeigten sich leichte Tendenzen bei der Interaktion der Faktoren CMS x *Footshock* für CRH ( $F_{1,15}=4,21$ ;  $p=0,058$ ) und MR (CA1-Region:  $F_{1,14}=3,86$ ;  $p=0,070$  bzw. CA3-Region:  $F_{1,14}=2,91$ ;  $p=0,110$ ). Akuter *Footshock* zeigte in CMS-Tieren eine Tendenz zur Erhöhung der CRH-mRNA-Expression im PVN ( $p=0,10$ ), während diese in Kontrolltieren unbeeinflusst blieb. In den Hippocampusregionen CA1 und CA3 zeigte sich eine (tendenzielle) Erniedrigung der MR-mRNA-Expression durch akuten *Footshock* in CMS-Tieren (CA1-Region:  $p<0,05$ ; CA3-Region:  $p=0,05$ ), wohingegen diese in Kontrolltieren unbeeinflusst blieb.



**Abbildung 5.15:** mRNA-Expressionslevel von CRH, GR und MR in ausgewählten Hirnregionen der Stressachse der BL/6N-Tiere aus Experiment 5, 3h nach *Footshock Stress* und unmittelbar nach dem mHb nach 8 Wochen CMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße  $n=5$ . \*  $p<0,05$ ; + *Footshock*

Die gleichen Zielstrukturen wurden auch in Experiment 6 nach dem akuten Stressor (hier *Restraint Stress*) und dem FST als finalem Verhaltenstest untersucht. Zwar konnte in diesem Zusammenhang *Restraint Stress* weder die mRNA-Expression von CRH im PVN noch die von GR in der CA1-Region des Hippocampus verändern, jedoch wurde durch den akuten Stressor die mRNA-Konzentration von MR in der CA1- und CA3-Region signifikant verringert ( $F_{1,24}=16,09$ ;  $p<0,001$  bzw.  $F_{1,24}=7,90$ ;  $p<0,01$ ). In folgender Abbildung ist dies illustriert, die aufgeführte Basalgruppe dient nur als Anhaltspunkt und ging nicht in die statistische Auswertung mit ein.



**Abbildung 5.16:** mRNA-Expressionslevel von CRH, GR und MR in ausgewählten Hirnregionen der Stressachse der D2Jlco-Tiere aus Experiment 6, 3h nach *Restraint Stress* und unmittelbar nach dem FST. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße n=5. + *Restraint Stress*

## 5.4 Diskussion

Die Ergebnisse aus dem vorherigen Abschnitt zusammenfassend lässt sich feststellen, dass hinsichtlich des Konsumverhaltens der über 14 Wochen durchgängig angewandte CMS in D2Jlco-Mäusen keine Veränderung des Konsumverhaltens im Vergleich zum vorübergehenden und kürzeren (7 Wochen) CMS ergab. Ein ähnliches Bild zeichnet das Aussetzen des CMS in den weiteren Verhaltenstests: temporärer CMS hat lang andauernde Auswirkung auf den Phänotyp in Verhaltenstests und zeigt dort Charakteristika ähnlich durchgängigem CMS – auch hinsichtlich der Reaktivität auf akuten *Restraint Stress*.

Im mHb-Test zeigte – wenn auch nicht signifikant – der temporäre CMS auch nach 7 Wochen stressfreier Zeit eine Erniedrigung des Risikoabschätzungsverhaltens bzw. der Ängstlichkeit (*Stretching*, *Zeit Board*) wie durchgehender CMS. Eine lang anhaltende Verstärkung des Explorationsverhaltens oder der lokomotorischen Aktivität konnte in diesen Tieren nach der stressfreien Zeit jedoch nicht mehr festgestellt werden. Dies lässt deutlich werden, dass die Störungen des Risikoabschätzungsverhaltens noch lange Zeit über die Beendigung des CMS hinaus wirken, sich aber nicht mehr unmittelbar in gesteigerter Exploration und lokomotorischer Aktivität äußern. Diese Befunde werden in Verbindung mit Ergebnissen der anderen Experimente eher der Tatsache zugeschrieben, dass die entsprechende CMS-Behandlung bereits längere Zeit vorüber war (Ostrander et al., 2006), als ihrer mit sieben Wochen kürzeren Anwendung. Zusammen mit der Tendenz zu erhöhten Corticosteronwerten könnten diese Ergebnisse als gesteigerte Wahrnehmung der stressvollen Testsituation von CMS und CMS temp-Mäusen gedeutet werden, wie von Adriani und Laviola (2000) vorgeschlagen wurde. Auch wenn diese sich in CMS temp-Tieren nicht mehr in erhöhter lokomotorischer Aktivität äußerte, so könnten doch vermindertes *Stretching* und erhöhte *Zeit auf dem Board* zumindest als Komponente einer Hyperaktivität – nämlich als (hyper)aktiver Versuch, aus der Situation zu entkommen – aufgefasst werden (Exner & Clark, 1993), die selbst nach länger zurückliegender CMS-Erfahrung noch entscheidend die Verhaltensstrategie in einem neuen Paradigma mitbestimmt.

Die fehlenden Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen im FST und in den Stresshormonwerten unterstreichen die Interpretation, wonach keine depressionsassoziierten Auswirkungen von CMS gefunden werden konnten. Als weiterer nachhaltiger Effekt auch nur kürzeren und vorübergehenden Stresses wird – obwohl nicht durchgehend signifikant – die geringere Zunahme des Körpergewichts interpretiert. Die von Marti (1994) als mitverantwortlich für diese Entwicklung gefundene Anorexie

gestresster Tiere scheint Langzeitwirkung zu haben – selbst über das Ende der CMS-Prozedur hinaus.

Keiner der beiden verwendeten akuten Stressoren war in den betrachteten Experimenten in der Lage, kurzfristige Änderungen im Konsumverhalten zu bewirken, wie von van Dijken et al. gefunden wurde (1992). *Restraint Stress* hatte keinen Einfluss auf das Verhalten der Mäuse in den Tests von Experiment 6. *Footshock Stress* hingegen konnte in gestressten Tieren das gestörte Risikoabschätzungsverhalten wieder normalisieren und damit verbunden weiterhin das Explorationsverhalten und die lokomotorische Aktivität. Dies konnte für CMS-Tiere beobachtet werden und bestätigt insgesamt die Befunde von Quartermain et al. (1996). Die von Pijlman et al. (2003b) publizierten unterschiedlichen Effekte von physischen und emotionalen Stressoren auf das Verhalten der Tiere scheinen auch hier zuzutreffen, denn der eindeutig starke physische Stressor *Footshock* reduzierte als solcher die lokomotorische Aktivität. Um den bei Pijlman et al. (2003b) durch physischen Stress beeinflussten Konsum von süßer Lösung reproduzieren zu können, hätte möglicherweise das Messintervall verlängert werden müssen, so wie es in der Originalarbeit vorgesehen war, jedoch stand in der vorliegenden Arbeit eine zeitnahe Messung im 2h-Intervall (aus Gründen der Vergleichbarkeit) und die zusätzliche Erhebung von Hormondaten und molekularbiologischen Befunden im Vordergrund.

