

Ultraschallkommunikation bei Ratten:
Soziale Isolation als Risikofaktor für neuropsychiatrische
Erkrankungen mit defizitärem Sozialverhalten im Tiermodell

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Psychologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Dominik Seffer
aus Celle

Marburg, 2015

Vom Fachbereich Psychologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 11.09.2015 angenommen.

Erstgutachter: Dr. Markus Wöhr, Philipps-Universität Marburg

Zweitgutachter: Prof. Dr. Markus Fendt, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Tag der mündlichen Prüfung: 11. September 2015

INHALT

Vorgelegte Arbeiten	1
Zusammenfassung	2
Einleitung.....	3
Neuropsychiatrische Erkrankungen.....	3
Schizophrenie	4
Risikofaktoren für Schizophrenie.....	6
Belastende Kindheitserfahrungen	9
Soziale Vernachlässigung.....	10
Tiermodelle	11
Die Ratte als Modellorganismus.....	14
Sozialverhalten	14
Spielverhalten	15
Ultraschallkommunikation	16
Isolations-induzierte USV (40-kHz USV).....	16
Furcht-induzierte USV (22-kHz USV).....	17
Interaktions-induzierte USV (50-kHz USV)	20
Soziale Isolation als Tiermodell für neuropsychiatrische Erkrankungen	24
Fragestellung & Hypothesen	26
Zusammenfassung der Publikationen	27
STUDIE I: Willadsen et al., 2014	28
STUDIE II: Seffer et al., 2014	29
STUDIE III: Seffer et al., 2015.....	30
Publikationen.....	31
STUDIE I:	32
Willadsen M, Seffer D, Schwarting RKW & Wöhr M. (2014) Rodent ultrasonic communication: Male pro-social 50-kHz ultrasonic vocalizations elicit social approach behavior in female rats (<i>Rattus norvegicus</i>). <i>Journal of Comparative Psychology</i> , 128, 56-64.	

STUDIE II:	42
Seffer D, Schwarting RKW, Wöhr M. (2014) Pro-social ultrasonic communication in rats: Insights from playback studies. <i>Journal of Neuroscience Methods</i> , 234, 73-81.	
STUDIE III:.....	52
Seffer D, Rippberger H, Schwarting RKW, Wöhr M. (2015) Pro-social 50-kHz ultrasonic communication in rats: Post-weaning but not post-adolescent social isolation leads to social impairments – phenotypic rescue by re-socialization. <i>Frontiers in Behavioral Neuroscience</i> , 9:102.	
Diskussion	71
Kommunikative Funktion von 50-kHz USV im sexuellen Kontext (Studie I).....	
	71
Einfluss von Alter und Geschlecht auf die kommunikative Funktion prosozialer 50-kHz USV (Studie II)	
	73
22-kHz USV und Kontrollstimuli – Kommunikative Funktion und Einfluss juveniler sozialer Isolation (Studie II & III).....	
	74
Einfluss juveniler sozialer Isolation auf prosoziales Kommunikationsverhalten (Studie III)	
	78
Einfluss post-adoleszenter sozialer Isolation und Resozialisierung auf prosoziales Kommunikationsverhalten (Studie III).....	
	82
Juvenile soziale Isolation als Tiermodell für die Schizophrenie (Studie III).....	
	86
Literatur	87
Danksagung	109
Curriculum Vitae	110
Erklärung	117

VORGELEGTE ARBEITEN

STUDIE I:

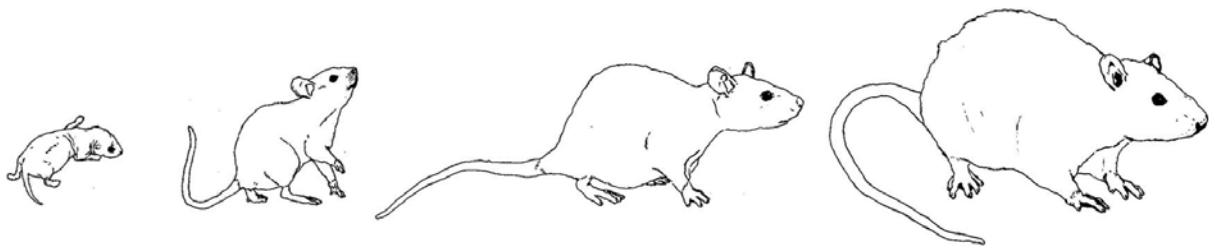
Willadsen M, **Seffer D**, Schwarting RKW & Wöhr M. (2014) Rodent ultrasonic communication: Male pro-social 50-kHz ultrasonic vocalizations elicit social approach behavior in female rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, 128, 56-64.

STUDIE II:

Seffer D, Schwarting RKW, Wöhr M. (2014) Pro-social ultrasonic communication in rats: Insights from playback studies. *Journal of Neuroscience Methods*, 234, 73-81.

STUDIE III:

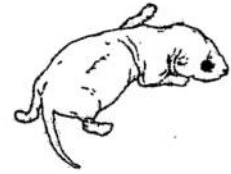
Seffer D, Rippberger H, Schwarting RKW, Wöhr M. (2015) Pro-social 50-kHz ultrasonic communication in rats: Post-weaning but not post-adolescent social isolation leads to social impairments – phenotypic rescue by re-socialization. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9:102.



ZUSAMMENFASSUNG

Ratten zeichnen sich durch ein stark ausgeprägtes Sozialverhalten aus, wovon das Kommunikationsverhalten ein elementarer Bestandteil ist. Sie emittieren Rufe im Ultraschallbereich, sogenannte Ultraschallvokalisationen (USV), die als situationsabhängige, affektive Signale fungieren. Bei juvenilen und adulten Ratten unterscheidet man zwischen zwei verschiedenen Haupttypen. Niederfrequente 22-kHz USV treten typischerweise in aversiven Situationen auf, wie sozialer Unterlegenheit, während hochfrequente 50-kHz USV in appetitiven Situationen beobachtet werden können, wie soziales Spielverhalten bei juvenilen oder Paarungsverhalten bei adulten Ratten. Beide Ruftypen besitzen distinkte kommunikative Funktionen und lösen Ruftyp-spezifisches Verhalten beim Empfänger aus. So dienen 22-kHz USV vermutlich als Alarmrufe, die beim Empfänger zu Verhaltensstarre führen. Im Gegensatz dazu scheinen 50-kHz USV eine prosoziale Funktion zu besitzen. Männliche 50-kHz USV spielen offenbar eine wichtige Rolle zur Herstellung sozialer Nähe und sind vermutlich auch an der Regulation von Sexualverhalten beteiligt (Studie I: Willadsen et al., 2014). Auch im nichtsexuellen Kontext gibt es starke Evidenz für eine Funktion der 50-kHz USV als soziale Kontaktrufe. Eine Übersichtsarbeit zu den Studien, die das etablierte Playback-Paradigma verwendeten, konnte zeigen, dass Playback von 50-kHz USV konsistent Annäherungsverhalten beim Empfänger auslöste und somit eine reliable und hoch standardisierte Untersuchung von prosozialem Ultraschallkommunikationsverhalten von Ratten ermöglicht (Studie II: Seffer et al., 2014). Dieses Paradigma erscheint aus diesem Grund besonders nützlich für den Einsatz in Verbindung mit Tiermodellen zu sein, die sich durch ein defizitäres Sozialverhalten auszeichnen. Juvenile soziale Isolation wird häufig bei Ratten als Tiermodell eingesetzt, um Phänotypen mit klinischer Relevanz für neuropsychiatrische Erkrankungen zu induzieren, wie beispielsweise die Schizophrenie, welche sich durch ein Defizit in der sozio-affektiven Informationsverarbeitung auszeichnet. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von sozialer Isolation auf die prosoziale Ultraschallkommunikation unter Verwendung des 50-kHz USV Playback-Paradigmas bei Ratten untersucht (Studie III: Seffer et al., 2015). Es konnte gezeigt werden, dass juvenile soziale Isolation spezifisch die Reaktion auf 50-kHz USV beeinträchtigte und kein Annäherungsverhalten beim Empfänger auslöste. Beachtenswerterweise konnten diese Defizite durch eine Resozialisierungsphase aufgehoben werden und wurden nicht durch post-adoleszente soziale Isolation induziert. Diese Ergebnisse sprechen für eine kritische Periode in der sozialen Entwicklung während der Adoleszenz und heben die Notwendigkeit sozialer Erfahrungen während dieser sensitiven Phase hervor.

EINLEITUNG



Die Neuropsychiatrie ist eine Integration neurowissenschaftlicher Disziplinen der Neurologie und Psychiatrie. Sie zielt darauf ab, die psychiatrischen Symptome neurologischer Erkrankungen sowie neurobiologische Grundlagen psychiatrischer Erkrankungen zu untersuchen (Miyoshi et al., 2010).

„Die Psychiatrie befasst sich als Teilgebiet der Medizin mit Störungen des Erlebens und den Veränderungen des menschlichen Verhaltens. [...] Ziel der Psychiatrie ist es, die Wahrnehmungs-, Erlebens-, und Kontaktfähigkeit des Individuums sowie seine sozialen Beziehungen aufrechtzuerhalten oder wiederherzustellen. Aufgabe der Psychiatrie ist daher die Diagnostik, Therapie, Prävention und Rehabilitation psychischer Erkrankungen und deren Erforschung unter Berücksichtigung des biologischen, psychologischen und sozialen Bezugsrahmens.“

(Fleischhacker & Hinterhuber, 2012)

Neuropsychiatrische Erkrankungen

Psychische Störungen mit neurologischer Ursache werden als neuropsychiatrische Erkrankungen bezeichnet, d.h. ihre psychiatrischen Symptome sind auf eine organische Funktionsstörung des Gehirns zurückzuführen (Miyoshi & Morimura, 2010). Für die Gewährleistung einer internationalen Vergleichbarkeit von Diagnostik und Behandlung psychischer Störungen sowie eines einheitlichen Forschungsverständnisses werden Klassifikationssysteme benötigt. Zwei Systeme haben sich getrennt voneinander entwickelt, die beide internationale Akzeptanz besitzen (Fleischhacker & Hinterhuber, 2012):

- (1) Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) gibt die *International Classification of Diseases* (ICD) heraus, die aktuell in der 10. Revision (ICD-10) vorliegt. Sie ist besonders für das deutsche Gesundheitswesen relevant, da die Sozialgesetzgebung zu einer Verschlüsselung der Diagnosen gegenüber den Krankenkassen nach diesem System verpflichtet.
- (2) Die *American Psychiatric Association* (APA) entwickelte das *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM), das kürzlich in der 5. Fassung (DSM-5) herausgebracht wurde. Da es sich aufgrund seiner etwas anderen Struktur im Vergleich zum ICD besser als Nachschlagewerk verwenden lässt, hat sich vor allem die Anwendung des DSM in der Forschung etabliert.

Schizophrenie

Die Schizophrenie ist eine psychische Störung, deren Lebenszeitprävalenz weltweit auf etwa 1% geschätzt wird. Frauen und Männer sind gleichermaßen betroffen, wobei Männer vergleichsweise früher an einer Schizophrenie erkranken. Bei ihnen liegt das größte Risiko einer erstmaligen Erkrankung zwischen dem 15. und 25., bei Frauen zwischen dem 25. und 35. Lebensjahr (Leucht et al., 2012; Rey, 2011). Der Begriff Schizophrenie wurde vom Schweizer Psychiater Eugen Bleuler geprägt und bedeutet aus dem Griechischen übersetzt „gespaltene Seele“. Diese Bezeichnung steht allerdings nicht, wie fälschlicherweise häufig angenommen, synonym für die multiple Persönlichkeitsstörung. Stattdessen bezieht sich der Begriff auf die fehlende Koordination der emotionalen, kognitiven und Willensprozesse, durch welche die Schizophrenie häufig gekennzeichnet ist (Ziegler & Lincoln, 2012). Im DSM-5 (APA, 2013) wird sie zur Klasse der Schizophrenie-Spektrum- und anderen psychotischen Störungen gezählt. Eine psychotische Störung ist allgemein durch ihre erheblichen Auswirkungen auf Wahrnehmung, Gedanken und das Bewusstsein oder Ich-Erleben charakterisiert. Veränderungen in der Wahrnehmung werden als Halluzinationen und im Denken als Wahn bezeichnet. Letztere äußern sich in unorganisierten und irrationalen Gedankengängen und führen zu fehlerhaften Schlussfolgerungen aus realen Situationen, Gegebenheiten oder Sachverhalten. Da Betroffenen die Einsicht in ihren pathologischen Charakter fehlt, sind sie allerdings der festen Überzeugung, dass diese Schlussfolgerungen der Realität entsprechen (Rey, 2011).

Die Schizophrenie zeichnet sich durch ein stark heterogenes Erscheinungsbild aus (Picardi et al., 2012), da die Symptome in großer Variation zwischen den Betroffenen vorliegen, was eine Diagnose schwierig macht. Prinzipiell unterteilt man die Symptome in drei Gruppen:

- (1) Positivsymptome bezeichnen Phänomene bzw. psychische Funktionen, die im Vergleich zu unauffälligen Personen im Übermaß vorhanden oder verzerrt sind. Das gewöhnliche Erleben wird sozusagen erweitert. Sie beinhalten Halluzinationen (z.B. Stimmen hören), Wahnvorstellungen, desorganisierte Gedanken und Sprache sowie bizarres Ausdrucksverhalten. Sie stellen wesentliche Diagnosekriterien der Schizophrenie dar (Rey, 2011).
- (2) Negativsymptome stellen Funktionen dar, die gegenüber gesunden Personen fehlen oder reduziert sind, wie Sprachverarmung, Affektverflachung, Motivationsverlust, sozialer Rückzug, Asozialität, Apathie und Anhedonie.
- (3) Kognitive Symptome sind Beeinträchtigungen des Arbeitsgedächtnisses, Störung der Exekutivfunktionen (Handlungsplanung, Problemlösung) und Aufmerksamkeitsdefizite. Sie sind hauptsächlich für die Reduktion der sozialen Leistungsfähigkeit und der damit verbundenen sozialen Isolation verantwortlich.

Eine Vorhersage über den Krankheitsverlauf und –ausgang kann nicht verlässlich getroffen werden. Für etwa 20% der von Schizophrenie betroffenen Personen wird ein günstiger Verlauf prognostiziert und nur sehr wenige von diesen werden vollständig gesunden (APA, 2013). In der klinischen Praxis ist die medikamentöse Behandlung mit Antipsychotika (Neuroleptika) das Mittel der ersten Wahl. Diese lindern aber vorrangig lediglich die Positivsymptomatik und häufig treten Nebenwirkungen auf. Die Wirksamkeit der Behandlung mit Antipsychotika wird häufig mit der Drittelregel beschrieben. Ein Drittel spricht sehr gut auf die Behandlung an und kann ein relativ normales Sozialleben führen. Bei einem Drittel verbessert sich zwar die Symptomatik, aber es kommt zu Rückfällen und sie sind auf Betreuung angewiesen. Bei einem Drittel zeigen die Medikamente allerdings keine Wirkung, die Betroffenen sind häufig hospitalisiert, arbeitsunfähig und sozial ausgegrenzt (Meyer & Quenzer, 2013). Neben einer medikamentösen Behandlung werden zudem häufig auch psychotherapeutische Maßnahmen ergriffen (Ziegler & Lincoln, 2012).

Die insgesamt unbefriedigende Wirksamkeit der zurzeit verfügbaren Medikamente zeigt, dass die weitere Erforschung dieser Krankheit zwingend notwendig ist, um effektivere Behandlungsmöglichkeiten für die Betroffenen zu entwickeln. Da es an Medikamenten zur Behandlung der Negativsymptomatik und der kognitiven Defizite mangelt, bedarf es weiterer Grundlagenforschung auf diesem Gebiet. Einerseits müssen spezifische Tiermodelle entwickelt werden, um diese Symptomatik zu induzieren und andererseits werden sensitive Tests benötigt, um die Wirkweise potentieller Arzneistoffe in diesen Modellen zu erfassen.

Risikofaktoren für Schizophrenie

Im Bereich der Medizin versteht man unter Risikofaktoren spezielle epidemiologische Merkmale, welche die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer bestimmten Krankheit erhöhen. Sie können biologischer Natur sein (genetisch, physiologisch, anatomisch) oder durch Umwelteinflüsse (z.B. psychosoziale Faktoren) verursacht.

Ätiologisch handelt es sich bei der Schizophrenie um eine komplexe Erkrankung, bei der eine genetische Prädisposition die Vulnerabilität gegenüber bestimmten Umweltfaktoren erhöht (Caspi & Moffitt, 2006; Tsuang, 2000; van Os et al., 2010). Somit ergeben sich nach dem Vulnerabilitäts-Stress-Modell, abhängig von der Ausprägung der angeborenen und/oder erworbenen Risikofaktoren, individuelle Dispositionen für die Manifestation einer schizophrenen Störung. Die Stressoren überschreiten schließlich die aus der Disposition resultierende Toleranzschwelle und ziehen bei reduzierter Anpassungsleistung des Gehirns und unzureichenden Bewältigungsstrategien eine akut psychotische Symptomatik nach sich. Bei hoher Vulnerabilität kann demzufolge bereits eine geringfügige Belastung die Entstehung einer Schizophrenie auslösen (Ziegler & Lincoln, 2012).