Akuter *Footshock* erhöhte in leichter Tendenz die Plasmaspiegel von ACTH, aktivierte somit zusätzlich die HPA-Achse, was durch tendenzielle Erhöhung von CRH im PVN von CMS-Tieren unterstrichen wurde. *Restraint Stress* vor dem FST hingegen zeigte ein anderes Aktivierungsmuster: dieser Stressor erhöhte länger anhaltend die Corticosteronkonzentration im Blut der Tiere und führte in deren Hippocampus zu einer verminderten Expression von Mineralocorticoidrezeptor-mRNA. Hierbei ist zu beachten, dass der Corticosteronwert nur die Stressreaktion auf den unmittelbar vorangegangenen Verhaltenstest (mHb bzw. FST) widerspiegelt. Um eine Aussage zum Akutstresseffekt (*Restraint Stress*) treffen zu können, war der Zeitpunkt der Blutentnahme mit einer Verzögerung von drei Stunden nach Stress eher (zu) spät gewählt (Cullinan et al., 1995). Er wurde trotzdem so vorgesehen, um einer geänderten Genexpression der betrachteten molekularen Zielstrukturen CRH, MR und GR genügend Zeit zu geben, um die Effekte des akuten Stressors widerspiegeln zu können (Cullinan et al., 1995). Zwar wurde eine Verringerung der MR-Expression im Hippocampus nach akutem Stress in der Literatur bereits beschrieben (Liberzon et al., 1999), jedoch ging diese dort mit einer Erniedrigung der GR-mRNA-Expression in allen Hippocampusregionen einher, was in der vorliegenden

Arbeit nicht festgestellt werden konnte. Angesichts der fehlenden Effekte von CMS oder akutem *Footshock Stress* auf die mRNA-Expression der untersuchten Zielstrukturen CRH, GR und MR und gegensätzlichen Ergebnissen aus anderen Studien (Paskitti et al., 2000) zeichnen die molekularbiologischen Befunde in diesem Kapitel kein einheitliches Bild. Da die individuelle Bedeutung der Ängstlichkeit – gar moduliert durch akuten Stress – eine wesentliche Rolle hinsichtlich der Corticoidrezeptorexpression zu spielen scheint (Jakovcevski et al., 2007), außerdem der Zeitverlauf der Expression berücksichtigt werden muss (Paskitti et al., 2000), ist eine verlässliche Interpretation der vorliegenden molekularbiologischen Daten ohne weitere Untersuchung nicht eindeutig möglich. Weiterhin ist zu vermuten, die Auswertemethode (*in situ* Hybridisierung bei einer Gruppengröße von n=5) beziehungsweise das Versuchsdesign könnte in dieser Hinsicht nicht differenziert genug gewesen sein (Akana et al., 1996). Die im vorherigen Abschnitt erwähnten Tendenzen einiger Stresseffekte auf molekularer Ebene lassen jedoch hoffen, bei einem größer angelegten Experiment eindeutige Ergebnisse zu erhalten.

Beide akuten Stressoren ziehen in Kombination mit dem mHb-Test bzw. mit dem FST als neuer Umgebung eine zusätzliche Aktivierung der HPA-Achse nach sich (erhöhte Corticosteron- bzw. tendenziell erhöhte ACTH-Konzentrationen im Blut), was dem CMS-Paradigma an sich auf lange Zeit in dieser Form nicht möglich war. In Hinblick auf die Modellentwicklung lässt das vermuten, dass zur langfristigen Auslenkung der HPA-Achse der Tiere die Verwendung von sowohl für die Tiere bis dato unbekanntem als auch stärkeren Stressoren von Vorteil sein könnte. Ganz klar würde das eine Abkehr von Chronisch *Mildem* Stress bedeuten.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass die robusten Effekte von CMS, die in der vorliegenden Arbeit mehrfach gefunden wurden (vermindertes Risikoabschätzungsverhalten und gesteigerte Lokomotion), längere Zeit über das Ende der Stressprozedur hinaus die Verhaltensstrategie der Mäuse in neuen Testumgebungen mitbestimmen. Dieses durch CMS beeinflusste Verhalten kann durch einmaligen *Footshock Stress* vor dem Verhaltenstest wieder normalisiert werden, nicht jedoch durch akuten *Restraint Stress*. Die Ergebnisse dieses Kapitels lassen daher hinsichtlich der Modellentwicklung vermuten, die Verwendung eines Stressprotokolls mit (auch stärkeren) Stressoren, die sich niemals wiederholen, könnte einen Erfolg versprechenden Ansatz darstellen. In welchem Verhältnis jedoch die damit erschwerte Suche nach systematischen Fehlerquellen und der technische Mehraufwand zum generierten Verhaltensphänotyp ständen, bedarf weiterer Untersuchung.

## 6 Schlussbetrachtung

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass das entwickelte CMS-Protokoll in der Lage war, einen eindeutig stressinduzierten Phänotyp auf Verhaltens- und physiologischer Ebene in den verwendeten Mausstämmen zu erzeugen. Eine Veränderung des Konsumverhaltens trat in den durchgeführten Versuchen nicht konsistent und lang anhaltend auf, was seine praktische Verwendung als (alleiniger) Parameter, der die Entwicklung eines anhedonie- und damit depressionsassoziierten Phänotyps anzeigt, stark einschränkt. Obwohl die verwendete Messmethode von Grund auf und in möglichst großer Analogie zur menschlichen Situation entwickelt wurde (auf Motivation und Hedonie ausgerichtet), scheint sie jedoch für den routinemäßigen Einsatz in der Praxis aufgrund großer Varianz und starker Abhängigkeit des Konsumverhaltens von der Gesamtaktivität der Tiere und des maßgeblichen Einflusses von aktivitätsverändernden Manipulationen auf das Konsumverhalten für den geplanten Einsatz nicht geeignet zu sein.

Eine Erhöhung des klassisch-angstbezogenen Verhaltens sowie von *Behavioural Despair* im FST – wie es in anderen Studien mit CMS gefunden wurde – konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Vielmehr deuten die hier generierten Ergebnisse einen auf Stress auch lang anhaltend hyperreaktiven Verhaltensphänotyp an, der möglicherweise einem spezifischen Subtypen der Depression in der Humanpathologie entsprechen könnte, was interessante weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet nahelegt. Es konnte gezeigt werden, dass der Verwendung des entsprechenden Mausstammes und der Zuchtlinie eine sehr hohe Bedeutung zukommt, was die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Fragestellung und Modellentwicklung relevant zeigt – zu divers jedoch die Befunde, um einen Mausstamm als den geeignetsten der hier betrachteten für die routinemäßige Verwendung in einem CMS-Protokoll empfehlen zu können. Die in der Einleitung erwähnten Kriterien für die Validierung als Depressionsmodell wurden in der Gesamtschau nicht (alle) erfüllt: eine „vernünftige“ Analogie zur Manifestation der Depressionssymptome im Menschen und objektiv zu verfolgende Verhaltensänderungen boten sowohl die Konzeption des CMS-Modells als auch die verwendeten Verhaltenstests. Hinsichtlich der pharmakologischen Behandlung, die in Tier und Mensch pathologische Verhaltensänderungen rückgängig machen soll, und der Reproduzierbarkeit konnte das untersuchte CMS-Protokoll jedoch nicht die Kriterien für ein Tiermodell für Depression erfüllen.

Ob daher der zu erwartende Erkenntnisgewinn zur Assoziation von CMS und depressionsbezogenen Phänomenen am Organismus Maus in der industriellen Praxis

den immensen Aufwand zur Weiterentwicklung des vorgestellten Protokolls rechtfertigt, darf selbst angesichts der euphorischen und omnipräsenten Verwendung von genetisch veränderten Mäusen in der Verhaltenspharmakologie bezweifelt werden.

Für die präklinische Forschung – und damit letztlich für den depressiven Patienten – bleibt weiterhin zu hoffen, Samuel Hahnemanns eingangs erwähnte pessimistische Einschätzung zur Tauglichkeit von Tiermodellen für Gemütsleiden möge nach über 200 Jahren endgültig widerlegt werden können.

## Anhang

### ➤ **Verwendete Lösungen zu molekularbiologischen Untersuchungen**

#### **NTP-Mix**

für 200  $\mu$ L: 20  $\mu$ L 100 mM ATP, 20  $\mu$ L 100 mM CTP, 20  $\mu$ L 100 mM GTP, 140  $\mu$ L  $H_2O_{dd}$ /DEPC

#### **4% PFA/PBS**

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

#### **10x PBS/DEPC**

für 2 L: 160 g NaCl, 4 g KCl, 28.2 g  $Na_2HPO_4$ , 4.8 g  $KH_2PO_4$ , mit  $H_2O_{dd}$  auf 2 L, DEPC-Behandlung, autoklavieren

#### **10x TEA**

für 1 L: 185.7 g Triethanolamin-HCl mit  $H_2O_{dd}$ /DEPC 1 L, keine DEPC-Behandlung

#### **20x SSC/DEPC**

für 2 L: 350.6 g NaCl, 88.2 g Na-Citrat- $2H_2O$  mit  $H_2O_{dd}$  auffüllen, DEPC-Behandlung, autoklavieren

#### **5x NTE**

für 1l: 146.1 g NaCl, 50 mL 1 M Tris-HCl pH 8.0, 50 mL 0.5 M EDTA, pH 8.0, mit  $H_2O_{dd}$  ansetzen, DEPC-Behandlung, autoklavieren

#### **5 M DTT**

für 10 mL: 7.72 g DL-Dithiothreitol mit  $H_2O_{dd}$ /DEPC 10 mL

#### **3 M $NH_4OAc$**

für 250 mL: 57.81 g  $NH_4OAc$  mit  $H_2O_{dd}$  250 mL, DEPC-Behandlung, autoklavieren

**1 M Tris-HCl pH 8.0**

für 250 mL: 39.4 g Tris-HCl mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> 250 mL, DEPC-Behandlung, autoklavieren

**0.5 M EDTA pH 8.0**

für 250 mL: 186.1 g Na<sub>2</sub>EDTA-2H<sub>2</sub>O in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, DEPC-Behandlung, autoklavieren

**30% EtOH/300 mM NH<sub>4</sub>OAc**

für 500 mL: 150 mL EtOH, 50 mL 3M NH<sub>4</sub>OAc, 300 mL H<sub>2</sub>O

**50% EtOH/300 mM NH<sub>4</sub>OAc**

für 500 mL: 250mL EtOH, 50 mL 3 M NH<sub>4</sub>OAc, 200 mL H<sub>2</sub>O

**70% EtOH/300 mM NH<sub>4</sub>OAc**

für 500 mL: 350 mL EtOH, 50 mL 3M NH<sub>4</sub>OAc, 100 mL H<sub>2</sub>O

**RNase A**

für 20 mL: 200 mg RNase A in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

**50% Dextransulfat**

für 50 mL: 25 g Dextransulfat unter Erhitzen in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>/DEPC lösen

**20% Sarcosyl (N-Laurocylsarcosin)**

für 100 mL: 20 g in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> lösen auf 100 mL auffüllen

**0.2 M Natriumphosphatpuffer**

35.6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

27.6 g NaHPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O

mit 1000 mL H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> lösen, pH 7

**Hybridisierungskammerflüssigkeit**

für 225 mL: 100 mL Formamid, 20 mL 20x SSC, 105 mL H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

**Hybridisierungsmix (cRNA-Proben)**

für 30 mL:

50% deionisiertes Formamid  
20 mM Tris-HCl (pH 8.0)  
300 mM NaCl  
5 mM EDTA (pH 8.0)  
10% Dextransulfat  
0.02% Ficoll 400  
0.02% Polyvinyl-Pyrrolidon  
0.02% BSA  
0.5 mg/mL tRNA (phenolextrahiert)  
0.2 mg/mL Heringssperma DNA (säurefragmentiert)  
200 mM DTT

**Hybridisierungscocktail (Oligonukleotid-Proben)**

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

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

## Literaturverzeichnis

- Adriani W, Laviola G, 2000. A unique hormonal and behavioral hyporesponsivity to both forced novelty and d-amphetamine in periadolescent mice. *Neuropharmacology* 39: 334-346.
- Aihara M, Ida I, Yuuki N, Oshima A, Kumano H, Takahashi K, Fukuda M, Oriuchi N, Endo K, Matsuda H, Mikuni M, 2007. HPA axis dysfunction in unmedicated major depressive disorder and its normalization by pharmacotherapy correlates with alteration of neural activity in prefrontal cortex and limbic/paralimbic regions. *Psychiatry Res.* 155: 245-256.
- Akana SF, Hanson ES, Horsley CJ, Strack AM, Bhatnagar S, Bradbury MJ, Milligan ED, Dallman MF, 1996. Clamped Corticosterone (B) Reveals the Effect of Endogenous B on Both Facilitated Responsivity to Acute Restraint and Metabolic Responses to Chronic Stress. *Stress.* 1: 33-49.
- Albrecht U, Sun ZS, Eichele G, Lee CC, 1997. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell* 91: 1055-1064.
- Anisman H, Lacosta S, Kent P, McIntyre DC, Merali Z, 1998a. Stressor-induced corticotropin-releasing hormone, bombesin, ACTH and corticosterone variations in strains of mice differentially responsive to stressors. *Stress.* 2: 209-220.
- Anisman H, Zaharia MD, Meaney MJ, Merali Z, 1998b. Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *Int. J Dev. Neurosci.* 16: 149-164.
- Antoni FA, 1986. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocr. Rev.* 7: 351-378.
- Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB, 1999. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J. Endocrinol.* 160: 1-12.
- Ayensu WK, Pucilowski O, Mason GA, Overstreet DH, Rezvani AH, Janowsky DS, 1995. Effects of chronic mild stress on serum complement activity, saccharin preference, and corticosterone levels in Flinders lines of rats. *Physiol Behav.* 57: 165-169.
- Azpiroz A, Fano E, Garmendia L, Arregi A, Cacho R, Beitia G, Brain PF, 1999. Effects of chronic mild stress (CMS) and imipramine administration, on spleen mononuclear cell proliferative response, serum corticosterone level and brain norepinephrine content in male mice. *Psychoneuroendocrinology* 24: 345-361.
- Bachmanov AA, Reed DR, Beauchamp GK, Tordoff MG, 2002. Food intake, water intake, and drinking spout side preference of 28 mouse strains. *Behav Genet.* 32: 435-443.
- Beck AT, 1972. *Depression: Causes and Treatment.* University of Pennsylvania Press.
- Benstaali C, Mailloux A, Bogdan A, Auzeby A, Touitou Y, 2001. Circadian rhythms of body temperature and motor activity in rodents their relationships with the light-dark cycle. *Life Sci.* 68: 2645-2656.
- Berridge CW, Waterhouse BD, 2003. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 42: 33-84.
- Berton O, Aguerre S, Sarrieau A, Mormede P, Chaouloff F, 1998. Differential effects of social stress on central serotonergic activity and emotional reactivity in Lewis and spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience.* 82: 147-159.
- Bhatnagar S, Dallman M, 1998. Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience.* 84: 1025-1039.
- Bielajew C, Konkle AT, Merali Z, 2002. The effects of chronic mild stress on male Sprague-Dawley and Long Evans rats: I. Biochemical and physiological analyses. *Behav Brain Res.* 136: 583-592.
- Brady JP, Thornton DR, De FD, 1962. Deleterious effects of anxiety elicited by conditioned pre-aversive stimuli in the rat. *Psychosom. Med.* 24:590-5.: 590-595.
- Breier A, 1989. A.E. Bennett award paper. Experimental approaches to human stress research: assessment of neurobiological mechanisms of stress in volunteers and psychiatric patients. *Biol. Psychiatry.* 26: 438-462.