Die Schizophrenie besitzt eine starke genetische Komponente. Insgesamt wird die Heritabilität, also der Varianzanteil eines phänotypischen Merkmals einer multifaktoriellen Krankheit, der auf die genetischen Unterschiede zwischen den Individuen in der untersuchten Population zurückgeführt werden kann, bei der Schizophrenie auf ca. 80% geschätzt (Cardno & Gottesman, 2000). Die Erbllichkeit konnte in zahlreichen Adoptions-, Zwillings- und Familienstudien demonstriert werden, wobei die Wahrscheinlichkeit an Schizophrenie zu erkranken deutlich erhöht ist, wenn ein naher Angehöriger betroffen ist. Das Risiko steigt mit dem genetischen Verwandtschaftsgrad, also mit der Anzahl der Gene, die mit einem Betroffenen geteilt werden (Gottesman, 1991; Tsuang, 2000). So liegen die Konkordanzraten für eineiige Zwillinge bei 48% und für zweieiige Zwillinge bei 17%. Zur Analyse krankheitsverursachender Veränderungen auf Genomebene werden zwei verschiedene Methoden verwendet. Während bei der Kopplungsanalyse eine gemeinsame Übertragung des krankheitsverursachenden Gens und der Störung in mehrfach belasteten Familien untersucht wird, überprüft die Assoziationsanalyse die überzufällige Häufung eines Allels in einer Gruppe unabhängiger, nicht verwandter Fälle (Fleischhacker & Hinterhuber, 2012). Kopplungsanalysen und genomweite Assoziationsstudien konnten zahlreiche Genloci und deren Risikoallele identifizieren, die jeweils aber nur geringfügig zu einem erhöhten Schizophrenierisiko beitragen (O'Donovan et al., 2008). Aufgrund des heterogenen Charakters dieser Krankheit lässt sich kein Hauptgenort mit monogenem Erbgang nachweisen. Es wird vielmehr ein polygenes Übertragungsmodell diskutiert, bei dem jeder Betroffene ein eigenes Set an Risikogenen trägt, deren kumulative Effekte sich in der

Manifestation einer Schizophrenie äußern (Owen, 2000). Allerdings konnten mutmaßliche Suszeptibilitätsgene identifiziert werden, welche die Wahrscheinlichkeit einer Schizophrenieerkrankung erheblich zu erhöhen scheinen (Harrison & Weinberger, 2005). Eines dieser Gene ist *DISC1*, welches Proteine kodiert, die für die embryonale Hirnentwicklung notwendig sind (Chubb et al., 2008).

Assoziationsstudien konnten zudem die neurochemischen Hypothesen bezüglich der Dopamin-, Glutamat- und Serotoninrezeptoren bestätigen (Fleischhacker & Hinterhuber, 2012). Die Dopaminhypothese hat die Erforschung der Schizophrenie über Jahrzehnte geprägt und ist das Hauptklärungsmodell der aktuellen Pharmakotherapie. Sie postuliert, dass eine Schizophrenie durch ein Ungleichgewicht im Dopaminhaushalt gekennzeichnet ist (Davis et al., 1991). Dabei findet eine dopaminerge Unteraktivierung in mesocorticalen Neuronen des Präfrontalkortex statt, was die Entstehung der Negativsymptomatik und der Denkstörungen erklären könnte. Gleichzeitig kommt es aber auch zu einer Überaktivität im mesolimbischen Dopaminsystem, was die Entstehung der Positivsymptomatik, wie Wahnvorstellungen und Halluzinationen, zur Folge haben könnte. Im Einklang mit dieser Hypothese stehen Befunde, dass die Einnahme von Amphetamin, welches die Dopaminaktivität erhöht, psychotische Symptome bei gesunden Probanden induziert und die Positivsymptomatik bei Schizophreniepatienten verschlimmert (Davis et al., 1991; Lieberman et al., 1987). Zudem beruht die Wirkweise der meisten Antipsychotika auf der Blockade von Dopaminrezeptoren (Leucht et al., 2012; Rey, 2011). Nach der Glutamathypothese könnte eine glutamaterge Hypofunktion des kortikostriatalen und kortikomesolimbischen Systems eine Erklärung für die Negativsymptomatik und die kognitiven Defizite liefern. Sie stützt sich unter anderem auf den psychotogenen Effekt des Glutamatrezeptor-(NMDA-)Antagonisten Phencyklidin (Gallinat & Gudlowski, 2008; Newcomer et al., 1999). Darüber hinaus wurden Unterschiede in der Zusammensetzung der Untereinheiten von Glutamatrezeptoren beschrieben, die die Signalübertragung beeinflussen könnten (Ulas & Cotman, 1993). Die Beteiligung des serotonergen Systems zeigt sich in der psychotogenen Wirkung strukturähnlicher psychoaktiver Substanzen, wie beispielsweise von LSD, sowie der antipsychotischen Wirkweise von Serotoninantagonisten (Meltzer, 1999). Zudem gibt es auch eine Interaktion der Neurotransmittersysteme. So könnte der Wegfall der serotonergen Hemmung des präfrontalen Kortex auf subkortikale Strukturen zu einer gesteigerten dopaminergen Funktion führen (Fleischhacker & Hinterhuber, 2012; Meltzer, 1999; Sartory, 2007; Winterer & Weinberger, 2004). Hinweise auf neuromorphologische Veränderungen bei Schizophreniepatienten wurden von MRT-Studien geliefert, deren Befunde jedoch inkonsistent sind und häufig auf sehr kleinen und heterogenen Stichproben basieren.

Allerdings konnten viele Studien bestätigen, dass Schizophreniepatienten vergrößerte Ventrikel und reduzierte Volumina der Basalganglien, des Hippocampus, des Temporal- sowie des Frontallappens aufweisen (DeLisi et al., 1991; Sartory, 2007; Wright et al., 2000). Wie bereits beschrieben, hat die Vererbung einen großen Anteil am Risiko eine Schizophrenie zu entwickeln. Die Konkordanzrate für Zweieiige Zwillinge beträgt 17%, die für Geschwister allerdings nur 9%, obwohl sie genetisch die gleiche Ähnlichkeit besitzen. Zweieiige Zwillinge teilen sich aber die pränatale Umwelt und wachsen unter identischen Umweltbedingungen auf (Gottesman, 1991). Dies zeigt, dass neben einer genetischen Prädisposition auch Umweltfaktoren eine wichtige Rolle für die Manifestation einer Schizophrenie spielen. Risikofaktoren sind mütterliche prä- und perinatale Virusinfektionen (Brown, 2006), Schwangerschafts- und Geburtskomplikationen (Preti et al., 2000), Geburtsmonat (Geburt in einem Wintermonat erhöht das Risiko; Messias & Kirkpatrick, 2001), Geburtsort (Aufwachsen in einer Stadt erhöht das Risiko; Pedersen & Mortensen, 2001), Alter des Vaters (Brown et al., 2002; Malaspina et al., 2001), psychosoziale Faktoren (Sartory, 2007), Migration (Einwanderung in ein fremdes Land; Cantor-Graae & Selten, 2005) sowie Drogenkonsum, wie z.B. früher und starker Cannabisgebrauch (Semple, 2005). Es wird angenommen, dass Umweltfaktoren besonders in der frühkindlichen Entwicklung einen Einfluss auf die Entstehung einer Schizophrenie haben.

Belastende Kindheitserfahrungen

Frühkindliche Erfahrungen tragen maßgeblich zur Ausprägung sozialer und kognitiver Fähigkeiten bei. In dieser kritischen Entwicklungsphase werden die ersten sozialen Bindungen geknüpft, wie die Beziehung zu den Eltern und später zu Gleichaltrigen. Belastende Kindheitserfahrungen können hingegen zu einem gestörten Sozialverhalten führen und werden als Risikofaktor für die Ausbildung von Entwicklungsstörungen angesehen (Braun & Bock, 2011; Cicchetti & Toth, 1995; Teicher et al., 2003; Veenema, 2009). Kindesmisshandlung, wie körperlicher oder sexueller Missbrauch und soziale Vernachlässigung, erhöhen das Risiko eine Psychose oder Schizophrenie zu entwickeln und führen zu Verhaltensauffälligkeiten, wie gesteigerter Aggression, sozialem Rückzug, risikoreichem Sexualverhalten und Suizidalität (Brown et al., 1999; DeRosse et al., 2014; Gilbert et al., 2009; Lansford et al., 2002; Read et al., 2005; Schenkel et al., 2005; Spinhoven et al., 2010; Varese et al., 2012). Eine mögliche Erklärung ist eine gestörte Verarbeitung von Reizen mit sozialem Informationscharakter. Dodge et al. (1986) beschreiben in einem Modell, dass die Informationsverarbeitung bei Kindern während einer sozialen Interaktion in fünf Stufen abläuft: 1. Wahrnehmung sozialer Stimuli; 2. Interpretation der Information; 3. Suche nach einer Verhaltensreaktion; 4. Bewertung der Verhaltensreaktion; 5. Durchführung des ausgewählten Verhaltens. Eine Falscheinschätzung des sozialen Reizes durch eine fehlerhafte Wahrnehmung und/oder Interpretation kann zu einer unangemessenen Regulation von negativem Affekt und Aggression führen (Crick & Dodge, 1994; Dodge et al., 1990; Shackman & Pollak, 2014). Diese kognitiven Verzerrungen spiegeln sich beispielsweise im "feindseligen Attributionsfehler" wider und sind entscheidend für aggressives oder antisoziales Verhalten. So neigen aggressive gegenüber nichtaggressiven Kindern dazu, Absichten anderer Personen als feindselig zu interpretieren und haben positive Ergebniserwartungen hinsichtlich aggressiver Verhaltensstrategien. Diese verzerrte Wahrnehmung wird zudem weiter verstärkt, wenn dementsprechend zurückweisende oder vergeltende Reaktionen des Gegenübers erfolgen (Lohaus & Vierhaus, 2013). Auch bei Schizophrenie-Patienten wurde ein Zusammenhang kognitiver Verzerrungen mit Beeinträchtigungen des Sozialverhaltens gefunden (APA, 2013; Bowie & Harvey, 2006; Penn et al., 2008). So zeigen sie Defizite in der Fähigkeit Rückschlüsse auf die Intentionen anderer Personen zu schließen („*Theory of Mind*“) und in der Wahrnehmung von Emotionen (Biedermann et al., 2012; Brüne, 2005; Irani et al., 2012; Schneider et al., 2006). Dadurch könnten beispielsweise irrelevante Ereignisse oder Stimuli als bedeutend interpretiert werden. In einem kognitiv-behavioralen Entstehungsmodell wird davon ausgegangen, dass diese kognitiven Verzerrungen das Auftreten psychotischer Symptome, wie Wahnvorstellungen, begünstigen können (Ziegler & Lincoln, 2012).

Soziale Vernachlässigung

Im Rahmen des *Bucharest Early Intervention Project* wurde eine extreme Form von sozialer Vernachlässigung bei rumänischen Waisenkindern untersucht. Dabei wurde die Entwicklung von Kindern, die regulär in ihrer Familie aufwuchsen, mit Kindern verglichen, die entweder von Pflegefamilien aufgenommen wurden oder im Waisenhaus zurückblieben. Die Heimkinder zeigten unter anderem Sprachverarmung, eine verzögerte kognitive Entwicklung, psychische Störungen, sowie Bindungsprobleme und gestörte Emotionsregulation (Bos et al., 2011; Nelson 3rd et al., 2007). Lediglich Kinder, die vor ihrem zweiten Lebensjahr in eine Pflegefamilie kamen, konnten teilweise davon profitieren und verbesserten zumindest in einigen Bereichen ihre unterentwickelten Fähigkeiten. Zudem wurde bei Waisenkindern in einer anderen Studie eine verzögerte Sprachentwicklung mit besonderen Defiziten in verbalen Fähigkeiten gefunden (Frank et al., 1996).

Eine vergleichsweise milde Form sozialer Deprivation wurde bei Kindern im Vorschulalter untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an Zugehörigkeitsgefühl, verursacht durch soziale Ausgrenzung, die Ausprägung aggressiver Verhaltensweisen zu einem späteren Lebenszeitpunkt begünstigt (Stenseng et al., 2014).

Von der sozialen Vernachlässigung und Ausgrenzung zu differenzieren ist der selbstinduzierte soziale Rückzug, welcher ein häufig auftretendes Prodromalsymptom der Schizophrenie darstellt (Tan & Ang, 2001). In einer Studie von Kwapil (1998) wurde bei Jugendlichen gezeigt, dass soziale Anhedonie, also ein Desinteresse an Sozialkontakten mit einer daraus resultierenden sozialen Isolation, ein Prädiktor für die Entwicklung von Schizophrenie-Spektrumsstörungen ist. Nach der sozialen Deafferenzierungshypothese werden die bei der Schizophrenie beobachteten kognitiven Verzerrungen durch starken sozialen Rückzug bzw. Isolation während kritischer Entwicklungsphasen ausgelöst (Hoffman, 2007).

Tiermodelle

Die Untersuchung und das Verstehen komplexer Vorgänge und Interaktionen im Körper ist das primäre Ziel der biologischen und medizinischen Grundlagenforschung. Viele Fragestellungen lassen sich aus ethischen, praktischen oder ökonomischen Gründen nicht direkt am Menschen untersuchen und gefundene Zusammenhänge aus Humanstudien können i.d.R. nur korrelativ beschrieben aber nicht kausal interpretiert werden. Aus diesem Grund ist der Einsatz von Tiermodellen zur Erforschung zugrunde liegender biologischer Mechanismen psychiatrischer Erkrankungen und möglicher therapeutischer Ansatzmöglichkeiten unverzichtbar (Koch, 2006). Die Abbildung eines Störungsbilds im Tiermodell birgt zwei wesentliche Herausforderungen: Wie können relevante Symptome induziert werden und mit welchen Tests lassen sich diese anschließend erfassen? Für Ersteres gibt es verschiedene Gütekriterien nach denen Tiermodelle bewertet werden können (Van der Staay, 2009). Die Augenscheinvalidität gibt an, inwieweit die Symptome des humanen Störungsbilds auch im Tiermodell abgebildet werden können. Sind ursächlich die gleichen biologischen Korrelate und Prozesse involviert, spricht man von Konstruktvalidität. Prädiktive Validität ist gegeben, wenn die beim Menschen wirksamen therapeutischen Maßnahmen im Tiermodell vergleichbare Wirkungen erzielen (Koch, 2006). Die Ätiologie neuropsychiatrischer Erkrankungen ist allerdings noch weitgehend unklar, die Krankheiten sind meist sehr heterogen und Möglichkeiten zur Prävention und Behandlung häufig noch nicht ausreichend beschrieben. Ein Tiermodell kann i.d.R. niemals ein Störungsbild in seiner Gesamtheit abdecken, sondern versucht vielmehr bestimmte Teilaspekte dieser Krankheit abzubilden. Dazu werden verschiedene Forschungsansätze verfolgt. Tiermodelle für die Schizophrenie werden beispielsweise in vier Kategorien eingeteilt, wie die Symptome dieser Krankheit ausgelöst werden können: Entwicklungsmanipulation, Substanzgabe, Läsion oder genetische Manipulation (Jones et al., 2011; McGonigle, 2014). So wird unter anderem versucht, menschliche Krankheiten genetisch bei Tieren hervorzurufen. Diese Krankheitsmodelle werden transgene Tiermodelle genannt. In einem Mausmodell wurde beispielsweise das Suszeptibilitätsgen *DISC1* in das Erbgut eingeführt, dessen Expression zu morphologischen Anomalien und Verhaltensauffälligkeiten führte, die der Symptomatik der Schizophrenie ähneln (Pletnikov et al., 2008). Bei einer weiteren sehr häufig angewendeten Strategie wird nicht der komplexe Phänotyp, also die Symptomatik einer neuropsychiatrischen Erkrankung, in seiner Gesamtheit betrachtet. Stattdessen werden generellere, quantifizierbare Krankheitskorrelate untersucht, die neurobiologisch oder genetisch mit der Erkrankung zusammen hängen. Diese sogenannten Endophänotypen fungieren sozusagen als Bindeglied (intermediärer Phänotyp) zwischen den klinischen Symptomen und den biologischen Grundlagen und

können neurophysiologischer, biochemischer, endokrinologischer, neuroanatomischer, kognitiver oder neuropsychologischer Natur sein. Diese allgemeinen neurobiologischen Phänomene lassen sich im Versuchstier besser modellieren und erweisen sich daher als ideales Konzept in der translationalen Forschung (Fendt & Koch, 2013; Gottesman & Gould, 2003; Gould & Gottesman, 2006; Koch, 2006). Ein Beispiel für einen solchen Endophänotyp sind sensomotorische Bahnungsprozesse, die bei schizophrenen Patienten häufig beeinträchtigt sind und einen bedeutenden Zusammenhang mit der Positivsymptomatik aufweisen. Eine gestörte Reizfilterfunktion des Gehirns lässt sich im Gegensatz zu Positivsymptomen, wie z.B. Wahnvorstellungen und Halluzinationen, in Form der sogenannten Präpulsinhibition (PPI) sowohl beim Menschen (Braff et al., 2001) als auch im Tiermodell (Fendt & Koch, 2013; Fendt et al., 2008; Koch, 2012) erfassen. Insofern werden Positivsymptome der Schizophrenie im Tiermodell üblicherweise in Form von Beeinträchtigungen der PPI operationalisiert. Es gibt allerdings weitere Erkrankungen, bei denen die sensomotorische Filterleistung ebenfalls beeinträchtigt ist, wie bei dem Tourette-Syndrom und der Zwangsstörung (Braff et al., 2001; Geyer et al., 2001; Swerdlow, 2013). PPI-Defizite bilden natürlich nicht die komplexe Symptomatik einer neuropsychiatrischen Erkrankung ab. Dennoch könnte die Erforschung von vergleichsweise simpleren Endophänotypen zum besseren Verständnis dieser Erkrankungen beitragen (Fendt & Koch, 2013).

Wie ausgeführt, gibt es bisher keine befriedigende pharmakologische Behandlung der Negativsymptomatik und der kognitiven Defizite. Kognitive Beeinträchtigungen der Schizophrenie können in sieben Domänen eingeteilt werden: Aufmerksamkeit, Arbeitsgedächtnis, logisches Denken und Problemlösung, Verarbeitungsgeschwindigkeit, visuelles Lernen und Gedächtnis, verbales Lernen und Gedächtnis sowie soziale Kognition (Nuechterlein et al., 2004). Aus diesem Grund wird für die Schizophrenieforschung die Verwendung einer Testbatterie vorgeschlagen, die möglichst viele dieser Bereiche im Tiermodell abdecken sollte (Young et al., 2009). So gibt es zwar zahlreiche verfügbare Tests zur Erfassung der Kognitionsleistungen im Tiermodell, allerdings bedarf es besonders hinsichtlich der Konstruktvalidität und in Bezug auf eine artübergreifende Übertragbarkeit weiterer Evaluierung.

Die Tatsache, dass bisher keine effektive medikamentöse Behandlung der Negativsymptomatik verfügbar ist, liegt zum Teil darin begründet, dass sich viele dieser Symptome im Tiermodell nur schwer oder nicht abbilden lassen. Hierzu zählen Sprachverarmung (Alogie), Affektverflachung, Antriebslosigkeit und Apathie (Ellenbroek & Cools, 2000). So lassen sich letztere zum Beispiel nicht von einer insgesamt eingeschränkten lokomotorischen Aktivität unterscheiden.

Lediglich für die Anhedonie und den sozialen Rückzug sind adäquate Tests verfügbar. Beim Test auf Anhedonie wird beispielsweise der Konsum einer Zuckerlösung erfasst. Verringert sich die natürlicherweise vorhandene Präferenz für die Zuckerlösung, ohne dass dabei die Gesamteinnahme von Flüssigkeit beeinträchtigt ist, wird dies als Anzeichen von Anhedonie gewertet (Papp et al, 1991). Auch ein Rückgang in der von Olds & Milner (1954) entwickelten intrakraniellen Selbststimulation gilt als Indikator für Anhedonie.

In Tiermodellen mit defizitärem Sozialverhalten werden üblicherweise soziale Interaktion und Annäherungsverhalten untersucht (Nadler et al., 2004), wobei reduziertes Sozialverhalten häufig als sozialer Rückzug interpretiert wird (Young et al., 2009). Allerdings könnte dieser Befund auch durch erhöhte Ängstlichkeit erklärt werden, weshalb dieser Test auch in der Angstforschung etabliert ist (File & Seth, 2003). Folglich sind weitere Tests zur Erfassung kognitiver Leistungen sowie Sozial- und Kommunikationsverhalten zwingend erforderlich (Geyer & Ellenbroek, 2003). Voraussetzung hierfür ist ein hochsozialer Modellorganismus.

Die Ratte als Modellorganismus

Sozialverhalten

Ein Großteil der in der biomedizinischen Grundlagenforschung eingesetzten Versuchstiere sind Ratten und Mäuse. Aufgrund ihres stark ausgeprägten Sozialverhaltens bieten Ratten optimale Bedingungen für die Untersuchung von Erkrankungen mit defizitärem Sozialverhalten. Sie leben in Gruppenverbänden (Whishaw & Kolb, 2005) mit einer klaren Hierarchie (Baenninger, 1966) und bevorzugen die Nähe ihrer Artgenossen bei der Nahrungsaufnahme (Barnett & Spencer, 1951). Darüber hinaus zeigen sie ein sehr ausgeprägtes Spielverhalten (Panksepp, 1981) und verhalten sich kooperativ. So zeigten sie koordinierte Bewegungsabläufe in Versuchen, in denen sie zwischen verschiedenen Plattformen hin- und herpendeln (Schuster, 2001; 2002; Willner et al., 1989) oder gleichzeitig mit ihrer Schnauze eine Lichtschranke durchbrechen mussten (Łopuch & Popik, 2011), um eine Belohnung zu erhalten. Interessanterweise wird die Neigung zu kooperativem Verhalten nicht nur bei Menschen durch eine gewisse Reziprozität erhöht. Auch bei Ratten ist die Bereitschaft zur Kooperation durch die vorherige Erfahrung beeinflusst. In einer Studie wurden Ratten darauf trainiert an einem Stab zu ziehen, um für einen Partner Futter zu generieren (Rutte & Taborsky, 2007; 2008). Es wurde beobachtet, dass sie gegenüber eines zuvor hilfreichen Partners dieses Verhalten häufiger zeigten als gegenüber einer wenig hilfreichen Ratte (direkte Reziprozität). Gegenüber einem unbekanntem Partner war die Hilfe ebenfalls stärker, wenn sie zuvor Hilfe erfahren hatten (generalisierte Reziprozität). Ratten zeigen zudem prosoziales Verhalten, also eine Präferenz für Situationen, aus denen nicht nur sie selbst, sondern auch ihre Artgenossen einen Nutzen ziehen. So wählten sie aus zwei verschiedenen Belohnungssituationen überzufällig die prosoziale Variante aus, welche neben dem eigenen auch zusätzliches Futter für eine weitere Ratte garantierte (Hernandez-Lallement et al., 2015). Es gibt Hinweise, dass die Motivation für prosoziales Verhalten möglicherweise auch durch eine Form von Empathie beeinflusst wird (Ben-Ami Bartal et al., 2011). Ratten befreien ihre Artgenossen aus einem Käfig, ohne dafür eine Belohnung zu erhalten. Bemerkenswerterweise wurde dieses Verhalten auch gezeigt, wenn anschließender Sozialkontakt unterbunden wurde, was die Antizipation von Sozialkontakt als Motivation ausschließt. Allerdings wird diese Interpretation aktuell kontrovers diskutiert (Silberberg et al., 2014).

Spielverhalten

Bei Säugern ist das Auftreten von Spielverhalten mit Gleichaltrigen die früheste Form des Sozialkontakts während der Entwicklung, der nicht zur Mutter gerichtet ist. Bei Ratten findet das Spielverhalten in Form von Spielkämpfen („*Rough-and-tumble play*“) statt und tritt nach der Entwöhnung von der Mutter auf. Dieses Verhalten erfolgt nach dem Muster einer umgekehrten U-Kurve, wobei es seinen Höhepunkt während der juvenilen Phase zwischen Lebensstag 30-40 erreicht und dann mit steigendem Alter wieder abnimmt (Panksepp, 1981). Während der Pubertät wird es, abhängig von Geschlecht und Gruppenkonstellation, dem Sexual- oder Aggressionsverhalten zunehmend ähnlicher. Einige Elemente werden bis ins Erwachsenenalter beibehalten, um beispielsweise die Dominanzbeziehungen innerhalb der Gruppe festzustellen (Panksepp, 1981; Pellis, 2002; Takahashi & Lore, 1983; Thor & Holloway, 1984). Obwohl Spielkämpfe auch einem bestimmten Ablauf von Angriffs- und Verteidigungsmustern folgen, unterscheiden sie sich doch stark von ernsthaften Kämpfen, da offenbar bestimmte Regeln eingehalten werden (Pellis & Pellis, 1987). Beim ernsthaften Kampf werden vor allem der Rumpf und die Flanken attackiert und die Bisse können bei misslungener Abwehr zu gravierenden Verletzungen führen. Die Angriffe beim Spielkampf sind hingegen auf den Nacken gerichtet, wobei jedoch selten tatsächlich zugebissen wird. Analysen von Spielkämpfen haben gezeigt, dass bei den meisten Nackenkontakten das Gegenüber lediglich mit der Unterseite der Schnauze berührt wird. Dieses sogenannte „*Pouncing*“ (engl. Herabstoßen) dient dabei der Initiierung des Spielverhaltens, die der Empfänger auf verschiedene Weisen erwidern kann. Bemerkenswerterweise besteht der Spielkampf aus einem Muster bestimmter Verhaltenselemente, wie „*Chasing*“ (engl. Verfolgen), „*Wrestling*“ (engl. Ringen) und „*Pinning*“ (engl. auf dem Boden fixieren), dessen Ablaufschema anscheinend während der frühen Entwicklung angelegt wurde (Panksepp, 1998; Pellis, 2002; Pellis et al., 2005; Vanderschuren et al., 1995a; 1997). Einige dieser Elemente begünstigen eine gewisse Wechselseitigkeit, indem sie die Wahrscheinlichkeit einer absoluten Dominanz über den Spielpartner reduzieren. So bevorzugen Ratten beispielsweise eine eher instabile Haltung ihrer Hinterläufe während sie ihren Spielpartner am Boden fixieren, was der unterlegenen Ratte die Möglichkeit einer Konterattacke aus der Rückenlage heraus eröffnet (Pellis et al., 2005). Dieses Verhaltensmuster resultiert in einem ausgewogenen Verhältnis erfolgreicher Spielereignisse innerhalb eines Paares. Das soziale Spielverhalten könnte dadurch die neuronale Entwicklung und die Ausprägung von Sozialverhalten fördern und das Individuum adäquat auf die Anforderungen im Erwachsenenalter vorbereiten (Panksepp, 1998; Pellis & Pellis, 2007; Vanderschuren et al., 1997). Während des Spiels erleben juvenile Tiere regelmäßig eine Art Kontrollverlust, indem sie sich absichtlich schwer vorhersagbaren Ereignissen aussetzen. Es wird angenommen, dass Ratten durch dieses „Training des Unerwarteten“ flexible Bewältigungsstrategien

entwickeln, die sie in einer unberechenbaren Welt bestehen lassen (Pellis et al., 2010; Špinka et al., 2001). Darüber hinaus sind körperliche Interaktionen während der Adoleszenz wichtig, um soziale, emotionale und kognitive Fähigkeiten zu erwerben, wie beispielsweise das Ausdrücken und Verstehen kommunikativer Signale von Artgenossen (Hol et al., 1999; Meaney & Stewart, 1981; Van den Berg et al., 1999a; Vanderschuren et al., 1997).

Ultraschallkommunikation

Soziale Kommunikation macht einen elementaren Bestandteil des Sozialverhaltens bei Ratten aus. Ratten besitzen die Fähigkeit, Rufe im Ultraschallbereich, also dem Frequenzbereich oberhalb der menschlichen Hörschwelle, wahrzunehmen und zu produzieren. Diese sogenannten Ultraschallvokalisationen (USV) lassen sich, abhängig von Entwicklungsstand, sozialem Kontext und affektivem Zustand, anhand ihrer spezifischen akustischen Merkmale in verschiedene Ruftypen unterteilen, die eine gänzlich unterschiedliche kommunikative Funktion aufweisen (Brudzynski, 2013; Portfors, 2007; Wöhr & Schwarting, 2013).

Isolations-induzierte USV (40-kHz USV)

Dieser Ruftyp existiert nur bei den Jungtieren, deren Überleben vollkommen abhängig vom mütterlichen Fürsorgeverhalten ist. Dies betrifft die Ernährung, Pflege, Aufrechterhaltung der Körperwärme und Schutz vor Fressfeinden. 40-kHz USV werden in potentiell lebensbedrohlichen Situationen emittiert, beispielsweise in Reaktion auf die Trennung von Mutter und Geschwistern oder bei Absinken der Umgebungstemperatur (Noirot, 1968). In Reaktion auf diesen Ruftyp wird bei den Müttern ein Such- und Eintrageverhalten der Jungtiere ins Nest ausgelöst, was dazu führt, dass ein Auskühlen verhindert wird und zudem die Jungtiere potentiellen Fressfeinden nicht länger ausgesetzt sind (Allin & Banks, 1972; Constantini & D'Amato, 2006; Wöhr et al., 2010). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Präsentation zuvor aufgenommener Rufe von Jungtieren (40-kHz USV Playback) bei Rattenmüttern ähnliches Suchverhalten auslöst, wie ein physikalisch anwesendes Jungtier (Wöhr & Schwarting, 2008a). Dies zeigt, dass diese Rufe nicht nur Ausdruck eines negativen affektiven Zustands sind, wie beispielsweise Angst, sondern darüber hinaus auch eine kommunikative Funktion besitzen (Schwarting & Wöhr, 2012). Die Rufanzahl isolierter Jungtiere korreliert negativ mit dem mütterlichen Fürsorgeverhalten, welches wiederum die Verarbeitung von Stress im Erwachsenenalter beeinflusst. Somit kann dieser Ruftyp als Indikator für den emotionalen Zustand des Jungtiers und für die Bindung an die Mutter fungieren.

Furcht-induzierte USV (22-kHz USV)

22-kHz USV werden von juvenilen und adulten Tieren in aversiven Situationen emittiert, wie sozialer Unterlegenheit (Burgdorf et al., 2008; Sales, 1972a), Konfrontation mit einem Fressfeind (Blanchard et al., 1991; 1992) oder bei der Furchtkonditionierung (Borta et al., 2006; Choi & Brown, 2003; Kim et al., 2010; Wöhr et al., 2005; Yee et al., 2012a; b). Dabei zeigen Ratten mit erhöhter Ängstlichkeit ein stärkeres Rufverhalten als ihre weniger ängstlichen Artgenossen (Borta et al., 2006). Dies ist durch eine Korrelation von 22-kHz USV mit der Verhaltensstarre belegt, dem klassischen Maß für Angstverhalten bei Ratten (Wöhr et al., 2005; Wöhr & Schwarting, 2008b). Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen dem Aversionsgrad eines Stimulus, z.B. Intensität eines Fußschocks, mit der Emission von 22-kHz USV gefunden werden (Wöhr et al., 2005). Mit steigender Schockintensität nahm die Anzahl der Rufe in der Lernphase zu. Die alleinige Darbietung eines zuvor neutralen Stimulus, der in der Akquisitionsphase mit dem Schock gepaart wurde, führte in der Testphase ebenfalls zu diesem gesteigerten Rufverhalten. 22-kHz USV sind demnach kein Indikator für Schmerzempfinden, sondern spiegeln vielmehr einen negativen affektiven Zustand des Senders wider (Jelen et al., 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass Umweltfaktoren während der frühen Entwicklung die Produktion von 22-kHz USV beeinflussen. So ist die Emission von 22-kHz Rufen bei adulten Ratten verstärkt, wenn sie während ihrer juvenilen Phase diversen Stressoren ausgesetzt wurden, im Vergleich zu ungestressten Kontrolltieren (Yee et al., 2012a). Auch maternale Immunaktivierung bei trächtigen Ratten durch Gabe von Poly I:C, einem Tiermodell für neuropsychiatrische Erkrankungen (Meyer & Feldon, 2012), führte zu einem verstärkten Rufverhalten beim adulten Nachwuchs (Yee et al., 2012b). Dieses Verhalten wurde nicht von weiteren Anzeichen von Furcht, wie z.B. Verhaltensstarre, begleitet, was den großen Vorteil der USV-Erfassung als zusätzlichen Indikator von Furcht unterstreicht.

Da dieser Ruftyp zudem eine spezifische Verhaltensreaktion im Empfänger auslöst, wird ihm auch eine kommunikative Funktion zugeschrieben (Brudzynski, 2013; Schwarting & Wöhr, 2012; Wöhr & Schwarting, 2013). So wird angenommen, dass 22-kHz Rufe eine deeskalierende kommunikative Funktion besitzen und als Ausdruck von Unterwürfigkeit fungieren könnten, um Angriffe eines potentiellen Aggressors zu verhindern (Lore & Flanely, 1977). Es gibt jedoch Hinweise, dass auch die prosozialen 50-kHz USV eine derartige Funktion besitzen könnten (Kisko et al., 2015a). Am stärksten wird die Theorie vertreten, dass 22-kHz USV als Alarmruf fungieren, um Artgenossen vor drohenden Gefahren zu warnen (Litvin et al., 2007). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Ratten besonders empfänglich dafür sind, einen 22-kHz Ruf mit dem Eintreten eines aversiven Ereignisses zu assoziieren (Bang et al., 2008; Endres et al., 2007). Im Vergleich zu den Kontrollstimuli wurde die Bedeutung der Rufe schneller erlernt und langfristig im

Gedächtnis abgespeichert. Untersuchungen in Playback-Studien konnten eine Verhaltensänderung in Reaktion auf 22-kHz USV bestätigen. Dabei wurde den Versuchstieren eine Sequenz zuvor aufgenommener 22-kHz Rufe präsentiert, was zu einer starken Hemmung der lokomotorischen Aktivität führte (Burman et al., 2007; Endres et al., 2007; Wöhr & Schwarting, 2007). Den ersten Hinweis auf eine Alarmfunktion lieferten jedoch Versuche von Blanchard et al. (1991), die eine stärkere Rufproduktion in Reaktion auf einen Prädatoren beobachten konnten, wenn Artgenossen anwesend waren. Diese reagierten daraufhin mit Defensivverhalten, wie Flucht in einen sicheren Unterschlupf, ohne ihrerseits die Gefahr wahrgenommen zu haben. Dieser Audienzeffekt konnte in einer anderen Studie, unter Verwendung des Furchtkonditionierungs-Paradigmas, allerdings nicht repliziert werden (Wöhr & Schwarting, 2008b). Die Anwesenheit eines Artgenossen wirkte sich nicht auf das Rufverhalten des Senders aus, es konnte jedoch ein Empfängereffekt beobachtet werden. So löste eine erhöhte Rufproduktion des Senders eine stärker ausgeprägte Verhaltensstarre beim Empfänger aus. Interessanterweise lösen 22-kHz USV diese Reaktion im Empfänger nur hervor, wenn dieser zuvor einer aversiven Situation ausgesetzt wurde (Kim et al., 2010). Naive Empfänger reagieren ebenso wenig auf die während der Furchtkonditionierung gesendeten 22-kHz Rufe ihres Partners, wie erfahrene Ratten, bei denen das auditorische System lädiert wurde. Letzteres zeigt, dass die Verhaltensstarre durch die 22-kHz USV ausgelöst wird und nicht etwa durch olfaktorische oder visuelle Hinweisreize des Senders. Besonders bemerkenswert war jedoch ein weiterer Befund. So wurde Ratten vorübergehend das auditorische System inaktiviert, während sie einer aversiven Furchtsituation ausgesetzt waren. Bei der späteren Testung reagierten sie nicht auf die 22-kHz Rufe des Senders, obwohl das auditorische System wieder funktionsfähig war (Kim et al., 2010). Ihr Verhalten glich dem der naiven Ratten, die keiner vorherigen aversiven Situation ausgesetzt waren. Dies zeigt, dass während einer aversiven Erfahrung und der damit verbundenen Emission von 22-kHz USV möglicherweise eine Autokonditionierung stattfindet. Diese Hypothese konnte auch in einer Playback-Studie bestätigt werden, bei der eine Verhaltensstarre in Reaktion auf 22-kHz USV nur gefunden wurde, wenn die Ratten zuvor aversiven Reizen ausgesetzt wurden (Parsana et al., 2012b). Durch das Wahrnehmen der eigenen Rufe scheinen sie diese mit dem aversiven Kontext zu assoziieren. Das Generalisieren der 22-kHz USV ermöglicht es den Ratten, in späteren Situationen auf diesen Ruftyp adäquat zu reagieren, z.B. mit Verhaltensstarre.