- Brocco M, Dekeyne A, Veiga S, Girardon S, Millan MJ, 2002. Induction of hyperlocomotion in mice exposed to a novel environment by inhibition of serotonin reuptake. A pharmacological characterization of diverse classes of antidepressant agents. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71: 667-680.
- Burdan F, Chalas A, Szumilo J, 2006. [Cyclooxygenase and prostanoids--biological implications]. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online.)*. 60:129-41.: 129-141.
- Burke HM, Davis MC, Otte C, Mohr DC, 2005. Depression and cortisol responses to psychological stress: a meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*. 30: 846-856.
- Buskila D, Shnaider A, Neumann L, Lorber M, Zilberman D, Hilzenrat N, Kuperman OJ, Sikuler E, 1998. Musculoskeletal manifestations and autoantibody profile in 90 hepatitis C virus infected Israeli patients. *Semin. Arthritis Rheum.* 28: 107-113.
- Cancela LM, Bregonzio C, Molina VA, 1995. Anxiolytic-like effect induced by chronic stress is reversed by naloxone pretreatment. *Brain Res. Bull.* 36: 209-213.
- Casarotto PC, Andreatini R, 2007. Repeated paroxetine treatment reverses anhedonia induced in rats by chronic mild stress or dexamethasone. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 17: 735-742.
- Checkley S, 1996. The neuroendocrinology of depression and chronic stress. *Br. Med. Bull.* 52: 597-617.
- Chen C, Magee JC, Bazan NG, 2002. Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E2 signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity. *J Neurophysiol.* 87: 2851-2857.
- Choobineh A, Rajaeefard A, Neghab M, 2006. Problems related to shiftwork for health care workers at Shiraz University of Medical Sciences. *East Mediterr. Health J.* 12: 340-346.
- Cole BJ, Koob GF, 1994. Corticotropin-releasing factor and schedule-induced polydipsia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 47: 393-398.
- Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, Hitzemann RJ, Maxson SC, Miner LL, Silva AJ, Wehner JM, Wynshaw-Boris A, Paylor R, 1997. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl)* 132: 107-124.
- Crawley J, 2002. What's Wrong with My Mouse? Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice. *Genes, Brain and Behavior* 1: 131-134.
- Cryan JF, Holmes A, 2005. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4: 775-790.
- Cryan JF, Markou A, Lucki I, 2002. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol. Sci.* 23: 238-245.
- Cryan JF, Mombereau C, 2004. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol. Psychiatry*. 9: 326-357.
- Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ, 1995. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience*. 64: 477-505.
- Curtis AL, Valentino RJ, 1994. Corticotropin-releasing factor neurotransmission in locus coeruleus: a possible site of antidepressant action. *Brain Res. Bull.* 35: 581-587.
- D'Aquila PS, Brain P, Willner P, 1994. Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiol Behav.* 56: 861-867.
- D'Aquila PS, Newton J, Willner P, 1997. Diurnal variation in the effect of chronic mild stress on sucrose intake and preference. *Physiol Behav.* 62: 421-426.
- D'Este L, Casini A, Puglisi-Allegra S, Cabib S, Renda TG, 2007. Comparative immunohistochemical study of the dopaminergic systems in two inbred mouse strains (C57BL/6J and DBA/2J). *J Chem. Neuroanat.* 33: 67-74.
- David DJ, Renard CE, Jolliet P, Hascoet M, Bourin M, 2003. Antidepressant-like effects in various mice strains in the forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)* 166: 373-382.

- de Kloet ER, Oitzl MS, Joels M, 1999. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci.* 22: 422-426.
- de Kloet ER, Reul JM, Sutanto W, 1990. Corticosteroids and the brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 37: 387-394.
- de Kloet ER, Sibug RM, Helmerhorst FM, Schmidt MV, 2005. Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neurosci Biobehav Rev.* 29: 271-281.
- de Kloet ER, Van Acker SA, Sibug RM, Oitzl MS, Meijer OC, Rahmouni K, de JW, 2000. Brain mineralocorticoid receptors and centrally regulated functions. *Kidney Int.* 57: 1329-1336.
- de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M, 1998. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr. Rev.* 19: 269-301.
- De VJ, Schreiber R, 1997. The chronic mild stress depression model: future developments from a drug discovery perspective. *Psychopharmacology (Berl)* 134: 349-350.
- Deacon RM, Thomas CL, Rawlins JN, Morley BJ, 2007. A comparison of the behavior of C57BL/6 and C57BL/10 mice. *Behav Brain Res.* 179: 239-247.
- Dilling H, Mombour W, Schmidt M, 1994. Internationale Klassifikation psychischer Störungen: ICD-10. Huber.
- DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG, 2003. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J. Health Econ.* 22: 151-185.
- Ducottet C, Aubert A, Belzung C, 2004. Susceptibility to subchronic unpredictable stress is related to individual reactivity to threat stimuli in mice. *Behav Brain Res.* 155: 291-299.
- Ducottet C, Belzung C, 2004. Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice. *Physiol Behav.* 81: 417-426.
- Ducottet C, Belzung C, 2005. Correlations between behaviours in the elevated plus-maze and sensitivity to unpredictable subchronic mild stress: evidence from inbred strains of mice. *Behav Brain Res.* 156: 153-162.
- Ducottet C, Griebel G, Belzung C, 2003. Effects of the selective nonpeptide corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27: 625-631.
- El FS, Gharbi N, Kamoun A, Somody L, 2000. Vasopressin and A1 noradrenaline turnover during food or water deprivation in the rat. *Comp Biochem. Physiol C. Toxicol. Pharmacol.* 126: 129-137.
- Exner M, Clark D, 1993. Behaviour in the novel environment predicts responsiveness to d-amphetamine in the rat: a multivariate approach. *Behav Pharmacol.* 4: 47-56.
- File SE, Wardill AG, 1975. The reliability of the hole-board apparatus. *Psychopharmacologia.* 44: 47-51.
- Forbes NF, Stewart CA, Matthews K, Reid IC, 1996. Chronic mild stress and sucrose consumption: validity as a model of depression. *Physiol Behav.* 60: 1481-1484.
- Frantz S, 2004. Therapeutic area influences drug development costs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3: 466-467.
- Fries E, Hesse J, Hellhammer J, Hellhammer DH, 2005. A new view on hypocortisolism. *Psychoneuroendocrinology.* 30: 1010-1016.
- Fuchs E, Czeh B, Kole MH, Michaelis T, Lucassen PJ, 2004. Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 14 Suppl 5:S481-90.: S481-S490.
- Fuchs E, Flugge G, 2003. Chronic social stress: effects on limbic brain structures. *Physiol Behav.* 79: 417-427.
- Fujimi K, Noda K, Sasaki K, Wakisaka Y, Tanizaki Y, Iida M, Kiyohara Y, Kanba S, Iwaki T, 2007. Altered expression of COX-2 in subdivisions of the hippocampus during aging and in Alzheimer's disease: the Hisayama Study. *Dement. Geriatr. Cogn Disord.* 23: 423-431.