In einer Playback-Studie konnte mittels immunhistochemischer Methoden (c-fos) nach Präsentation von 22-kHz USV ein Anstieg der neuronalen Aktivität in bestimmten Hirnregionen festgestellt werden, wie der basolateralen Amygdala und dem zentralen Höhlengrau (Sadananda et al., 2008), die relevant für Furcht- und Angstverhalten sind (Fendt, 1998; Fendt & Fanselow, 1999). Eine erhöhte Aktivität der Amygdala während 22-kHz USV Playback konnte zudem durch Einzelzelleitungen bestätigt werden (Parsana et al., 2012a). Zusammengefasst unterstützen die Befunde die Hypothese, dass 22-kHz USV eine kommunikative Funktion besitzen. Auch wenn es keine Bestätigung einer gezielten Rufemission des Senders gibt, so scheint es doch sehr plausibel, dass sie vom Empfänger als Alarmrufe wahrgenommen werden.

Interaktions-induzierte USV (50-kHz USV)

Die hochfrequenten 50-kHz USV werden von juvenilen und adulten Ratten in appetitiven Situationen emittiert, wie Spielverhalten (Burgdorf et al., 2008; Himmler et al., 2014; Knutson et al., 1998), Sexualverhalten (Barfield & Thomas, 1986; Burgdorf et al., 2008; Sales, 1972b) oder in Reaktion auf Stimuli mit belohnendem Charakter, wie beispielsweise nach Amphetamingabe (Ahrens et al., 2009; 2013; Burgdorf et al., 2001; Natusch & Schwarting, 2010; Pereira et al., 2014; Rippberger et al., 2015; Wöhr et al., 2015). Es wird daher angenommen, dass sie einen positiven affektiven Zustand reflektieren (Burgdorf & Panksepp, 2006; Burgdorf et al., 2011). Der renommierte Emotionsforscher Jaak Panksepp stellte sogar die zugegebenermaßen recht provokante Hypothese auf, dass die 50-kHz Rufe dem menschlichen Lachen sehr ähnlich und somit sein evolutionärer Vorläufer seien (Panksepp, 2005; 2007; Panksepp & Burgdorf, 2000; 2003). Ratten produzieren 50-kHz USV nicht nur während des Spiels, sondern auch in dessen Erwartung (Knutson et al., 1998), was die stark belohnende Eigenschaft von innerartlichem Spielverhalten unterstreicht. Erfahrene menschliche Versuchsleiter sind sogar dazu in der Lage das Spielverhalten bei Ratten zu imitieren (heterospezifisches Spielverhalten), indem sie mit den Tieren auf spielerische Art interagieren und dabei relevante Komponenten nachahmen („*Chasing*“, „*Wrestling*“, „*Pinning*“). Diese Methode wird auch „*Tickling*“ (engl. Kitzeln) genannt und induziert ebenfalls effektiv die Produktion von 50-kHz USV (Burgdorf et al., 2008; Mällo et al., 2007; Panksepp & Burgdorf, 2000; 2003; Wöhr et al., 2009). Es wurde gezeigt, dass vor allem jene Ratten am stärksten vokalisiert, die das „*Tickling*“ als besonders belohnend empfanden, also den Kontakt zur Hand des Versuchsleiters am schnellsten herstellten (Panksepp & Burgdorf, 2003). Zudem gibt es Befunde, dass wiederholter Stress das Rufverhalten in Reaktion auf „*Tickling*“ verringert (Popik et al., 2012). In einer interessanten Studie aus der Arbeitsgruppe von Piotr Popik wurde ein Zusammenhang zwischen hoher 50-kHz USV Produktion während des „*Ticklings*“ und dem Treffen optimistischer Entscheidungen in unsicheren Situationen gefunden (Rygula et al., 2012). In einer Skinnerbox lernten Ratten auf einen bestimmten Ton mit Drücken eines Hebels zu reagieren, um eine Futterbelohnung zu erhalten. Ein zweiter Ton kündigte einen aversiven Fußschock an, den die Ratten durch Drücken eines zweiten Hebels verhindern konnten. Anschließend wurden die Versuchstiere in zwei Gruppen aufgeteilt, wobei eine Gruppe lediglich „*Handling*“ (engl. standardisierte Handhabung, z.B. streicheln, hochheben) erfuhr, während die andere „*Tickling*“ ausgesetzt wurde. Spielte man den Ratten nach dieser Prozedur einen Ton vor, der eine intermediäre Frequenz zwischen den belohnungs- und bestrafungsvorhersagenden Tönen aufwies, trafen jene Ratten, die beim „*Tickling*“ viele 50-kHz USV emittierten, eine optimistische Entscheidung und wählten den mit einer Futterbelohnung assoziierten Hebel überzufällig aus. In dieser und in weiteren Studien wurden große interindividuelle Unterschiede für das Rufverhalten beim „*Tickling*“

beobachtet. Während es Tiere gab, die sehr viele 50-kHz Rufe emittierten, konnten bei anderen Ratten teilweise gar keine Rufe oder sogar 22-kHz USV in Reaktion auf das „*Tickling*“ festgestellt werden. Überraschenderweise können diese Unterschiede nur zu einem Teil durch eine individuelle Prädisposition für angst- und depressionsähnliches Verhalten erklärt werden (Mällo et al., 2007; Schwarting et al., 2007). Um Fragestellungen bezüglich des Angstverhaltens nachzugehen, werden Ratten selektiv auf niedriges (LAB, „*low anxiety-related behavior*“) oder hohes (HAB, „*high anxiety-related behavior*“) Angstverhalten gezüchtet. Es wurde gezeigt, dass bei juvenilen HAB-Ratten sowohl das Spielverhalten als auch die Emission von 50-kHz USV stark reduziert ist. Dies spiegelt möglicherweise einen Mangel an positivem Affekt wider, der natürlicherweise in Erwartung von und während sozialer Interaktion bei Ratten zu finden ist (Lukas & Wöhr, 2015). Für 50-kHz USV gibt es zudem Belege für eine prosoziale kommunikative Funktion, sowohl im sexuellen (Barfield & Thomas, 1986) als auch im nicht-sexuellen Kontext (Brudzynski, 2013; Wöhr & Schwarting, 2013).

Aufgrund der Befunde aus Studien mit devokalisierten Männchen wird angenommen, dass die Produktion von 50-kHz Rufen dem Paarungserfolg dient. So zeigten Weibchen ein verändertes Sexualverhalten gegenüber Männchen, denen die Fähigkeit zu vokalisieren genommen wurde und wendeten sich beim Kopulationsversuch ab, anstatt die typische gebeugte Haltung (Lordose) einzunehmen (Thomas et al., 1981; 1982; White & Barfield, 1990; White et al., 1990). Allerdings konnte die sexuelle Bereitschaft der Weibchen durch Playback von männlichen 50-kHz USV wiederhergestellt werden. So nahmen sie während der Kopulation eine ruhigere Haltung ein, was den Männchen eine erfolgreiche Penetration ermöglichte (White & Barfield, 1990) und zeigten zudem verstärktes Werbeverhalten, was sich durch häufigeres „*Darting*“ (engl. Anspringen) der Männchen äußerte, wenn männliche 50-kHz USV in ihrer Nähe abgespielt wurden (Thomas et al., 1982). Letzteres konnte noch verstärkt werden, wenn die Rufe bereits vor der Verpaarung abgespielt wurden (Geyer et al., 1978) und Anspringen wurde sogar gefunden, wenn die Weibchen lediglich minimal sexuell durch ein kastriertes Männchen stimuliert wurden (McIntosh et al., 1978). In einem Y-Labyrinth zeigten Weibchen eine Präferenz für männliche 50-kHz Rufe gegenüber Stille (Barfield et al., 1979) und es gibt Evidenz, dass diese USV wiederum Rufverhalten in Weibchen auslösen (White et al., 1993, aber siehe auch: White et al., 1991). Das ist insofern relevant, als dass auch weibliche USV beim Sexualverhalten eine wichtige Rolle zu spielen scheinen (White & Barfield, 1987, 1989; White et al., 1991). Diese Befunde stehen in einem starken Gegensatz zu einer kürzlich erschienenen Arbeit von Snoeren und Ågmo (2013), die in einer Playback-Studie keine Belege für eine intersexuelle kommunikative Funktion von weiblichen 50-kHz Rufen finden konnten. Sowohl sexuell erfahrene als auch naive Männchen zeigten weder Annäherungsverhalten gegenüber der Geräuschquelle, noch

bevorzugten sie vokalisierende Weibchen gegenüber devokalisierten. In einer weiteren Studie untersuchten die Autoren das Verhalten von Weibchen auf männliche 50-kHz USV und konnten ebenfalls keine eindeutigen Effekte feststellen, woraus sie schlossen, dass männliche 50-kHz USV keinerlei oder höchstens stark eingeschränkten Anreizwert für Weibchen besitzen (Snoeren & Ågmo, 2014). Die Weibchen zeigten zwar kein gesteigertes Interesse für vokalisierende Männchen, allerdings gab es leichte Hinweise auf Annäherung gegenüber 50-kHz USV. Der Fragestellung, ob weibliche Ratten Annäherungsverhalten in Reaktion auf männliche 50-kHz USV zeigen, wurde in der vorgelegten Studie I unter Verwendung des 50-kHz USV Playback-Paradigmas weiter nachgegangen (Willadsen et al., 2014).

Auch im nicht-sexuellen Kontext wird die Hypothese der prosozialen kommunikativen Funktion unterstützt. So verbringen Ratten mehr Zeit mit Artgenossen, die eine große Anzahl an 50-kHz Rufen emittieren im Vergleich zu jenen, die nur wenig vokalisieren (Panksepp et al., 2002). Zwei kürzlich veröffentlichte Arbeiten sprechen dafür, dass 50-kHz USV als Spielsignale dienen könnten, um das soziale Spielverhalten zu begünstigen oder aufrechtzuerhalten. Es wurde beobachtet, dass ihr Auftreten häufiger vor Spielsituationen zu verzeichnen ist als danach (Himmler et al., 2014) und dass es zu einer Abnahme der Spielfrequenz bei devokalisierten Ratten kommt (Kisko et al., 2015b). Außerdem lösen bereits olfaktorische Hinweisreize auf einen potentiellen Artgenossen ein verstärktes Rufverhalten in Antizipation von Sozialkontakt aus (Brudzynski & Pniak, 2002). Eine erhöhte Rufproduktion findet man zudem auch unmittelbar nach kurzzeitiger sozialer Trennung von Käfigpartnern (Schwartz et al., 2007; Wöhr et al., 2008). Darüber hinaus wurde bereits mehrfach gezeigt, dass Playback von 50-kHz USV Annäherungsverhalten in Richtung der Geräuschquelle auslöst, was die Annahme weiter unterstützt, dass sie als soziale Kontaktrufe fungieren (Willuhn et al., 2014; Wöhr & Schwartz, 2007; 2009; 2012). In der vorgelegten Studie II (Seffer et al., 2014) wurde eine Übersichtsarbeit zu den bisher durchgeführten Playback-Experimenten erstellt, die eine hohe Reliabilität dieses Paradigmas für die Untersuchung von prosozialer Ultraschallkommunikation belegt. Das 50-kHz USV-induzierte Annäherungsverhalten ermöglicht die Erforschung vielfältiger Fragestellungen im Kontext der sozialen Motivation und Kommunikation im Tiermodell. Das Playback-Paradigma bietet daher optimale Voraussetzungen für den Einsatz in Verbindung mit Tiermodellen neuropsychiatrischer Erkrankungen mit defizitärem Sozialverhalten (Seffer et al., 2015). Ein weiterer Vorteil ist die hohe Standardisierung, da auf den Einsatz von Artgenossen als soziale Stimuli verzichtet wird. Dies reduziert zum einen den Bedarf an Versuchstieren und zum anderen kann auf diese Weise sichergestellt werden, dass das Stimulusmaterial keinen Schwankungen unterliegt und die beobachtete Variabilität einzig auf der Seite des Empfängers liegt.

Mittels immunhistochemischer Methoden (c-fos) konnte nach Präsentation von 50-kHz USV ein Anstieg der neuronalen Aktivität im frontalen Assoziationskortex und dem Nucleus accumbens festgestellt werden (Sadananda et al., 2008), welcher relevant für appetitives Verhalten und Belohnungsprozesse ist (Ikemoto & Panksepp, 1999). Im Einklang mit diesem Befund konnte mittels zyklischer Voltammetrie eine phasische Dopaminausschüttung in Reaktion auf 50-kHz USV im Nucleus accumbens gemessen werden (Willuhn et al., 2014). „Tickling“ erhöht ebenfalls die Dopaminfreisetzung in dieser Region, was durch Mikrodialyse nachgewiesen werden konnte (Hori et al., 2013). Des Weiteren wurde mittels Einzelzelleableitungen eine verringerte Aktivität der Amygdala während Playback von 50-kHz USV gefunden (Parsana et al., 2012a).

Soziale Isolation als Tiermodell für neuropsychiatrische Erkrankungen

Ein häufig verwendetes Paradigma zur Untersuchung nachteiliger Auswirkungen von sozialer Deprivation bei juvenilen Ratten ist die soziale Isolation direkt nach dem Absetzen von der Mutter, im Folgenden juvenile soziale Isolation genannt. Dabei werden die Jungtiere i.d.R. ab Lebenstag 21 für vier Wochen in Einzelhaltung gehalten. Das bedeutet, dass sie zwar weiterhin auditorische, visuelle und olfaktorische Reize ihrer Artgenossen wahrnehmen können, ihnen aber die Möglichkeit zur direkten Interaktion verwehrt wird. In dieser kritischen Entwicklungsphase findet bei gruppengehaltenen Ratten das Spielverhalten statt (Panksepp, 1981). Das Vorenthalten des sozialen Spiels führt zu einem Verhaltensphänotyp, der sich bei adulten Tieren durch markante Beeinträchtigungen im Sozialverhalten auszeichnet (Hol et al., 1999; Van den Berg et al., 1999b). Die beobachteten Langzeitveränderungen sind von translationaler Bedeutung für Erkrankungen mit defizitärem Sozialverhalten, wie beispielsweise Autismus oder Depression. Dieses Tiermodell besitzt aber insbesondere für die Schizophrenie eine hohe klinische Relevanz, da Beeinträchtigungen in allen drei Symptomgruppen (positiv, negativ, kognitiv) zu finden sind. Die Verhaltensauffälligkeiten werden zudem von neuromorphologischen Veränderungen sowie Störungen in Neurotransmittersystemen, wie Dopamin, Glutamat und Serotonin begleitet (Fone & Porkess, 2008; Hall, 1998; Lapiz et al., 2003).

Ein sehr robuster Effekt ist die gestörte Habituation an eine unbekannte Umgebung, welche durch lokomotorische Hyperaktivität gekennzeichnet ist (Gentsch et al., 1988; Sahakian et al., 1977). Dieser Befund wird durch eine Neophobie und der daraus resultierenden gesteigerten Neigung zu Fluchtverhalten erklärt (Fone et al., 1996). Die Anfälligkeit für Substanzabusus ist ebenfalls verändert, was sich in einer stärkeren Reaktion auf Substanzen mit belohnender Wirkung zeigt (Einon & Sahakian, 1979; Hall, 1998; Jones et al., 1990). Darüber hinaus ist die Präpulsinhibition (PPI) der akustischen Schreckreaktion beeinträchtigt (Geyer et al., 1993), was von großer Relevanz für die Positivsymptomatik der Schizophrenie ist. Auch kognitive Defizite wurden gefunden, beispielsweise beim passiven Vermeidungstest (Del Arco et al., 2004) und der kontextuellen Furchtkonditionierung (Weiss et al., 2004), was für eine Beeinträchtigung des assoziativen Lernens spricht. Es wurden zudem Defizite in der Impulskontrolle und Entscheidungsfindung beobachtet (Baarendse et al., 2013). Im Morris-Wasserlabyrinth-Test zeigten sich darüber hinaus Defizite in der Raumkognition und im Umlernen (Quan et al., 2010). Zudem zeigten isolierte Ratten eine defizitäre Gedächtnisleistung im Objektwiedererkennungstest. Sie explorierten ein zuvor präsentiertes Objekt genauso häufig wie ein neues, wohingegen ihre gruppengehaltenen Artgenossen eine Präferenz für das neue Objekt aufwiesen (Bianchi et al., 2006; Valluy et al., 2015). Interessanterweise findet man auch bei Schizophreniepatienten eine Beeinträchtigung des episodischen Gedächtnisses (McClure et al., 2007).