- Glendinning JI, Chyou S, Lin I, Onishi M, Patel P, Zheng KH, 2005. Initial licking responses of mice to sweeteners: effects of *tas1r3* polymorphisms. *Chem. Senses*. 30: 601-614.
- Gorka Z, Moryl E, Papp M, 1996. Effect of chronic mild stress on circadian rhythms in the locomotor activity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54: 229-234.
- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E, 1998. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95: 3168-3171.
- Govindarajan A, Rao BS, Nair D, Trinh M, Mawjee N, Tonegawa S, Chattarji S, 2006. Transgenic brain-derived neurotrophic factor expression causes both anxiogenic and antidepressant effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 13208-13213.
- Greetfeld M. Mechanismen der zentralen Stresshormonregulation – Der Einfluss von Stressexposition auf die Genexpression beteiligter Hormone und Rezeptoren. 2005. München, Ludwig-Maximilians-Universität. Ref Type: Thesis/Dissertation
- Griebel G, Belzung C, Perrault G, Sanger DJ, 2000. Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 148: 164-170.
- Griffiths J, Shanks N, Anisman H, 1992. Strain-specific alterations in consumption of a palatable diet following repeated stressor exposure. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 42: 219-227.
- Grippe AJ, Beltz TG, Johnson AK, 2003. Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. *Physiol Behav.* 78: 703-710.
- Gronli J, Bramham C, Murison R, Kanhema T, Fiske E, Bjorvatn B, Ursin R, Portas CM, 2006. Chronic mild stress inhibits BDNF protein expression and CREB activation in the dentate gyrus but not in the hippocampus proper. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 85: 842-849.
- Gutman DA, Nemeroff CB, 2002. Neurobiology of early life stress: rodent studies. *Semin. Clin Neuropsychiatry*. 7: 89-95.
- Harris RB, Mitchell TD, Simpson J, Redmann SM, Jr., Youngblood BD, Ryan DH, 2002. Weight loss in rats exposed to repeated acute restraint stress is independent of energy or leptin status. *Am. J Physiol Regul. Integr. Comp Physiol.* 282: R77-R88.
- Hastings M, O'Neill JS, Maywood ES, 2007. Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J. Endocrinol.* 195: 187-198.
- Hatcher JP, Bell DJ, Reed TJ, Hagan JJ, 1997. Chronic mild stress-induced reductions in saccharin intake depend upon feeding status. *J Psychopharmacol.* 11: 331-338.
- Heim C, Ehlert U, Hellhammer DH, 2000. The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders. *Psychoneuroendocrinology*. 25: 1-35.
- Hellhammer DH, Wade S, 1993. Endocrine correlates of stress vulnerability. *Psychother. Psychosom.* 60: 8-17.
- Herman JP, Cullinan WE, Ziegler DR, Tasker JG, 2002. Role of the paraventricular nucleus microenvironment in stress integration. *Eur. J. Neurosci.* 16: 381-385.
- Hilakivi LA, Lister RG, 1990. Correlations between behavior of mice in Porsolt's swim test and in tests of anxiety, locomotion, and exploration. *Behav Neural Biol.* 53: 153-159.
- Holmes A, Lachowicz JE, Sibley DR, 2004. Phenotypic analysis of dopamine receptor knockout mice; recent insights into the functional specificity of dopamine receptor subtypes. *Neuropharmacology* 47: 1117-1134.
- Holsboer F, 1999. The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. *J. Psychiatr. Res.* 33: 181-214.
- Holsboer F, 2001. Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J. Affect. Disord.* 62: 77-91.

- Houshyar H, Cooper ZD, Woods JH, 2001a. Paradoxical effects of chronic morphine treatment on the temperature and pituitary-adrenal responses to acute restraint stress: a chronic stress paradigm. *J Neuroendocrinol.* 13: 862-874.
- Houshyar H, Galigniana MD, Pratt WB, Woods JH, 2001b. Differential responsivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to glucocorticoid negative-feedback and corticotropin releasing hormone in rats undergoing morphine withdrawal: possible mechanisms involved in facilitated and attenuated stress responses. *J Neuroendocrinol.* 13: 875-886.
- Houshyar H, Gomez F, Manalo S, Bhargava A, Dallman MF, 2003. Intermittent morphine administration induces dependence and is a chronic stressor in rats. *Neuropsychopharmacology.* 28: 1960-1972.
- Ikemura R, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M, 2004. Involvement of endogenous vasopressin in high plasma osmolality-induced anorexia via V1 receptor-mediated mechanism. *J Vet. Med. Sci.* 66: 951-955.
- Insel TR, Charney DS, 2003. Research on major depression: strategies and priorities. *JAMA* 289: 3167-3168.
- Jacobson LH, Cryan JF, 2007. Feeling strained? Influence of genetic background on depression-related behavior in mice: a review. *Behav Genet.* 37: 171-213.
- Jakovcevski M, Schachner M, Morellini F, 2007. Individual variability in the stress response of C57BL/6J male mice correlates with trait anxiety. *Genes Brain Behav.*
- Jones BC, Sarrieau A, Reed CL, Azar MR, Mormede P, 1998. Contribution of sex and genetics to neuroendocrine adaptation to stress in mice. *Psychoneuroendocrinology.* 23: 505-517.
- Joyner A, 2000. *Gene Targeting: A Practical Approach.* Oxford University Press, USA.
- Kaneko SY, Maeda T, Sasaki A, Sato A, Tanaka K, Kobayashi T, Tanaka M, Fukushima T, 2004. Effect of shift work on mental state of factory workers. *Fukushima J Med. Sci.* 50: 1-9.
- Kang M, Pyun KH, Jang CG, Kim H, Bae H, Shim I, 2005. Nelumbinis Semen reverses a decrease in hippocampal 5-HT release induced by chronic mild stress in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 57: 651-656.
- Kant GJ, Anderson SM, Dhillon GS, Mougey EH, 1988. Neuroendocrine correlates of sustained stress: the activity-stress paradigm. *Brain Res. Bull.* 20: 407-414.
- Kant GJ, Mougey EH, Meyerhoff JL, 1989. ACTH, prolactin, corticosterone and pituitary cyclic AMP responses to repeated stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32: 557-561.
- Kaplan H, Sadock B, 1998. *Synopsis of Psychiatry: Behavioral Sciences: Clinical Psychiatry.* Williams & Wilkins.
- Katz RJ, 1982. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 16: 965-968.
- Katz RJ, 1981. Animal models and human depressive disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 5: 231-246.
- Keeney AJ, Hogg S, 1999. Behavioural consequences of repeated social defeat in the mouse: preliminary evaluation of a potential animal model of depression. *Behav Pharmacol.* 10: 753-764.
- Konkle AT, Baker SL, Kentner AC, Barbagallo LS, Merali Z, Bielajew C, 2003. Evaluation of the effects of chronic mild stressors on hedonic and physiological responses: sex and strain compared. *Brain Res.* 992: 227-238.
- Koob GF, 1999. Corticotropin-releasing factor, norepinephrine, and stress. *Biol. Psychiatry.* 46: 1167-1180.
- Koolhaas JM, Meerlo P, De Boer SF, Strubbe JH, Bohus B, 1997. The temporal dynamics of the stress response. *Neurosci Biobehav Rev.* 21: 775-782.
- Kotlus BS, Blizard DA, 1998. Measuring gustatory variation in mice: a short-term fluid-intake test. *Physiol Behav.* 64: 37-47.
- Kozlovsky N, Matar MA, Kaplan Z, Kotler M, Zohar J, Cohen H, 2007. Long-term down-regulation of BDNF mRNA in rat hippocampal CA1 subregion correlates with PTSD-like behavioural stress response. *Int. J Neuropsychopharmacol.* 10: 741-758.

- Kudryavtseva NN, Bakshtanovskaya IV, Koryakina LA, 1991. Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 38: 315-320.
- Kvetnansky R, Fukuhara K, Pacak K, Cizza G, Goldstein DS, Kopin IJ, 1993. Endogenous glucocorticoids restrain catecholamine synthesis and release at rest and during immobilization stress in rats. *Endocrinology.* 133: 1411-1419.
- Lakoff A, 2002. The mousetrap: managing the placebo effect in antidepressant trials. *Mol. Interv.* 2: 72-76.
- Lee KJ, Kim SJ, Kim SW, Choi SH, Shin YC, Park SH, Moon BH, Cho E, Lee MS, Choi SH, Chun BG, Shin KH, 2006. Chronic mild stress decreases survival, but not proliferation, of new-born cells in adult rat hippocampus. *Exp. Mol. Med.* 38: 44-54.
- Leonard BE, 2007. Inflammation, depression and dementia: are they connected? *Neurochem. Res.* 32: 1749-1756.
- Levine S, Ursin H, 2004 What is Stress? In: Brown, M., Koob, G. (Eds.), *Stress: Neurobiology and Neuroendocrinology.* Marcel Dekker, New York, pp. 3-21.
- Lewis SR, Ahmed S, Dym C, Khaimova E, Kest B, Bodnar RJ, 2005. Inbred mouse strain survey of sucrose intake. *Physiol Behav.* 85: 546-556.
- Li S, Wang C, Wang M, Li W, Matsumoto K, Tang Y, 2007a. Antidepressant like effects of piperine in chronic mild stress treated mice and its possible mechanisms. *Life Sci.* 80: 1373-1381.
- Li XH, Liu NB, Zhang MH, Zhou YL, Liao JW, Liu XQ, Chen HW, 2007b. Effects of chronic multiple stress on learning and memory and the expression of Fyn, BDNF, TrkB in the hippocampus of rats. *Chin Med. J (Engl. ).* 120: 669-674.
- Liberzon I, Lopez JF, Flagel SB, Vazquez DM, Young EA, 1999. Differential regulation of hippocampal glucocorticoid receptors mRNA and fast feedback: relevance to post-traumatic stress disorder. *J Neuroendocrinol.* 11: 11-17.
- Linthorst AC, Reul JM, 1998. Brain neurotransmission during peripheral inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 840:139-52.: 139-152.
- Liu X, Gershenfeld HK, 2001. Genetic differences in the tail-suspension test and its relationship to imipramine response among 11 inbred strains of mice. *Biol. Psychiatry* 49: 575-581.
- Loas G, 1996. Vulnerability to depression: a model centered on anhedonia. *J. Affect. Disord.* 41: 39-53.
- Lowry PJ, Estivariz FE, Gillies GE, Kruseman AC, Linton EA, 1986. CRF: its regulation of ACTH and pro-opiomelanocortin peptide release and its extra hypothalamic occurrence. *Acta Endocrinol. Suppl (Copenh)* 276: 56-62.
- Lucki I, Dalvi A, Mayorga AJ, 2001. Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. *Psychopharmacology (Berl).* 155: 315-322.
- Marin MT, Cruz FC, Planeta CS, 2007. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol Behav.* 90: 29-35.
- Marti O, Marti J, Armario A, 1994. Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol Behav.* 55: 747-753.
- Matthews K, Forbes N, Reid IC, 1995. Sucrose consumption as an hedonic measure following chronic unpredictable mild stress. *Physiol Behav.* 57: 241-248.
- Maywood ES, O'Neill JS, Chesham JE, Hastings MH, 2007. Minireview: The Circadian Clockwork of the Suprachiasmatic Nuclei Analysis of a Cellular Oscillator that Drives Endocrine Rhythms. *Endocrinology* 148: 5624-5634.
- McEwen BS, 2001. Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 933: 265-277.
- McKinney WT, Jr., Bunney WE, Jr., 1969. Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. *Arch. Gen. Psychiatry* 21: 240-248.

- Meerlo P, Sgoifo A, De Boer SF, Koolhaas JM, 1999. Long-lasting consequences of a social conflict in rats: behavior during the interaction predicts subsequent changes in daily rhythms of heart rate, temperature, and activity. *Behav. Neurosci.* 113: 1283-1290.
- Mhyre TR, Chesler EJ, Thiruchelvam M, Lungu C, Cory-Slechta DA, Fry JD, Richfield EK, 2005. Heritability, correlations and in silico mapping of locomotor behavior and neurochemistry in inbred strains of mice. *Genes Brain Behav.* 4: 209-228.
- Millstein RA, Holmes A, 2007. Effects of repeated maternal separation on anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strains. *Neurosci Biobehav Rev.* 31: 3-17.
- Minematsu S, Hiruta M, Watanabe M, Amagaya S, 1995. Spectral analysis of body weight, food and water consumption and spontaneous motor activity in male Sprague-Dawley rats. *Exp. Anim.* 44: 173-179.
- Mineur YS, Belzung C, Crusio WE, 2006. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behav Brain Res.* 175: 43-50.
- Mineur YS, Prasol DJ, Belzung C, Crusio WE, 2003. Agonistic behavior and unpredictable chronic mild stress in mice. *Behav Genet.* 33: 513-519.
- Minor TR, Dess NK, Ben-David E, Chang WC, 1994. Individual differences in vulnerability to inescapable shock in rats. *J. Exp. Psychol. Anim Behav. Process* 20: 402-412.
- Mizoguchi K, Ishige A, Aburada M, Tabira T, 2003. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience.* 119: 887-897.
- Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH, Tabira T, 2001. Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats. *Psychoneuroendocrinology.* 26: 443-459.
- Monleon S, D'Aquila P, Parra A, Simon VM, Brain PF, Willner P, 1995. Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. *Psychopharmacology (Berl).* 117: 453-457.
- Moreau JL, Jenck F, Martin JR, Mortas P, Haefely WE, 1992. Antidepressant treatment prevents chronic unpredictable mild stress-induced anhedonia as assessed by ventral tegmentum self-stimulation behavior in rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2: 43-49.
- Moreau JL, Scherschlicht R, Jenck F, Martin JR, 1995. Chronic mild stress-induced anhedonia model of depression; sleep abnormalities and curative effects of electroshock treatment. *Behav Pharmacol.* 6: 682-687.
- Mornagui B, Grissa A, Duvareille M, Gharib C, Kamoun A, El-Fazaa S, Gharbi N, 2006. Vasopressin and nitric oxide synthesis after three days of water or food deprivation. *Acta Biol. Hung.* 57: 1-11.
- Muller N, Schwarz MJ, Dehning S, Douhe A, Ceroveckı A, Goldstein-Muller B, Spellmann I, Hetzel G, Maino K, Kleindienst N, Moller HJ, Arolt V, Riedel M, 2006. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine. *Mol. Psychiatry.* 11: 680-684.
- Munoz C, Papp M, 1999. Alnespirone (S 20499), an agonist of 5-HT1A receptors, and imipramine have similar activity in a chronic mild stress model of depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 63: 647-653.
- Murison R, Hansen A, 2001. Reliability of the Chronic Mild Stress paradigm: Implications for research and animal welfare. *Integrative Psychological and Behavioral Science* 36: 266-274.
- Nemeroff CB, Vale WW, 2005. The neurobiology of depression: inroads to treatment and new drug discovery. *J. Clin. Psychiatry* 66 Suppl 7: 5-13.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM, 2002. Neurobiology of depression. *Neuron* 34: 13-25.
- Ng GY, O'Dowd BF, George SR, 1994. Genotypic differences in brain dopamine receptor function in the DBA/2J and C57BL/6J inbred mouse strains. *Eur. J Pharmacol.* 269: 349-364.
- Nielsen CK, Arnt J, Sanchez C, 2000. Intracranial self-stimulation and sucrose intake differ as hedonic measures following chronic mild stress: interstrain and interindividual differences. *Behav Brain Res.* 107: 21-33.