Im Kontext dieser Arbeit sind Veränderungen des Sozialverhaltens von besonderem Interesse. Sozialer Rückzug ist eines der häufigsten Negativsymptome der Schizophrenie. Auch sozial isolierte Ratten zeigen in vielen Studien eine verringerte soziale Aktivität, wie reduziertes Annäherungsverhalten, anogenitales Schnüffeln und wechselseitiges Interaktionsverhalten (Hol et al., 1999; Kokare et al., 2010; Meaney & Stewart, 1979; Möller et al., 2011; 2013; Van den Berg et al., 1999a; b; c; d, aber siehe auch: Ferdman et al., 2007; Han et al., 2011). Darüber hinaus wird häufig auch ein erhöhtes Aggressionsverhalten gefunden (Grotewold et al., 2014; Meng et al., 2010; Vale & Montgomery, 1997; Wall et al., 2012; Wongwitdecha & Marsden, 1996).

Soziale Kommunikation wurde in diesem Tiermodell jedoch bisher kaum untersucht. Es gibt Befunde, dass das Rufverhalten von Ratten nach juveniler sozialer Isolation verändert ist. So konnte beispielsweise eine erhöhte 50-kHz USV Produktion während des sozialen Spiels und des „*Ticklings*“ nach vorheriger Kurzzeitisolation verzeichnet werden, was vermutlich durch eine gesteigerte Motivation für Sozialkontakt erklärt werden kann (Burgdorf & Panksepp, 2001; Knutson et al., 1998; Panksepp & Burgdorf, 2000). Nach einer ausgedehnten Isolationsphase wurde bei männlichen Ratten außerdem eine starke Verminderung der 50-kHz Rufanzahl in Reaktion auf ein sexuell empfängliches Weibchen registriert, was womöglich die Unfähigkeit widerspiegelt, soziale Hinweisreize zu erkennen und zu interpretieren bzw. adäquat auf sie zu reagieren (Inagaki et al., 2013b).

Auch für den Furcht-induzierten 22-kHz Ruftyp gibt es Evidenz für eine isolationsbedingte Beeinträchtigung im Rufverhalten. Wie von Frijtag et al. (2002) beobachten konnten, zeigen zuvor isolierte, männliche Ratten eine gestörte Unterdrückung des Spielverhaltens in Anwesenheit eines aggressiven Artgenossen und erleiden dadurch, im Vergleich zu den gruppengehaltenen Ratten, mehr verletzende Angriffe. Zudem ist die Anzahl der emittierten 22-kHz USV erhöht. Die Autoren interpretierten die Befunde mit einer Loslösung der 22-kHz USV Produktion vom Verhaltensmuster des Senders. Dies könnte dazu geführt haben, dass der Ruftyp seine beruhigende und deeskalierende kommunikative Funktion verloren hat.

Im Gegensatz dazu wurden mögliche Effekte von juveniler sozialer Isolation auf das Kommunikationsverhalten des Empfängers bisher nicht untersucht. Dieser Fragestellung wurde in der vorgelegten Studie III (Seffer et al., 2015) nachgegangen, die den Einfluss von sozialer Isolation auf die Ultraschallkommunikation bei Ratten untersucht, sowohl in Reaktion auf aversive 22-kHz USV als auch auf prosoziale 50-kHz USV.

FRAGESTELLUNG & HYPOTHESEN

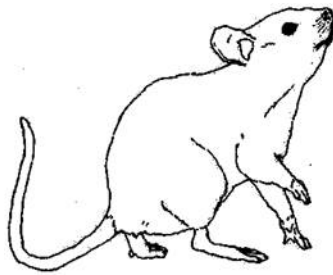
Die vorgelegte Studie I (Willadsen et al., 2014) beschäftigte sich mit der kommunikativen Funktion prosozialer 50-kHz USV im sexuellen Kontext, da diese durch eine kürzlich veröffentlichte Studie angezweifelt wurde (Snoeren & Ågmo, 2014). Es wurde erwartet, dass weibliche Ratten auf männliche 50-kHz Rufe in dem Playback-Paradigma mit Annäherungsverhalten reagieren.

In der vorgelegten Studie II (Seffer et al., 2014) wurde eine Übersichtsarbeit zu den bisher durchgeführten Playback-Experimenten erstellt, die den Schwerpunkt auf den Nachweis der kommunikativen Funktion von 50-kHz USV legte. Es wurde gezeigt, dass mit dem Playback-Paradigma die prosoziale Ultraschallkommunikation von Ratten auf eine reliable und hoch standardisierte Weise untersucht werden kann und es sich dadurch in besonderem Maße für den Einsatz in Verbindung mit Tiermodellen für neuropsychiatrische Erkrankungen mit defizitärem Sozialverhalten eignen könnte, wie beispielsweise der sozialen Isolation.

Das Kommunikationsverhalten wurde in Verbindung mit sozialer Isolation bisher kaum untersucht. In den beschriebenen Studien wurden ausschließlich Isolationseffekte gefunden, die sich auf die USV-Produktion auswirkten, also das Verhalten des Senders beeinflussten. Im Gegensatz dazu wurden die Effekte von juveniler sozialer Isolation auf das Verhalten des Empfängers in Reaktion auf USV bisher nicht erforscht. Aus diesem Grund wurde in der vorgelegten Studie III (Seffer et al., 2015) der Einfluss sozialer Isolation auf die Ultraschallkommunikation des Empfängers bei Ratten untersucht, insbesondere auf die Verarbeitung von Rufen mit prosozialem Informationscharakter. Zu diesem Zweck wurde ebenfalls das 50-kHz USV Playback-Paradigma eingesetzt. Es wurde erwartet, dass das Annäherungsverhalten in Reaktion auf 50-kHz USV nach juveniler sozialer Isolation beeinträchtigt ist. Außerdem sollte geprüft werden, ob dieses defizitäre Sozialverhalten durch eine Resozialisierungsprozedur, die sich an die Isolationsphase anschloss, wiederhergestellt werden kann. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnten Hinweise für solche Effekte in einem etablierten Mausmodell für Autismus gefunden werden (Yang et al., 2011).

Um zu überprüfen, ob ein kritisches Zeitfenster für die Entstehung eines defizitären Kommunikationsverhaltens während der Entwicklungsphase vorliegt, wurden Ratten nach Vollendung ihrer Adoleszenz für die gleiche Zeitspanne post-adoleszent sozial isoliert, also nachdem sie die Spielphase abgeschlossen hatten. Es wurde bereits gezeigt, dass soziales Interaktionsverhalten und Angstverhalten nicht beeinträchtigt sind, wenn Ratten erst nach Vollendung dieser sensitiven Spielphase sozial isoliert werden (Hol et al., 1999; Wright et al., 1991).

ZUSAMMENFASSUNG DER PUBLIKATIONEN



STUDIE I: Willadsen et al., 2014

Willadsen M, Seffer D, Schwarting RKW & Wöhr M. (2014) Rodent ultrasonic communication: Male pro-social 50-kHz ultrasonic vocalizations elicit social approach behavior in female rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, 128, 56-64.

Deutsche Zusammenfassung:

Ratten emittieren bestimmte Ruftypen im Ultraschallbereich, sogenannte Ultraschallvokalisationen (USV), die als situationsabhängige affektive Signale fungieren. Niederfrequente 22-kHz USV treten typischerweise in aversiven Situationen auf, wie sozialer Unterlegenheit, während hochfrequente 50-kHz USV in appetitiven Situationen beobachtet werden können, wie Spielverhalten bei juvenilen oder Paarungsverhalten bei adulten Ratten. Diese zwei Hauptruftypen besitzen darüber hinaus eine wichtige kommunikative Funktion und evozieren ein spezifisches Verhalten im Empfänger. Während 22-kHz USV vermutlich als Alarmrufe dienen, scheinen 50-kHz USV eine prosoziale Funktion, sowohl im sexuellen als auch nichtsexuellen Kontext, zu besitzen. Im sexuellen Kontext wurde diese Ansicht kürzlich durch Playback-Studien angezweifelt, bei denen Rattenweibchen lediglich mit eingeschränkter Verhaltensänderung auf männliche 50-kHz USV reagierten. Das Ziel dieser Studie war daher zu testen, ob weibliche Ratten im etablierten Playback-Paradigma Annäherungsverhalten in Reaktion auf männliche 50-kHz USV zeigen. Aus diesem Grund wurden weibliche Ratten dem Playback von den zwei folgenden akustischen Stimuli ausgesetzt: (a) natürliche, von Männchen aufgenommene 50-kHz USV und (b) zeit- und amplitudenangepasstem weißen Rauschen. Letzteres diente zur akustischen Kontrolle für die durch Reizneuheit induzierten Verhaltenseffekte, die keiner kommunikativen Funktion der 50-kHz USV zugeschrieben werden können. Die Befunde zeigen, dass weibliche Ratten in hohem Maße mit Annäherungsverhalten auf männliche 50-kHz USV reagieren, was bei dem Kontrollstimulus nicht der Fall gewesen ist. Dies unterstützt die Schlussfolgerung, dass männliche 50-kHz USV eine wichtige Rolle zur Herstellung von sozialer Nähe spielen und vermutlich auch an der Regulation von Sexualverhalten beteiligt sind.

STUDIE II: Seffer et al., 2014

Seffer D, Schwarting RKW, Wöhr M. (2014) Pro-social ultrasonic communication in rats: Insights from playback studies. *Journal of Neuroscience Methods*, 234, 73-81.

Deutsche Zusammenfassung:

Ultraschallvokalisationen (USV) von Nagetieren dienen als situationsabhängige affektive Signale und besitzen eine kommunikative Funktion. Bei Ratten existieren drei verschiedene Hauptkategorien von USV: (I) 40-kHz USV, die von Jungtieren während sozialer Isolation ausgesendet werden; (II) 22-kHz USV, die von juvenilen und adulten Ratten in aversiven Situationen emittiert werden, wie beispielsweise sozialer Unterlegenheit; und (III) 50-kHz USV, die von juvenilen und adulten Ratten in appetitiven Situationen produziert werden, wie dem sozialen Spielverhalten. In dieser Studie wird eine Übersicht zum Nachweis der kommunikativen Funktion von 50-kHz USV erstellt. Der Schwerpunkt liegt dabei auf Befunden, die in dem kürzlich entwickelten 50-kHz USV Playback-Paradigma auf einem Radiallabyrinth erhalten wurden. Es werden der Einfluss von Alter und Geschlecht der Versuchstiere, sowie der Effekt der verwendeten akustischen Stimuli dargestellt. Folgende Stimuli wurden bisher in diesem Paradigma getestet: (A) natürliche 50-kHz USV, (B) natürliche 22-kHz USV, (C) künstliche 50-kHz Sinustöne, (D) künstliches zeit- und amplitudenangepasstes weißes Rauschen und (E) Hintergrundrauschen. Sämtliche Studien, die das 50-kHz USV Playback-Paradigma verwendeten, lieferten Hinweise auf eine prosoziale affiliative Funktion der 50-kHz USV als soziale Kontaktrufe. Playback von 50-kHz USV löste konsistent Annäherungsverhalten beim Empfänger aus. Dies zeigt, dass mit diesem Paradigma das prosoziale Ultraschallkommunikationsverhalten von Ratten auf eine reliable und hoch standardisierte Weise untersucht werden kann. Dies erscheint von besonderer Relevanz beim Einsatz in Verbindung mit Tiermodellen für neuropsychiatrische Erkrankungen zu sein. Auf diesem Gebiet ist ein hoher Bedarf an verlässlichen Verhaltenstests zu verzeichnen, die Augenscheinvalidität für sozialkommunikative Defizite aufweisen, wie sie etwa bei Autismus und Schizophrenie zu beobachten sind. Das ermöglicht die Erforschung zugrunde liegender genetischer und neurobiologischer Veränderungen in diesen Modellen.

STUDIE III: Seffer et al., 2015

Seffer D, Ripberger H, Schwarting RKW, Wöhr M. (2015) Pro-social 50-kHz ultrasonic communication in rats: Post-weaning but not post-adolescent social isolation leads to social impairments – phenotypic rescue by re-socialization. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9:102.

Deutsche Zusammenfassung:

Ratten zeichnen sich durch ein stark ausgeprägtes Sozialverhalten aus. Der Spielphase während ihrer Adoleszenz wird eine wichtige Funktion für die Entwicklung von sozialer Kompetenz bzw. Ausprägung sozialer Fähigkeiten zugeschrieben. Juvenile soziale Isolation wird deshalb häufig bei Ratten als Tiermodell eingesetzt, um nachteilige Effekte auf das Sozialverhalten zu untersuchen und um Phänotypen mit klinischer Relevanz für neuropsychiatrische Erkrankungen zu induzieren, wie beispielsweise Schizophrenie. Das Kommunikationsverhalten ist ein elementarer Bestandteil des Sozialverhaltens von Ratten. Sie kommunizieren mit ihren Artgenossen über Rufe im Ultraschallbereich, den sogenannten Ultraschallvokalisationen (USV), die als situationsabhängige affektive Signale fungieren. Hochfrequente 50-kHz USV treten in appetitiven Situationen auf und lösen beim Empfänger Annäherungsverhalten aus, weshalb man diesem Ruf typ auch eine Funktion als sozialen Kontaktruf zuschreibt. Der Einfluss juveniler sozialer Isolation auf die sozio-affektive Informationsverarbeitung des Empfängers wurde bisher nicht untersucht. Aus diesem Grund wurde das etablierte 50-kHz USV Playback-Paradigma verwendet, um die Verhaltensantwort in Reaktion auf USV zu erfassen. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass juvenile soziale Isolation spezifisch die Reaktion auf prosoziale 50-kHz USV beeinträchtigte, während sich das Verhalten nach Präsentation von alarmierenden 22-kHz USV nicht unterschied. Gruppengehaltene Tiere zeigten das erwartete Annäherungsverhalten, welches nach eintägiger Kurzzeitisolation sogar noch verstärkt war. Letzteres könnte sich durch eine gesteigerte soziale Motivation erklären lassen. Im Gegensatz dazu konnte kein Annäherungsverhalten nach vierwöchiger Langzeitisolation festgestellt werden. Beachtenswerterweise konnten diese Defizite durch eine Resozialisierungsphase aufgehoben werden und wurden nicht durch post-adoleszente soziale Isolation induziert, was für eine kritische Phase in der sozialen Entwicklung während der Adoleszenz spricht. Diese Ergebnisse heben die Notwendigkeit von sozialen Erfahrungen zu einem frühen Entwicklungszeitpunkt hervor und sprechen für eine kritische Beteiligung von Spielverhalten an der sozio-affektiven Informationsverarbeitung bei Ratten.

PUBLIKATIONEN



STUDIE I:

Willadsen M, Seffer D, Schwarting RKW & Wöhr M. (2014) Rodent ultrasonic communication: Male pro-social 50-kHz ultrasonic vocalizations elicit social approach behavior in female rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, 128, 56-64.

Rodent Ultrasonic Communication: Male Prosocial 50-kHz Ultrasonic Vocalizations Elicit Social Approach Behavior in Female Rats (*Rattus norvegicus*)

Maria Willadsen, Dominik Seffer, Rainer K. W. Schwarting, and Markus Wöhr
Philipps-University of Marburg

Rats emit distinct types of ultrasonic vocalizations (USV), which serve as situation-dependent affective signals with important communicative functions. Low-frequency 22-kHz USV typically occur in aversive situations, such as social defeat, whereas high-frequency 50-kHz USV can be observed in appetitive situations, like rough-and-tumble-play in juveniles or mating in adults. The 2 main USV types serve distinct communicative functions and induce call-specific behavioral responses in the receiver. While 22-kHz USV probably serve as alarm calls, 50-kHz USV appear to serve a prosocial communicative function in the sexual and the nonsexual context. In the sexual context, however, this view has recently been challenged by playback studies where only very limited behavioral changes were observed in response to prosocial 50-kHz USV. The aim of the present study was therefore to test whether female rats display social approach behavior in response to male prosocial 50-kHz USV by means of our established playback paradigm. To this aim, we exposed female rats to playback of the following 2 acoustic stimuli: (a) natural male 50-kHz USV and (b) time- and amplitude-matched white noise, with the latter serving as acoustic control for novelty-induced changes in behavior not linked to the communicative function of male prosocial 50-kHz USV. Our present findings show that female rats display high levels of social approach behavior in response to male prosocial 50-kHz USV, but not time- and amplitude-matched white noise, supporting the conclusion that male prosocial 50-kHz USV are likely to play an important role in establishing social proximity and possibly regulate mating behavior.

Keywords: USV, ultrasonic vocalization, communication, social behavior, sexual behavior

Rats emit distinct types of ultrasonic vocalizations (USV), which serve as situation-dependent affective signals with important communicative functions (for reviews, see Brudzynski, 2013; Wöhr & Schwarting, 2013). In juvenile and adult rats, two main USV types are distinguished on the basis of sound frequency, namely low-frequency 22-kHz USV and high-frequency 50-kHz USV. Low-frequency 22-kHz USV typically occur in aversive situations, such as predator exposure (Blanchard, Agullana, McGee, Weiss, & Blanchard, 1992; Blanchard, Blanchard, Agullana, & Weiss, 1991; Blanchard, Blanchard, Rodgers, & Weiss, 1990), social defeat (Burgdorf et al., 2008; Sales, 1972a), or fear learning (Kim, Kim, Covey, & Kim, 2010; Wöhr & Schwarting, 2008; Wöhr, Borta, & Schwarting, 2005). High-frequency 50-kHz USV, in contrast, can be observed in appetitive situations. They are elicited most robustly during social interactions and occur in

juvenile rats, particularly during rough-and-tumble-play or when being tickled playfully (Brunelli et al., 2006; Burgdorf et al., 2008; Knutson, Burgdorf, & Panksepp, 1998; Panksepp & Burgdorf, 2000, 2003; Wöhr et al., 2009). In adult rats, highest rates of 50-kHz USV are observed during mating (Barfield, Auerbach, Geyer, & McIntosh, 1979; Burgdorf et al., 2008; McGinnis & Vakulenko, 2003; McIntosh & Barfield, 1980; Sales, 1972b; White, Cagiano, Moises, & Barfield, 1990). Emission rates of 50-kHz USV are closely associated with the rat's sexual behavioral repertoire displayed during mating (Barfield et al., 1979; McIntosh & Barfield, 1980) and the rewarding value of sexual contact (Bialy, Rydz, & Kaczmarek, 2000).