- Ohl F, Sillaber I, Binder E, Keck ME, Holsboer F, 2001a. Differential analysis of behavior and diazepam-induced alterations in C57BL/6N and BALB/c mice using the modified hole board test. *J. Psychiatr. Res.* 35: 147-154.
- Ohl F, Toschi N, Wigger A, Henniger MS, Landgraf R, 2001b. Dimensions of emotionality in a rat model of innate anxiety. *Behav. Neurosci.* 115: 429-436.
- Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Choi DC, Richtand NM, Herman JP, 2006. Hypoactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress. *Endocrinology* 147: 2008-2017.
- Overmier JB, 1968. Differential Pavlovian fear conditioning as a function of the qualitative nature of the UCS: constant versus pulsating shock. *Cond. Reflex.* 3: 175-180.
- Overmier JB, Seligman ME, 1967. Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. *J. Comp Physiol Psychol.* 63: 28-33.
- Pacak K, 2000. Stressor-specific activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Physiol Res.* 49 Suppl 1: S11-S17.
- Pacak K, Kvetnansky R, Palkovits M, Fukuhara K, Yadid G, Kopin IJ, Goldstein DS, 1993. Adrenalectomy augments in vivo release of norepinephrine in the paraventricular nucleus during immobilization stress. *Endocrinology.* 133: 1404-1410.
- Pare WP, 1965. Stress and consummatory behavior in the albino rat. *Psychol. Rep.* 16:399-405.: 399-405.
- Pare WP, 1964. The effect of chronic environmental stress on stomach ulceration, adrenal function, and consummatory behaviour in the rat. *J Psychol.* 57:143-51.: 143-151.
- Paskitti ME, McCreary BJ, Herman JP, 2000. Stress regulation of adrenocorticosteroid receptor gene transcription and mRNA expression in rat hippocampus: time-course analysis. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 80: 142-152.
- Pavcovich LA, Valentino RJ, 1997. Regulation of a putative neurotransmitter effect of corticotropin-releasing factor: effects of adrenalectomy. *J Neurosci.* 17: 401-408.
- Pecina S, Cagniard B, Berridge KC, Aldridge JW, Zhuang X, 2003. Hyperdopaminergic mutant mice have higher "wanting" but not "liking" for sweet rewards. *J Neurosci.* 23: 9395-9402.
- Pijlman FT, Herremans AH, van de KJ, Kruse CG, van Ree JM, 2003a. Behavioural changes after different stress paradigms: prepulse inhibition increased after physical, but not emotional stress. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 13: 369-380.
- Pijlman FT, van Ree JM, 2002. Physical but not emotional stress induces a delay in behavioural coping responses in rats. *Behav Brain Res.* 136: 365-373.
- Pijlman FT, Wolterink G, van Ree JM, 2003b. Physical and emotional stress have differential effects on preference for saccharine and open field behaviour in rats. *Behav Brain Res.* 139: 131-138.
- Pothion S, Bizot JC, Trovero F, Belzung C, 2004. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behav Brain Res.* 155: 135-146.
- Przegalinski E, Moryl E, Papp M, 1995. The effect of 5-HT<sub>1A</sub> receptor ligands in a chronic mild stress model of depression. *Neuropharmacology* 34: 1305-1310.
- Pucilowski O, Overstreet DH, Rezvani AH, Janowsky DS, 1993. Chronic mild stress-induced anhedonia: greater effect in a genetic rat model of depression. *Physiol Behav.* 54: 1215-1220.
- Quartermain D, Stone EA, Charbonneau G, 1996. Acute stress disrupts risk assessment behavior in mice. *Physiol Behav.* 59: 937-940.
- Reser JE, 2007. Schizophrenia and phenotypic plasticity: schizophrenia may represent a predictive, adaptive response to severe environmental adversity that allows both bioenergetic thrift and a defensive behavioral strategy. *Med. Hypotheses.* 69: 383-394.
- Ressler KJ, Nemeroff CB, 2000. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depress. Anxiety.* 12 Suppl 1: 2-19.

- Reul JM, de Kloet ER, 1985. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117: 2505-2511.
- Reul JM, Gesing A, Droste S, Stec IS, Weber A, Bachmann C, Bilanz-Bleuel A, Holsboer F, Linthorst AC, 2000. The brain mineralocorticoid receptor: greedy for ligand, mysterious in function. *Eur. J. Pharmacol.* 405: 235-249.
- Reul JM, van den Bosch FR, de Kloet ER, 1987. Relative occupation of type-I and type-II corticosteroid receptors in rat brain following stress and dexamethasone treatment: functional implications. *J. Endocrinol.* 115: 459-467.
- Ribeiro-Silva F, Rotenberg L, Soares RE, Pessanha J, Ferreira FL, Oliveira P, Silva-Costa A, edito-Silva AA, 2006. Sleep on the job partially compensates for sleep loss in night-shift nurses. *Chronobiol. Int.* 23: 1389-1399.
- Riera CE, Vogel H, Simon SA, le CJ, 2007. Artificial sweeteners and salts producing a metallic taste sensation activate TRPV1 receptors. *Am. J Physiol Regul. Integr. Comp Physiol.* 293: R626-R634.
- Ripoll N, David DJ, Dailly E, Hascoet M, Bourin M, 2003. Antidepressant-like effects in various mice strains in the tail suspension test. *Behav. Brain Res.* 143: 193-200.
- Salamone JD, Correa M, 2002. Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behav Brain Res.* 137: 3-25.
- Sanchez C, 1997. Acute stress enhances anxiolytic-like drug responses of mice tested in a black and white test box. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 7: 283-288.
- Saß H, Houben I, 1996. Diagnostisches und statistisches Manual psychischer Störungen DSM-IV. Hogrefe Verl. für Psychologie.
- Schoenecker B, Heller KE, Freimanis T, 2000. Development of stereotypies and polydipsia in wild caught bank voles (*Clethrionomys glareolus*) and their laboratory-bred offspring. Is polydipsia a symptom of diabetes mellitus? *Appl. Anim Behav Sci.* 68: 349-357.
- Sclafani A, 2006. Sucrose motivation in sweet "sensitive" (C57BL/6J) and "subsensitive" (129P3/J) mice measured by progressive ratio licking. *Physiol Behav.* 87: 734-744.
- Secretion F, Conjur GS, Attitude SP, 1998. Interviews with the dead. Using meta-life qualitative analysis to validate Hippocrates' theory of humours. *CMAJ.* 159: 1472-1473.
- Selye H, 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138: 32.
- Settle EC, Jr., 1998. Antidepressant drugs: disturbing and potentially dangerous adverse effects. *J. Clin. Psychiatry* 59 Suppl 16: 25-30.
- Shaffery J, Hoffmann R, Armitage R, 2003. The neurobiology of depression: perspectives from animal and human sleep studies. *Neuroscientist.* 9: 82-98.
- Shanks N, Anisman H, 1989. Strain-specific effects of antidepressants on escape deficits induced by inescapable shock. *Psychopharmacology (Berl).* 99: 122-128.
- Shanks N, Anisman H, 1988. Stressor-provoked behavioral changes in six strains of mice. *Behav Neurosci.* 102: 894-905.
- Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW, 1996. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93: 3908-3913.
- Shen Y, Connor TJ, Nolan Y, Kelly JP, Leonard BE, 1999. Differential effect of chronic antidepressant treatments on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavioural symptoms in the rat. *Life Sci.* 65: 1773-1786.
- Sherman AD, Petty F, 1982. Additivity of neurochemical changes in learned helplessness and imipramine. *Behav. Neural Biol.* 35: 344-353.
- Siegmund A. Spuren eines Traumas - Die Entwicklung eines Tiermodells der Posttraumatischen Belastungsstörung. 2006. Phillips-Universität Marburg. Dissertation

- Silberman DM, Wald M, Genaro AM, 2002. Effects of chronic mild stress on lymphocyte proliferative response. Participation of serum thyroid hormones and corticosterone. *Int. Immunopharmacol.* 2: 487-497.
- Skuse D, Albanese A, Stanhope R, Gilmour J, Voss L, 1996. A new stress-related syndrome of growth failure and hyperphagia in children, associated with reversibility of growth-hormone insufficiency. *Lancet.* 348: 353-358.
- Smith GP, Bourbonais KA, Jerome C, Simansky KJ, 1987. Sham feeding of sucrose increases the ratio of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid to dopamine in the hypothalamus. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 26: 585-591.
- Steckler T, Holsboer F, Reul JM, 1999. Glucocorticoids and depression. *Baillieres Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab* 13: 597-614.
- Steimer T, Python A, Schulz PE, Aubry JM, 2007. Plasma corticosterone, dexamethasone (DEX) suppression and DEX/CRH tests in a rat model of genetic vulnerability to depression. *Psychoneuroendocrinology* 32: 575-579.
- Strekalova T, Gorenkova N, Schunk E, Dolgov O, Bartsch D, 2006. Selective effects of citalopram in a mouse model of stress-induced anhedonia with a control for chronic stress. *Behav Pharmacol.* 17: 271-287.
- Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, Henn FA, Gass P, 2004. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology.* 29: 2007-2017.
- Strekalova T, Spanagel R, Dolgov O, Bartsch D, 2005. Stress-induced hyperlocomotion as a confounding factor in anxiety and depression models in mice. *Behav Pharmacol.* 16: 171-180.
- Sullivan R, Wilson DA, Feldon J, Yee BK, Meyer U, Richter-Levin G, Avi A, Michael T, Gruss M, Bock J, Helmeke C, Braun K, 2006. The International Society for Developmental Psychobiology annual meeting symposium: Impact of early life experiences on brain and behavioral development. *Dev. Psychobiol.* 48: 583-602.
- Swiergiel AH, Leskov IL, Dunn AJ, 2008. Effects of chronic and acute stressors and CRF on depression-like behavior in mice. *Behav Brain Res.* 186: 32-40.
- Takahashi S, Yokota S, Hara R, Kobayashi T, Akiyama M, Moriya T, Shibata S, 2001. Physical and inflammatory stressors elevate circadian clock gene *mPer1* mRNA levels in the paraventricular nucleus of the mouse. *Endocrinology* 142: 4910-4917.
- Tecott LH, 2003. The genes and brains of mice and men. *Am. J. Psychiatry* 160: 646-656.
- Tordoff MG, Bachmanov AA, 2002. Influence of test duration on the sensitivity of the two-bottle choice test. *Chem. Senses* 27: 759-768.
- Tsigos C, Chrousos GP, 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom. Res.* 53: 865-871.
- Valentino RJ, Curtis AL, 1991. Antidepressant interactions with corticotropin-releasing factor in the noradrenergic nucleus locus coeruleus. *Psychopharmacol. Bull.* 27: 263-269.
- Valentino RJ, Curtis AL, Parris DG, Wehby RG, 1990. Antidepressant actions on brain noradrenergic neurons. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 253: 833-840.
- Valverde O, Smadja C, Roques BP, Maldonado R, 1997. The attenuation of morphine-conditioned place preference following chronic mild stress is reversed by a CCKB receptor antagonist. *Psychopharmacology (Berl)* 131: 79-85.
- van Dijken HH, Mos J, van der Heyden JA, Tilders FJ, 1992. Characterization of stress-induced long-term behavioural changes in rats: evidence in favor of anxiety. *Physiol Behav.* 52: 945-951.
- van Praag HM, 2004. Can stress cause depression? *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 28: 891-907.
- van Raaij MT, Dobbe CJ, Elvers B, Timmerman A, Schenk E, Oortgiesen M, Wiegant VM, 1997. Hormonal status and the neuroendocrine response to a novel heterotypic stressor involving subchronic noise exposure. *Neuroendocrinology.* 65: 200-209.

- Van HB, Egle UT, 2004. Fibromyalgia: a stress disorder? Piecing the biopsychosocial puzzle together. *Psychother. Psychosom.* 73: 267-275.
- Vergne DE, Nemeroff CB, 2006. The interaction of serotonin transporter gene polymorphisms and early adverse life events on vulnerability for major depression. *Curr. Psychiatry Rep.* 8: 452-457.
- Vishwanath BS, Frey FJ, Bradbury MJ, Dallman MF, Frey BM, 1993. Glucocorticoid deficiency increases phospholipase A2 activity in rats. *J Clin Invest.* 92: 1974-1980.
- Vollmayr B, Henn FA, 2001. Learned helplessness in the rat: improvements in validity and reliability. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 8: 1-7.
- Vollmayr B, Simonis C, Weber S, Gass P, Henn F, 2003. Reduced cell proliferation in the dentate gyrus is not correlated with the development of learned helplessness. *Biol. Psychiatry* 54: 1035-1040.
- Weinstock M, 1997. Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Neurosci Biobehav Rev.* 21: 1-10.
- Weiss JM, 1997. Does decreased sucrose intake indicate loss of preference in CMS model? *Psychopharmacology (Berl).* 134: 368-370.
- West CH, Weiss JM, 2006. Intake of ethanol and reinforcing fluids in rats bred for susceptibility to stress. *Alcohol.* 38: 13-27.
- Whitnall MH, 1993. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog. Neurobiol.* 40: 573-629.
- Willner P, 1984. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 83: 1-16.
- Willner P, 2005. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology.* 52: 90-110.
- Willner P, 1997. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl).* 134: 319-329.
- Willner P, Moreau JL, Nielsen CK, Papp M, Sluzewska A, 1996. Decreased hedonic responsiveness following chronic mild stress is not secondary to loss of body weight. *Physiol Behav.* 60: 129-134.
- Willner P, Muscat R, Papp M, 1992. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 16: 525-534.
- Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R, 1987. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl).* 93: 358-364.
- Wise RA, 2004. Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev Neurosci.* 5: 483-494.
- Wong ML, Licinio J, 2004. From monoamines to genomic targets: a paradigm shift for drug discovery in depression. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3: 136-151.
- Yirmiya R, Lieblich I, Liebeskind JC, 1988. Reduced saccharin preference in CXBK (opioid receptor-deficient) mice. *Brain Res.* 438: 339-342.
- Young EA, Abelson JL, Cameron OG, 2004. Effect of comorbid anxiety disorders on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to a social stressor in major depression. *Biol. Psychiatry.* 56: 113-120.
- Zacharko RM, Anisman H, 1991. Stressor-induced anhedonia in the mesocorticolimbic system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 15: 391-405.
- Zelena D, Haller J, Halasz J, Makara GB, 1999. Social stress of variable intensity: physiological and behavioral consequences. *Brain Res. Bull.* 48: 297-302.

## Danksagung

Mein erster und größter Dank in Verbindung mit der vorliegenden Arbeit geht an meine Betreuerin Dr. Inge Sillaber, ohne deren hervorragende Anleitung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich danke ihr für die Erweiterung meines wissenschaftlichen Horizonts, die Ermöglichung eines freien Arbeitsstils, die Herstellung von wertvollen Kontakten und für ihre Motivation und Bestärkung.

Für seine großzügige und unkomplizierte Unterstützung möchte ich Herrn Dr. Herbert Stadler ganz herzlich danken – er machte es möglich, dass ich meine Doktorarbeit in der Firma Affectis durchführen konnte. Herrn Prof. Dr. Dr. Florian Holsboer gilt mein Dank dafür, dass er mir Gelegenheit zur Arbeit als Gast am Max-Planck-Institut für Psychiatrie gegeben hat.

Herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wurst, dem Erstgutachter der vorliegenden Arbeit, für die Ermöglichung der Promotion an seinem Lehrstuhl. Ihm, dem Zweitgutachter Herrn Prof. Dr. Walter Zieglgänsberger und dem Prüfungsvorsitzenden Herrn Prof. Dr. Kay H. Schneitz gebührt mein Dank für die Bereitwilligkeit zur Beurteilung meiner Dissertation.

In der Arbeitsgruppe Neuropsychopharmakologie am Max-Planck-Institut für Psychiatrie durfte ich erste Erfahrungen in der wissenschaftlichen Forschung unter der Anleitung von und in vielen lehrreichen Gesprächen mit Prof. Dr. Hans Reul und seinen Kolleginnen sammeln, unter ihnen Dr. Susanne Droste, Dr. Rosana Peñalva und Dr. Marjolein Beekman. Bei der Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit sind mir viele anregende Erinnerungen an jene Zeit sehr wertvoll gewesen. Dafür und für die gute Zusammenarbeit möchte ich allen herzlich danken.

Meinen Büro- und Laborkollegen Dr. Markus Henniger und Thomas Pohl, die mich in unzähligen Stunden unterstützt, mich erheitert und motiviert haben, möchte ich besonders danken. Ihnen und meiner Betreuerin Dr. Inge Sillaber gebührt der Dank dafür, dass ich mich in der Abteilung Verhaltenspharmakologie so wohl gefühlt habe.

Die vorliegende Arbeit hätte so nicht entstehen können ohne den geduldigen Rat und die fleißige Unterstützung von Sabine Ulbricht, Yvonne Grübler, Florian Schleicher, Ursula Genning und Christine Bartl. Vielen Dank für Eure Hilfe!

Abschließend möchte ich meinen Eltern und meinen Großmüttern von Herzen danken für ihren beständigen Rückhalt während des Studiums und der Doktorarbeit. Danke, Santa Bettina, für den fremden Blick – ihr und jenen, die treue Unterstützung im Privaten leisteten (Chérie für Fluchten in die Berge, Mucki für Erhaltung meiner Homöostase, Fez für Tipps & Tricks) und ein offenes Ohr hatten, gilt meine herzliche Verbundenheit.

Martin Schweizer