Low-frequency 22-kHz USV and high-frequency 50-kHz USV serve distinct communicative functions and induce call-specific behavioral responses in the receiver. Thus, 22-kHz USV emitted in aversive situations probably serve as alarm calls to warn conspecifics about external danger (Blanchard et al., 1991). In line with an alarm function, it was shown that rats are predisposed to associate the occurrence of 22-kHz USV with aversive events (Endres, Widmann, & Fendt, 2007), that these signals can elicit behavioral inhibition in the receiver (Blanchard et al., 1991; Brudzynski & Chiu, 1995; Burman, Ilyat, Jones, & Mendl, 2007; Sales, 1991; Wöhr & Schwarting, 2007, 2008), and that they are a major factor for social transmission of fear (Kim et al., 2010; Wöhr & Schwarting, 2008).

In contrast, 50-kHz USV appear to serve a prosocial communicative function in the sexual and the nonsexual context. We have

This article was published Online First November 4, 2013.

Maria Willadsen, Dominik Seffer, Rainer K. W. Schwarting, and Markus Wöhr, Behavioral Neuroscience, Experimental and Biological Psychology, Philipps-University of Marburg, Marburg, Germany.

We thank Charlotte Köhne for her help in data acquisition. Markus Wöhr is supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (WO 1732/1-1).

Correspondence concerning this article should be addressed to Markus Wöhr, Behavioral Neuroscience, Experimental and Biological Psychology, Philipps-University of Marburg, Gutenbergstr. 18, 35032 Marburg, Germany. E-mail: markus.woehr@staff.uni-marburg.de

recently conducted a series of experiments to understand the communicative function of 50-kHz USV in the nonsexual context. By performing playback studies, we repeatedly demonstrated that male 50-kHz USV, but not male 22-kHz USV, lead to social approach behavior in male receiver, supporting the notion that 50-kHz USV serve as social contact calls in the nonsexual context (Wöhr & Schwarting, 2007, 2009, 2012). Social approach behavior elicited by male prosocial 50-kHz USV is particularly strong in juvenile male rats (Wöhr & Schwarting, 2007, 2009, 2012), in line with a peak in the production of prosocial 50-kHz USV during the rough-and-tumble-play period (Brunelli et al., 2006; Burgdorf et al., 2008; Knutson et al., 1998; Panksepp & Burgdorf, 2000, 2003). In adult male rats, however, the level of social approach behavior is clearly reduced (Wöhr & Schwarting, 2007, 2009). Similarly, playback of male prosocial 50-kHz USV elicits substantial ultrasonic calling in juveniles (Wöhr & Schwarting, 2009), but very low rates in adults (Wöhr & Schwarting, 2007, 2009). Together, this suggests that male prosocial 50-kHz USV serve important communicative functions as social contact calls to (re)establish or maintain social proximity, particularly in juveniles. This view is supported by findings from Sivy and Panksepp (1987) who found that deafening or devocalizing rats affects rough-and-tumble-play. Also, rats spent more time with conspecifics, which vocalize a lot, than with ones characterized by limited calling behavior (Panksepp, Gordon, & Burgdorf, 2002).

Besides this, 50-kHz USV appear to also serve a prosocial communicative function in the sexual context (for review, see Barfield & Thomas, 1986). As shown in devocalization studies, females display decreased darting when confronted with a devocalized mating partner and are more likely to move away while being mounted by a devocalized male before assuming full lordosis (Thomas, Talalas, & Barfield, 1981, Thomas, Howard, & Barfield, 1982; White & Barfield, 1990; White et al., 1990). Importantly, female receptive behavior was restored by playback of male prosocial 50-kHz USV, largely by increasing the likelihood that the female remains immobile long enough for the male to obtain an intromission (White & Barfield, 1990). Also, females displayed more darts directed towards devocalized males when male prosocial 50-kHz USV were played in his vicinity (Thomas et al., 1982). Furthermore, darting was found to be facilitated by male prosocial 50-kHz USV played to females prior to mating (Geyer, McIntosh, & Barfield, 1978) and McIntosh, Barfield, and Geyer (1978) showed that male prosocial 50-kHz USV even enhanced darting in females receiving minimal sexual stimulation during exposure to a castrated male. When given the choice in a Y maze, females showed a preference for the side with male prosocial 50-kHz USV over silence (Barfield et al., 1979). Finally, male prosocial 50-kHz USV were reported to elicit ultrasonic calling in females (White, Gonzales, & Barfield, 1993), yet not consistently (White, Colona, & Barfield, 1991). Ultrasonic calling in females is believed to play an important role in sexual behavior as well (White & Barfield, 1987, 1989; White et al., 1991).

In contrast to these findings, however, no evidence for an intersexual communicative function of ultrasonic calling in females was obtained by Snoeren and Ågmo (2013a) in a very recent playback study. Furthermore, Snoeren and Ågmo (2013b) also did not find clear behavioral changes in females exposed to male prosocial 50-kHz USV and concluded that they have a most limited, if any, incentive value for the sexually receptive female

rat. The aim of the present study was therefore to test whether female rats display social approach behavior in response to male prosocial 50-kHz USV by means of our established playback paradigm (Wöhr & Schwarting, 2007, 2009, 2012). To this aim, we exposed female rats to playback of the following two acoustic stimuli: (a) natural male 50-kHz USV and (b) time- and amplitude-matched white noise, with the latter serving as acoustic control for novelty-induced changes in behavior not linked to the communicative function of male prosocial 50-kHz USV. Our results show that female rats display high levels of social approach behavior in response to male prosocial 50-kHz USV, but not time- and amplitude-matched white noise.

Materials and Methods

Animals and Housing

Fifteen female Wistar rats (RccHan:WIST, Harlan, Venray, The Netherlands) served as subjects (body weight at the time point of experiment: 249.29 ± 3.41 g; range: 230–270 g). Rats were housed in groups of five on Tapvei peeled aspen bedding (indulab ag, Gams, Switzerland) in polycarbonate Macrolon type IV cages (size: 380 × 200 × 590 mm, plus high stainless steel covers) in an animal room with a 12:12 h light/dark cycle (lights on 8–20 h) where the environmental temperature was maintained between 20°C and 23°C (humidity: 30–50%). Lab chow (Altromin, Lage, Germany) and water (0.0004% HCl-solution) were available ad libitum. All female rats used in the experiment had prior sexual contact. After arrival in the laboratory with ~2 months of age (150–175 g), female rats were allowed to adjust to housing and light conditions for 1 week. Then they were mated with male Wistar rats and all delivered ~3 weeks later, with pups being weaned on postnatal day 21. One month after delivery, the playback experiment was conducted. All female rats were handled for 3 days in a standardized way for 5 min prior to testing. Body weight was determined on all handling days and after testing. All experimental procedures were performed according to legal requirements of Germany and approved by the ethical committee of the local government (Regierungspräsidium, Gießen, Germany).

Experimental Setting

Testing for behavioral changes in response to playback of acoustic stimuli was performed on an elevated radial arm maze (for details see: Wöhr & Schwarting, 2007). Acoustic stimuli were presented through an ultrasonic speaker (ScanSpeak, Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany) using an external sound card with a sampling rate of 192 kHz (Fire Wire Audio Capture FA-101, Edirol, London, UK) and a portable ultrasonic power amplifier with a frequency range of 1–125 kHz (Avisoft Bioacoustics; for details, see: Wöhr & Schwarting, 2007). The loudspeaker was placed 20 cm away from the end of one arm at a height of 52 cm above the floor. An additional, but inactive ultrasonic speaker was arranged symmetrically opposite to it. Female rats were tested under red light (~10 lux) in a testing room with no other rats present. The experimenter was not present in the testing room. Stimulus application and animal observation was performed in a separate experimental control room. All behavioral tests were conducted between 9 and 16 h. Prior to each test, behavioral

equipment was cleaned using 0.1% acetic acid solution followed by drying.

Acoustic Stimuli

To test whether female rats display social approach behavior in response to male prosocial 50-kHz USV, female rats were exposed to playback of the following two acoustic stimuli: (a) natural male 50-kHz USV and (b) time- and amplitude-matched white noise, with the latter serving as acoustic control for novelty-induced changes in behavior not linked to the communicative function of male prosocial 50-kHz USV (for a detailed description of the acoustic stimuli used and representative spectrograms, see Wöhr & Schwarting, 2007, 2009, 2012). Briefly, playback of natural male 50-kHz USV consisted of 221 calls recorded from an adult male Wistar rat during exploration of a cage containing scents of a cage mate after being separated from it (for setting and recording, see Wöhr, Houx, Schwarting, & Spruijt, 2008). This context was chosen for recording since playback of natural male 50-kHz USV recorded during tickling or exploration of an empty cage had no or only minor effects on the behavior of the receiver (Burman et al., 2007; Endres et al., 2007). Besides natural male 50-kHz USV, playback contained background noise, produced by the rat while exploring the cage. Playback of time- and amplitude-matched white noise was generated with the computer software Avisoft SASLab Pro (Version 4.2, Avisoft Bioacoustics) by replacing the calls in the original natural 50-kHz USV stimulus with white noise signals, which durations and amplitude modulations correspond to that of the original 50-kHz USV. To control for background noise present in the natural 50-kHz USV stimulus, background noise was added to the time- and amplitude-matched white noise stimulus. Both acoustic stimuli were presented at about 69 dB (measured from a distance of 40 cm) with a sampling rate of 192 kHz in 16 bit format. Playback of acoustic stimuli was monitored by two UltraSoundGate Condenser Microphones (CM 16; Avisoft Bioacoustics; for details, see Wöhr & Schwarting, 2007).

Experimental Procedure

Rats were placed onto the central platform of the radial arm maze with their body axis at an angle of 90 degrees to the two ultrasonic speakers. After an initial habituation phase of 15 min where no acoustic stimuli were presented, the rat was exposed to acoustic stimuli twice for 1 min, each followed by an inter-stimulus-interval of 10 min (total test duration: 37 min). Each rat was exposed to natural 50-kHz USV and time- and amplitude-matched white noise. Stimuli were presented in a counterbalanced manner to account for the possible impact of serial effects.

Recording and Analysis of Animal Activity

Behavior was monitored by a video camera (Panasonic WV-BP 330/GE, Hamburg, Germany) from about 150 cm above the maze, which fed into an external multimedia hard drive (ScreenPlay Pro HD, Iomega, San Diego, CA). Behavioral analysis was performed in two ways, as previously described (Wöhr & Schwarting, 2007): (a) An automated video tracking system (Ethovision, Noldus, Wageningen, The Netherlands) was used to measure total distance traveled (cm). For the automated analysis, input filters were acti-

vated to avoid an overestimation of locomotor activity due to head movements (minimal distance moved: 8 cm). Distance traveled served as a measure of general locomotor activity. (b) A trained observer scored the videos for number of entries and the time spent on the three arms proximal to or distal from the active ultrasonic loudspeaker. An arm entry was counted when all four paws were in the arm. Arm entries and time spent on arms served as measures for stimulus-directed locomotor activity.

Statistical Analysis

To test whether locomotor activity, proximal and distal arm entries, and the time spent thereon were affected by the presentation of acoustic stimuli, analyses of variance (ANOVAs) for repeated measurements with the within-subject factor test phase (including the 1-min playback phase and the 1-min prior and after playback) were calculated. ANOVAs were followed by paired *t* tests when appropriate ($p < .050$). Paired *t* tests were also used to compare proximal and distal arm entries and the time spent thereon during the 1-min playback phase and between acoustic stimuli. One female was excluded because of incorrect playback of male prosocial 50-kHz USV, resulting in $N = 14$ females for statistical analysis. As measure of effect size Cohen's *d* was calculated, with $d > 0.200$, $d > 0.500$, and $d > 0.800$ considered as small, medium, and large effect sizes, respectively. A *p* value of $< .050$ was considered statistically significant. Data are presented as means \pm SEM, plus 95% confidence intervals (CI) in the text. In the figures, data are presented as means \pm 95% CI.

Results

General Locomotor Activity

Locomotor activity during playback of male prosocial 50-kHz USV was significantly higher than during playback of time- and amplitude-matched white noise ($t_{13} = 3.364$; $p = .005$; $d = 1.230$). Female rats traveled 112.41 ± 19.87 (CI: 69.48–155.34) cm/min during playback of natural male 50-kHz USV, but only 34.88 ± 13.15 (CI: 6.46–63.30) cm/min in response to time- and amplitude-matched white noise. This difference is due to the fact that time- and amplitude-matched white noise led to behavioral inhibition ($F_{2,26} = 12.741$; $p < .001$), as indicated by a significant reduction in the distance traveled when comparing the distance traveled during playback and the minute prior to it (109.93 ± 18.39 [CI: 70.20–149.66] cm/min; $t_{13} = 4.360$; $p = .001$; $d = 1.255$). Behavioral inhibition was still evident in the minute after playback (35.11 ± 7.91 [CI: 18.03–52.19] cm/min; $t_{13} = 3.830$; $p = .002$; $d = 1.413$). In contrast, no behavioral inhibition was observed in response to natural male 50-kHz USV ($F_{2,26} = 0.097$; $p = .908$) and locomotor activity in the minute before, during, and after playback did not differ (not shown in detail; all $p > .100$).

Stimulus-Directed Locomotor Activity: Playback Phase

Locomotor activity during playback of male prosocial 50-kHz USV was clearly directed towards the sound source, that is, the active ultrasonic speaker. During playback of natural male 50-kHz USV, female rats displayed social approach behavior and entered arms proximal to the sound source significantly more often than

the distal ones (1.71 ± 0.30 [CI 1.06–2.37] vs. 0.14 ± 0.10 [CI: -0.07 – 0.35], respectively; $t_{13} = 5.785$; $p < .001$; $d = 1.859$; Figure 1A). Furthermore, female rats spent significantly more time on proximal than on distal arms in response to presentation of natural male 50-kHz USV ($t_{13} = 9.522$; $p < .001$; $d = 1.378$; Figure 1B). During the 60-s presentation, female rats spent 45.87 ± 4.29 (CI: 36.61–55.14) s/min proximal, whereas only 1.11 ± 0.68 (CI: -0.34 – 2.57) s/min distal, indicating a strong social approach response. Importantly, social approach behavior was only seen in response to playback of natural male 50-kHz USV, but not in response to time- and amplitude-matched white noise that served as acoustic control for novelty-induced changes in behavior not

linked to the communicative function of male prosocial 50-kHz USV. During playback of time- and amplitude-matched white noise, female rats did not display a preference for proximal arms and entered proximal and distal arms equally often (0.29 ± 0.13 [CI: 0.02–0.56] vs. 0.14 ± 0.14 [CI: -0.17 – 0.45], respectively; $t_{13} = 0.694$; $p = .500$; Figure 1A). Furthermore, the time females spent on proximal and distal arms did not differ significantly (13.74 ± 5.46 [CI: 1.94–25.54] s/min vs. 3.03 ± 3.03 [CI: -3.51 – 9.56] s/min, respectively; $t_{13} = 1.590$; $p = .136$; Figure 1B). When comparing the behavioral changes displayed in response to natural male 50-kHz USV with the ones that occurred in response to time- and amplitude-matched white noise, proximal arm entries elicited by natural male 50-kHz USV were significantly higher ($t_{13} = 4.163$; $p = .001$; $d = 1.641$). Also, the time spent proximal was significantly higher during playback of natural male 50-kHz USV than during time- and amplitude-matched white noise ($t_{13} = 4.708$; $p < .001$; $d = 1.748$). This is in support of the notion that social approach behavior in female rats specifically occurs in response to natural male 50-kHz USV and reflects their important communicative function as social contact calls to (re)establish and maintain social proximity.

Stimulus-Directed Locomotor Activity: Time Course—50-kHz USV

A detailed time course analysis of the behavioral changes elicited by male prosocial 50-kHz USV further supports the robustness of the observed behavioral effects. Thus, the occurrence of proximal arm entries was clearly affected by playback of natural male 50-kHz USV ($F_{2,26} = 7.813$; $p = .002$), and distal arm entries tended to be affected ($F_{2,26} = 2.935$; $p = .071$; Figure 2A). Proximal arm entries significantly increased during playback as compared to the minute prior to it (0.71 ± 0.19 [CI: 0.29–1.13]; $t_{13} = 2.463$; $p = .029$; $d = 1.047$). In contrast, distal arm entries significantly decreased during playback as compared to baseline (0.64 ± 0.20 [CI: 0.21–1.07]; $t_{13} = 2.188$; $p = .047$; $d = 0.853$). Similarly, the time spent on proximal and distal arms was clearly affected by playback of natural male 50-kHz USV ($F_{2,26} = 20.396$; $p < .001$ and $F_{2,26} = 9.748$; $p = .001$, respectively; Figure 2B). In the same manner as arm entries, the time spent on proximal arms significantly increased during playback as compared to the minute prior to it (11.13 ± 4.25 [CI 1.95–20.31] s/min; $t_{13} = 4.495$; $p = .001$; $d = 2.174$), whereas the time spent on distal arms significantly decreased during playback as compared to baseline (17.62 ± 4.09 [CI 8.77–26.46] s/min; $t_{13} = 3.898$; $p = .002$; $d = 1.613$). Importantly, there was no preference for proximal arms before playback of natural male 50-kHz USV, as assessed by proximal and distal arm entries ($t_{13} = 0.268$; $p = .793$) and time spent thereon ($t_{13} = 0.864$; $p = .403$).

Stimulus-Directed Locomotor Activity: Time Course—White Noise

In addition, a detailed time course analysis of the behavior displayed before, during, and after playback of time- and amplitude-matched white noise further supports the conclusion that social approach behavior in female rats specifically occurs in response to natural male 50-kHz USV. Thus, the occurrence of proximal and distal arm entries was clearly not affected by play-

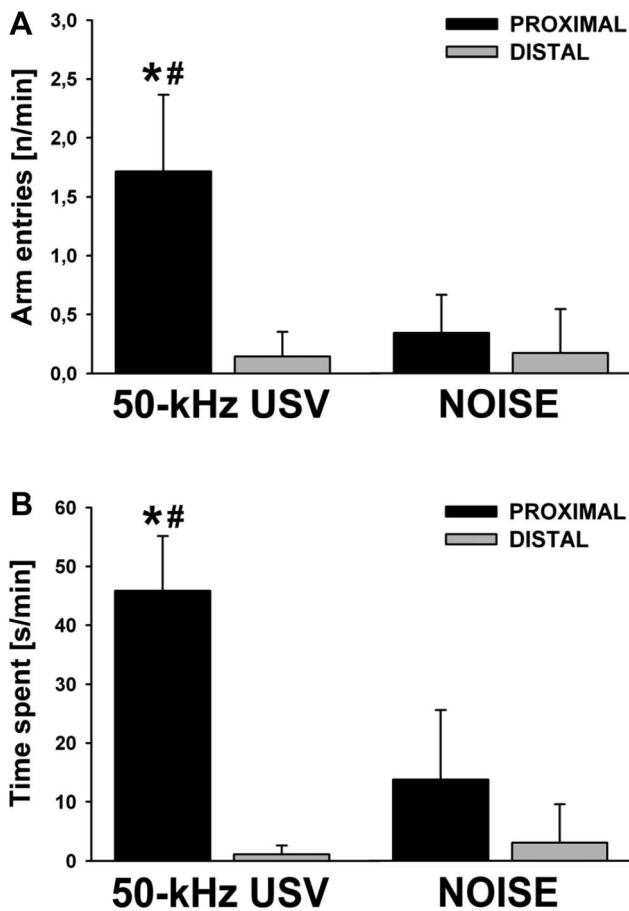


Figure 1. Stimulus-directed locomotor activity displayed by female rats in response to playback of male prosocial 50-kHz ultrasonic vocalizations (USV) and time- and amplitude-matched white noise. A: Number of proximal (PROXIMAL; black bars) and distal (DISTAL; gray bars) arm entries per minute (n/min) in female rats exposed to playback of natural male 50-kHz USV (50-kHz USV; left) and time- and amplitude-matched white noise (NOISE; right). B: Time spent on proximal (PROXIMAL; black bars) and distal (DISTAL; gray bars) arms per minute (s/min) in female rats exposed to playback of natural male 50-kHz USV (50-kHz USV; left) and time- and amplitude-matched white noise (NOISE; right). Data are presented as means \pm 95% confidence intervals (CI; SEM are reported in the text). * $p < .050$, for PROXIMAL 50-kHz USV vs. DISTAL 50-kHz USV. # $p < .050$, for PROXIMAL 50-kHz USV vs. PROXIMAL NOISE.

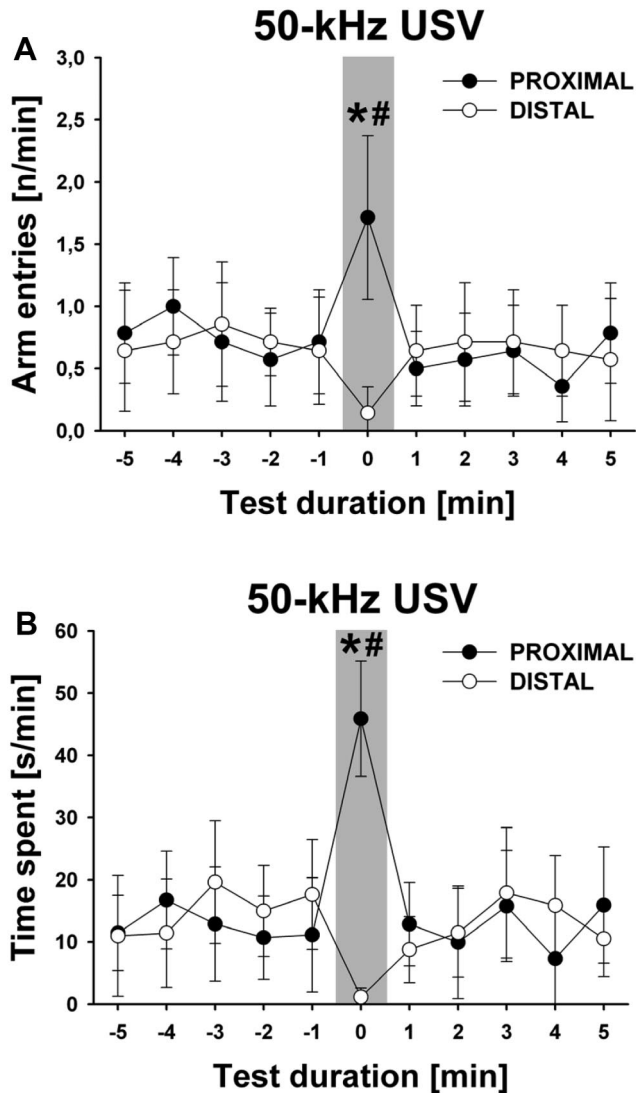


Figure 2. Time course depicting stimulus-directed locomotor activity displayed by female rats in response to playback of male prosocial 50-kHz ultrasonic vocalizations (USV). **A:** Number of proximal (PROXIMAL; black circles) and distal (DISTAL; white circles) arm entries per minute (n/min) in female rats exposed to playback of natural male 50-kHz USV. **B:** Time spent on proximal (PROXIMAL; black circles) and distal (DISTAL; white circles) arms per minute (s/min) in female rats exposed to playback of natural male 50-kHz USV. The time course panel illustrates the test session in 1-min time blocks. Number of arm entries and the time spent thereon is shown for the 1-min playback phase (min 0; highlighted in gray) as well as for the 5 min before (min -5 to -1) and after playback (min 1 to 5). Data are presented as means \pm 95% confidence intervals (CI; SEM are reported in the text). * $p < .050$, for PROXIMAL vs. DISTAL. # $p < .050$, for PROXIMAL against baseline.

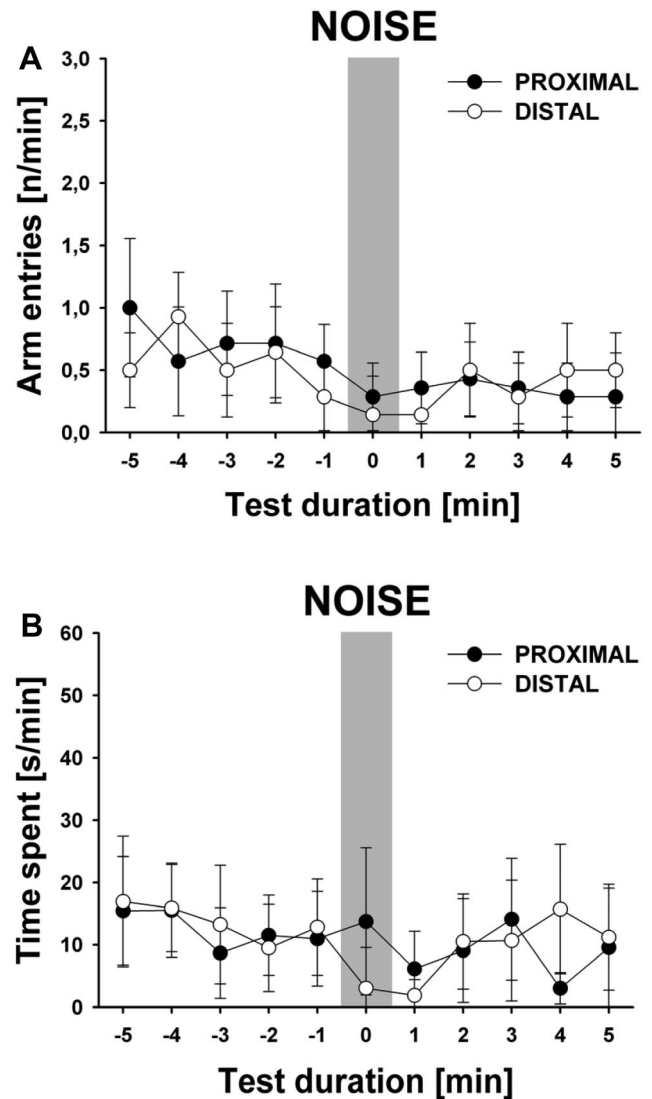


Figure 3. Time course depicting the lack of stimulus-directed locomotor activity displayed by female rats in response to playback of time- and amplitude-matched white noise. **A:** Number of proximal (PROXIMAL; black circles) and distal (DISTAL; white circles) arm entries per minute (n/min) in female rats exposed to playback of time- and amplitude-matched white noise. **B:** Time spent on proximal (PROXIMAL; black circles) and distal (DISTAL; white circles) arms per minute (s/min) in female rats exposed to playback of time- and amplitude-matched white noise. The time course panel illustrates the test session in 1-min time blocks. Number of arm entries and the time spent thereon is shown for the 1-min playback phase (min 0; highlighted in gray) as well as for the 5 min before (min -5 to -1) and after playback (min 1 to 5). Data are presented as means \pm 95% confidence intervals (CI; SEM are reported in the text). * $p < .050$, for PROXIMAL vs. DISTAL. # $p < .050$, for PROXIMAL against baseline.

back of time- and amplitude-matched white noise ($F_{2,26} = 1.496$; $p = .243$ and $F_{2,26} = 0.481$; $p = .623$, respectively; **Figure 3A**). Proximal and distal arm entries did not significantly change during playback as compared to the minute prior to it (0.57 ± 0.14 [CI: 0.27–0.87]; $t_{13} = 1.749$; $p = .104$ and 0.64 ± 0.20 [CI: 0.21–1.07]; $t_{13} = 1.000$; $p = .336$, respectively). Similarly, the time

spent on proximal arms was not significantly affected by playback of time- and amplitude-matched white noise ($F_{2,26} = 1.138$; $p = .336$), yet the time spent on distal arms was ($F_{2,26} = 5.103$; $p = .014$; **Figure 3B**). In the same manner as arm entries, the time spent on proximal arms did not significantly change during playback as compared to the minute prior to it (10.96 ± 3.52 [CI: 3.35–18.58]

s/min; $t_{1,3} = 0.445$; $p = .657$), whereas the time spent on distal arms tended to decrease during playback as compared to baseline (12.83 ± 3.59 [CI: 5.08–20.57] s/min; $t_{1,3} = 2.062$; $p = .060$), probably reflecting a trend for higher center times.

Ultrasonic Vocalizations

Substantial ultrasonic calling (>10 USV) by female rats was observed in only 2 out of 14 females in response to playback of male prosocial 50-kHz USV. One of them emitted 12 calls with an average duration of 23 ms and an average peak frequency of 55 kHz, typical for frequency-modulated 50-kHz USV. The other one emitted 14 calls with an average duration of 950 ms and an average peak frequency of 30 kHz, with most of them being 22-kHz USV; just the very first two calls were flat 50-kHz USV. Substantial ultrasonic calling (>10 USV) by female rats was not seen before and during playback of natural male 50-kHz USV and was also not observed before, during, and after playback of time- and amplitude-matched white noise.

Discussion

Our results show that female rats display high levels of social approach behavior in response to male prosocial 50-kHz USV, but not time- and amplitude-matched white noise. Effect sizes are large. The finding that natural male 50-kHz USV elicit social approach behavior in female rats is consistent with observational, devocalization, and playback studies, indicating that male 50-kHz USV serve a prosocial communicative function in the sexual context (Barfield et al., 1979; Geyer et al., 1978; McIntosh et al., 1978; Thomas et al., 1981, 1982; White & Barfield, 1990; White et al., 1990, 1991, 1993). When given the choice, females directed less darts towards a devocalized mating partner than towards an intact one and moved away more often while being mounted by a devocalized male (Thomas et al., 1981, 1982; White & Barfield, 1990; White et al., 1990). By means of playback of male prosocial 50-kHz USV, female receptive behavior was restored and they were found to display more darts directed towards devocalized males when tape-recorded male prosocial 50-kHz USV were played back (Thomas et al., 1982; White & Barfield, 1990). Probably most impressively, McIntosh et al. (1978) were able to demonstrate that darting is enhanced by means of male prosocial 50-kHz USV in females receiving very low levels of sexual stimulation during exposure to a castrated male. Without being mounted, females even displayed a few lordosis responses (McIntosh et al., 1978). Most similar to our present findings, Barfield et al. (1979) found that females show a preference for the side with male prosocial 50-kHz USV over silence when given the choice. Our finding that natural male 50-kHz USV elicit social approach behavior in female rats is further in line with mouse devocalization (Pomerantz, Nunez, & Bean, 1983) and playback (Pomerantz et al., 1983; Hammerschmidt, Radyushkin, Ehrenreich, & Fischer, 2009) studies, showing that also in mice ultrasonic calling plays an important role in inducing social proximity and regulating sexual behavior.

However, our present findings are in stark contrast to a very recent playback experiment conducted by Snoeren and Ågmo (2013b), who did not find clear behavioral changes in females exposed to male prosocial 50-kHz USV and concluded that they

have a most limited, if any, incentive value for the sexually receptive female rat. There are several differences between our study and the study by Snoeren and Ågmo (2013b) that may explain the different outcomes. First of all, females used for playback differed in many aspects between experiments. Specifically, although females in both experiments had sexual experience, in our study, all females were mated and delivered about 3 weeks later. One month thereafter, the playback experiment was conducted. In contrast, the females used in the study by Snoeren and Ågmo (2013b) did not deliver pups. Their females, however, were ovariectomized and progesterone was given before the playback experiment, meaning that Snoeren and Ågmo (2013b) tested their females during the sexually active period. Yet, because males also display social approach behavior in response to playback of natural male prosocial 50-kHz USV (Wöhr & Schwarting, 2007, 2009, 2012), potential differences in menstrual cycle are unlikely to explain the different outcomes in the two experiments. Second, the test environment differed. While we used a radial arm maze without walls to avoid reflections of the high-frequency acoustic stimuli, Snoeren and Ågmo (2013b) used an arena with walls, increasing the likelihood of reflections that possibly affected the quality of the acoustic stimuli and thus might have hindered localization of the stimulus source, although it has to be noted that Snoeren and Ågmo (2013b) did not report reflections. Third, the procedure to elicit 50-kHz USV for playback also differed. We presented natural male 50-kHz USV that were recorded from a male rat after being separated from a male cage mate while exploring an environment containing its scents (Wöhr et al., 2008). Snoeren and Ågmo (2013b) exposed males to females to elicit 50-kHz USV. Fourth, choice of equipment used for playback of acoustic stimuli might have mattered as well. Whereas we used the Avisoft system (Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany), Snoeren and Ågmo (2013b) used the Sonotrack system from Metris (Metris, Hoofddrop, The Netherlands). Finally, and probably most importantly, females in our study were exposed to playback of natural male 50-kHz USV only once for 1 min. Snoeren and Ågmo (2013b), however, used a Latin square design and repeatedly exposed females to acoustic stimuli with durations of up to 10 min. It is therefore possible that the very limited behavioral changes in response to male prosocial 50-kHz USV observed by Snoeren and Ågmo (2013b) are due to the fact that female rats learned during repeated testing that there is no opportunity to interact with a male rat. In fact, in studies with female mice, it was recently shown that females do not show a preference for male ultrasonic calling when being repeatedly exposed to them. Social approach behavior was only evident during the very first presentation (Hammerschmidt et al., 2009). Moreover, in a recent rat study, we showed that social approach behavior elicited by natural male 50-kHz USV in male receiver is most prominent during the first minute of playback, while social approach behavior is weak or even absent in subsequent minutes (Wöhr & Schwarting, 2012). As in mice, playback did not elicit social approach behavior when rats were repeatedly exposed. Even with an intertrial interval of 1 week, social approach behavior was not seen during the second exposure to natural male 50-kHz USV, which is probably a memory-dependent mechanism (Wöhr & Schwarting, 2012).

Although our finding that natural male 50-kHz USV elicit social approach behavior in female rats is also consistent with our playback experiments using male receivers (Wöhr & Schwarting,

2007, 2009, 2012), there are some interesting differences that may indicate relevant sex differences. As compared to previous studies using the same playback paradigm the following differences between males and females are prominent: First, females did not show increased levels of locomotor activity in response to natural male 50-kHz USV. This is probably due to the fact that locomotor activity before playback was clearly higher in adult females than baseline locomotor activity in adult males. In fact, baseline locomotor activity in females was even higher than the peak of locomotor activity seen in adult males in response to playback of natural male 50-kHz USV (Wöhr & Schwarting, 2007, 2009). Besides this sex-dependent difference in baseline activity, the lack of a further increase in locomotor activity in females might be linked to the communicative function of male prosocial 50-kHz USV as well. Male prosocial 50-kHz USV have repeatedly been shown to lead to reduced behavioral activity in females after social proximity is established (Barfield et al., 1979; Geyer et al., 1978; McIntosh et al., 1978; Thomas et al., 1981, 1982; White & Barfield, 1990; White et al., 1990). Second, the level of social approach behavior elicited by natural male 50-kHz USV in adult females was clearly higher than the one observed in adult males (Wöhr & Schwarting, 2007, 2009). Whereas adult males spent between 10 to 30 s per min on proximal arms close to the ultrasonic loudspeaker emitting natural male 50-kHz USV (Wöhr & Schwarting, 2007, 2009), adult female rats spent about 45 s per min on proximal arms in the present study. The increased level of social approach behavior in females might reflect higher biological relevance of the signals for females, particularly in adulthood. In male rats social approach behavior elicited by natural male 50-kHz USV is particularly strong in juveniles (Wöhr & Schwarting, 2007, 2009, 2012); that is, at a time point where they presumably are biologically most relevant, namely during the rough-and-tumble-play period when the production of prosocial 50-kHz USV peaks (Brunelli et al., 2006; Burgdorf et al., 2008; Knutson et al., 1998; Panksepp & Burgdorf, 2000, 2003). Finally, two out of the 14 female rats tested displayed substantial ultrasonic calling in response to playback of natural male 50-kHz USV. In none of our playback studies using adult male rats, we have detected substantial ultrasonic calling in response to natural male USV (Wöhr & Schwarting, 2007, 2009), whereas in juvenile rats such substantial ultrasonic calling appears to be a lot more common (Wöhr & Schwarting, 2007, 2009). However, it has to be emphasized that two out of 14 female rats is still a surprisingly low number—even when considering the fact that a rather conservative threshold of more than 10 USV was applied. Despite clear behavioral changes, the weakness of the ultrasonic calling response in female rats may therefore challenge the view that male 50-kHz USV serve important communicative functions but appears to be consistent with previous studies in rats. Although White et al. (1993) reported that male prosocial 50-kHz USV elicit ultrasonic calling in females, no such effect was observed in another study (White et al., 1991). There are several possible reasons for the stark contrast between the strong level of social approach behavior and the weak ultrasonic calling response elicited by natural male 50-kHz USV, with two of them being particularly likely. First of all, additional male cues, for instance scent marks, might be needed to elicit robust ultrasonic calling in the majority of females. Second and as outlined above, the natural male 50-kHz USV played back in the present study were recorded from a male rat after being separated

from a male cage mate while exploring an environment containing its scents (Wöhr et al., 2008). It is possible, however, that 50-kHz USV emitted by males differ in some acoustic features depending on social context, with only 50-kHz USV emitted by males in the sexual context eliciting ultrasonic calling in females.

Social approach behavior in female rats specifically occurred in response to natural male 50-kHz USV, but not time- and amplitude-matched white noise. This finding is again in line with our previous work in males (Wöhr & Schwarting, 2012) and supports the notion that behavioral effects depend on the frequency characteristics of 50-kHz USV, with social approach behavior occurring only when the sound energy is concentrated to a critical frequency band in the 50-kHz ultrasonic range. In contrast to natural male 50-kHz USV, time- and amplitude-matched white noise led to behavioral inhibition and no evidence for social approach behavior in response to it was obtained. The induction of behavioral inhibition by playback of time- and amplitude-matched white noise shows that it is not sufficient for the induction of female social approach behavior that temporal features, such as call duration, repetition rate, and bout structure, as well as amplitude features of an acoustic stimulus are identical to that of natural male 50-kHz USV. Behavioral inhibition seen in response to playback of time- and amplitude-matched white noise is probably caused by sound energy within the critical frequency range for 22-kHz USV. Such 22-kHz USV occur in aversive situations, like predator exposure (Blanchard et al., 1990, 1991, 1992), social defeat (Burgdorf et al., 2008; Sales, 1972a), or fear learning (Kim et al., 2010; Wöhr & Schwarting, 2008; Wöhr et al., 2005). It is known that rats are predisposed to associate the occurrence of 22-kHz USV with aversive events (Endres et al., 2007) and particularly after such a learning experience, 22-kHz USV lead to behavioral inhibition in conspecifics (Blanchard et al., 1991; Kim et al., 2010; Wöhr & Schwarting, 2008). The opposed behavioral responses elicited by 22-kHz and 50-kHz USV were found to be paralleled by distinct brain activation patterns. While alarming 22-kHz USV induce activation in brain areas implicated in fear processing, such as amygdala and central gray (Parsana, Li, & Brown, 2012; Sadananda, Wöhr, & Schwarting, 2008), prosocial 50-kHz USV are followed by activation in brain areas implicated in appetitive processing, most prominently the nucleus accumbens (Sadananda et al., 2008) together with an inhibition of the amygdala (Parsana et al., 2012).

In summary, our present findings show that female rats display high levels of social approach behavior in response to male prosocial 50-kHz USV, but not time- and amplitude-matched white noise, supporting the conclusion that male prosocial 50-kHz USV are likely to play an important role in establishing social proximity and possibly regulate mating behavior as suggested by Barfield and Thomas (1986).

References

- Barfield, R. J., Auerbach, P., Geyer, L. A., & McIntosh, T. K. (1979). Ultrasonic vocalizations in rat sexual behavior. *American Zoologist*, *19*, 469–480.
- Barfield, R. J., & Thomas, D. A. (1986). The role of ultrasonic vocalizations in the regulation of reproduction in rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *474*, 33–43. doi:10.1111/j.1749-6632.1986.tb27996.x

- Bialy, M., Rydz, M., & Kaczmarek, L. (2000). Precontact 50-kHz vocalizations in male rats during acquisition of sexual experience. *Behavioral Neuroscience*, *114*, 983–990. doi:10.1037/0735-7044.114.5.983
- Blanchard, R. J., Agullana, R., McGee, L., Weiss, S., & Blanchard, D. C. (1992). Sex differences in the incidence and sonographic characteristics of antipredator ultrasonic cries in the laboratory rat (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, *106*, 270–277. doi:10.1037/0735-7036.106.3.270
- Blanchard, R. J., Blanchard, D. C., Agullana, R., & Weiss, S. M. (1991). Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. *Physiology & Behavior*, *50*, 967–972. doi:10.1016/0031-9384(91)90423-L
- Blanchard, R. J., Blanchard, D. C., Rodgers, J., & Weiss, S. M. (1990). The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *14*, 463–472. doi:10.1016/S0149-7634(05)80069-7
- Brudzynski, S. M. (2013). Ethotransmission: Communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Current Opinion in Neurobiology*, *23*, 310–317. doi:10.1016/j.conb.2013.01.014
- Brudzynski, S. M., & Chiu, E. M. C. (1995). Behavioural responses of laboratory rats to playback of 22 kHz ultrasonic calls. *Physiology & Behavior*, *57*, 1039–1044. doi:10.1016/0031-9384(95)00003-2
- Brunelli, S. A., Nie, R., Whipple, C., Winiger, V., Hofer, M. A., & Zimmerberg, B. (2006). The effects of selective breeding for infant ultrasonic vocalizations on play behavior in juvenile rats. *Physiology & Behavior*, *87*, 527–536. doi:10.1016/j.physbeh.2005.11.020
- Burgdorf, J., Kroes, R. A., Moskal, J. R., Pfaus, J. G., Brudzynski, S. M., & Panksepp, J. (2008). Ultrasonic vocalizations of rats during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. *Journal of Comparative Psychology*, *122*, 357–367. doi:10.1037/a0012889
- Burman, O. H. P., Ilyat, A., Jones, G., & Mendl, M. (2007). Ultrasonic vocalizations as indicators of welfare for laboratory rats (*Rattus norvegicus*). *Applied Animal Behaviour Science*, *104*, 116–129. doi:10.1016/j.applanim.2006.04.028
- Endres, T., Widmann, K., & Fendt, M. (2007). Are rats predisposed to learn 22 kHz calls as danger-predicting signals? *Behavioural Brain Research*, *185*, 69–75. doi:10.1016/j.bbr.2007.07.012
- Geyer, L. A., McIntosh, T. K., & Barfield, R. J. (1978). Effects of ultrasonic vocalizations and male's urine on female rat readiness to mate. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, *92*, 457–462. doi:10.1037/h0077478
- Hammerschmidt, K., Radyushkin, K., Ehrenreich, H., & Fischer, J. (2009). Female mice respond to male ultrasonic 'songs' with approach behaviour. *Biology Letters*, *5*, 589–592. doi:10.1098/rsbl.2009.0317
- Kim, E. J., Kim, E. S., Covey, E., & Kim, J. J. (2010). Social transmission of fear in rats: The role of 22-kHz ultrasonic distress vocalization. *PLoS One*, *5*, e15077. doi:10.1371/journal.pone.0015077
- Knutson, B., Burgdorf, J., & Panksepp, J. (1998). Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. *Journal of Comparative Psychology*, *112*, 65–73. doi:10.1037/0735-7036.112.1.65
- McGinnis, M. Y., & Vakulenko, M. (2003). Characterization of 50-kHz ultrasonic vocalizations in male and female rats. *Physiology & Behavior*, *80*, 81–88. doi:10.1016/S0031-9384(03)00227-0
- McIntosh, T. K., & Barfield, R. J. (1980). Temporal patterning of 40–60kHz ultrasonic vocalizations and copulation in the rat (*Rattus norvegicus*). *Behavioral and Neural Biology*, *29*, 349–358. doi:10.1016/S0163-1047(80)90259-9
- McIntosh, T. K., Barfield, R. J., & Geyer, L. A. (1978). Ultrasonic vocalisations facilitate sexual behaviour in female rats. *Nature*, *272*, 163–164. doi:10.1038/272163a0
- Panksepp, J., & Burgdorf, J. (2000). 50-kHz chirping (laughter?) in response to conditioned and unconditioned tickle-induced reward in rats: Effects of social housing and genetic variables. *Behavioural Brain Research*, *115*, 25–38. doi:10.1016/S0166-4328(00)00238-2
- Panksepp, J., & Burgdorf, J. (2003). "Laughing" rats and the evolutionary antecedents of human joy? *Physiology and Behavior*, *79*, 533–547. doi:10.1016/S0031-9384(03)00159-8
- Panksepp, J., Gordon, N., & Burgdorf, J. (2002). Empathy and the action-perception resonances of basic socio-emotional systems of the brain. *Behavioral and Brain Sciences*, *25*, 43–44.
- Parsana, A. J., Li, N., & Brown, T. H. (2012). Positive and negative ultrasonic social signals elicit opposing firing patterns in rat amygdala. *Behavioural Brain Research*, *226*, 77–86. doi:10.1016/j.bbr.2011.08.040
- Pomerantz, S. M., Nunez, A. A., & Bean, N. J. (1983). Female behavior is affected by male ultrasonic vocalizations in house mice. *Physiology & Behavior*, *31*, 91–96. doi:10.1016/0031-9384(83)90101-4
- Sadananda, M., Wöhr, M., & Schwarting, R. K. W. (2008). Playback of 22-kHz and 50-kHz ultrasonic vocalizations induces differential c-fos expression in rat brain. *Neuroscience Letters*, *435*, 17–23. doi:10.1016/j.neulet.2008.02.002
- Sales, G. D. (1972a). Ultrasound and aggressive behaviour in rats and other small mammals. *Animal Behaviour*, *20*, 88–100. doi:10.1016/S0003-3472(72)80177-5
- Sales, G. D. (1972b). Ultrasound and mating behaviour in rodents with some observations on other behavioural situations. *Journal of Zoology*, *168*, 149–164.
- Sales, G. D. (1991). The effect of 22 kHz calls and artificial 38 kHz signals on activity in rats. *Behavioural Processes*, *24*, 83–93. doi:10.1016/0376-6357(91)90001-G
- Siviy, S. M., & Panksepp, J. (1987). Sensory modulation of juvenile play in rats. *Developmental Psychobiology*, *20*, 39–55. doi:10.1002/dev.420200108
- Snoeren, E. M., & Ågmo, A. (2013a). Female ultrasonic vocalizations have no incentive value for male rats. *Behavioral Neuroscience*, *127*, 439–450. doi:10.1037/a0032027
- Snoeren, E. M., & Ågmo, A. (2013b). The incentive value of males' 50-kHz ultrasonic vocalizations for female rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, in press. doi:10.1037/a0033204
- Thomas, D. A., Howard, S. B., & Barfield, R. J. (1982). Male produced ultrasonic vocalizations and mating patterns in female rats. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, *96*, 807–815. doi:10.1037/h0077919
- Thomas, D. A., Talalas, L., & Barfield, R. J. (1981). Effects of devocalization of the male on mating behavior in rats. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, *95*, 630–637. doi:10.1037/h0077803
- White, N. R., & Barfield, R. J. (1987). Role of the ultrasonic vocalization of the female rat (*Rattus norvegicus*) in sexual behavior. *Journal of Comparative Psychology*, *101*, 73–81. doi:10.1037/0735-7036.101.1.73
- White, N. R., & Barfield, R. J. (1989). Playback of female rat ultrasonic vocalizations during sexual behavior. *Physiology & Behavior*, *45*, 229–233. doi:10.1016/0031-9384(89)90123-6
- White, N. R., & Barfield, R. J. (1990). Effects of male pre-ejaculatory vocalizations on female receptive behavior in the rat (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, *104*, 140–146. doi:10.1037/0735-7036.104.2.140
- White, N. R., Cagiano, R., Moises, A. U., & Barfield, R. J. (1990). Changes in mating vocalizations over the ejaculatory series in rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, *104*, 255–262. doi:10.1037/0735-7036.104.3.255
- White, N. R., Colona, L. C., & Barfield, R. J. (1991). Sensory cues that elicit ultrasonic vocalizations in female rats (*Rattus norvegicus*). *Behavioral and Neural Biology*, *55*, 154–165. doi:10.1016/0163-1047(91)80136-3

- White, N. R., Gonzales, R. N., & Barfield, R. J. (1993). Do vocalizations of the male rat elicit calling from the female? *Behavioral & Neural Biology*, *59*, 76–78. doi:10.1016/0163-1047(93)91201-W
- Wöhr, M., Borta, A., & Schwarting, R. K. W. (2005). Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm - a dose-response study in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, *84*, 228–240. doi:10.1016/j.nlm.2005.07.004
- Wöhr, M., Houx, B., Schwarting, R. K. W., & Spruijt, B. (2008). Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. *Physiology & Behavior*, *93*, 766–776. doi:10.1016/j.physbeh.2007.11.031
- Wöhr, M., Kehl, M., Borta, A., Schänzer, A., Schwarting, R. K. W., & Höglinger, G. U. (2009). New insights into the relationship of neurogenesis and affect: Tickling induces hippocampal cell proliferation in rats emitting appetitive 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Neuroscience*, *163*, 1024–1030. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.07.043
- Wöhr, M., & Schwarting, R. K. W. (2007). Ultrasonic communication in rats: Can playback of 50-kHz calls induce approach behavior? *PLoS One*, *2*, e1365. doi:10.1371/journal.pone.0001365
- Wöhr, M., & Schwarting, R. K. W. (2008). Ultrasonic calling during fear conditioning in the rat: No evidence for an audience effect. *Animal Behaviour*, *76*, 749–760. doi:10.1016/j.anbehav.2008.04.017
- Wöhr, M., & Schwarting, R. K. W. (2009). Ultrasonic communication in rats: Effects of morphine and naloxone on vocal and behavioral responses to playback of 50-kHz vocalizations. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *94*, 285–295. doi:10.1016/j.pbb.2009.09.008
- Wöhr, M., & Schwarting, R. K. W. (2012). Testing social acoustic memory in rats: Effects of stimulus configuration and long-term memory on the induction of social approach behavior by appetitive 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Neurobiology of Learning and Memory*, *98*, 154–164. doi:10.1016/j.nlm.2012.05.004
- Wöhr, M., & Schwarting, R. K. W. (2013). Affective communication in rodents: Ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. *Cell and Tissue Research*, in press. doi:10.1007/s00441-013-1607-9

Received June 6, 2013

Revision received July 25, 2013

Accepted July 29, 2013 ■

Members of Underrepresented Groups: Reviewers for Journal Manuscripts Wanted

If you are interested in reviewing manuscripts for APA journals, the APA Publications and Communications Board would like to invite your participation. Manuscript reviewers are vital to the publications process. As a reviewer, you would gain valuable experience in publishing. The P&C Board is particularly interested in encouraging members of underrepresented groups to participate more in this process.

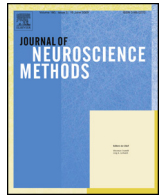
If you are interested in reviewing manuscripts, please write APA Journals at Reviewers@apa.org. Please note the following important points:

- To be selected as a reviewer, you must have published articles in peer-reviewed journals. The experience of publishing provides a reviewer with the basis for preparing a thorough, objective review.
- To be selected, it is critical to be a regular reader of the five to six empirical journals that are most central to the area or journal for which you would like to review. Current knowledge of recently published research provides a reviewer with the knowledge base to evaluate a new submission within the context of existing research.
- To select the appropriate reviewers for each manuscript, the editor needs detailed information. Please include with your letter your vita. In the letter, please identify which APA journal(s) you are interested in, and describe your area of expertise. Be as specific as possible. For example, “social psychology” is not sufficient—you would need to specify “social cognition” or “attitude change” as well.
- Reviewing a manuscript takes time (1–4 hours per manuscript reviewed). If you are selected to review a manuscript, be prepared to invest the necessary time to evaluate the manuscript thoroughly.

APA now has an online video course that provides guidance in reviewing manuscripts. To learn more about the course and to access the video, visit <http://www.apa.org/pubs/authors/review-manuscript-ce-video.aspx>.

STUDIE II:

Seffer D, Schwarting RKW, Wöhr M. (2014) Pro-social ultrasonic communication in rats: Insights from playback studies. *Journal of Neuroscience Methods*, 234, 73-81.



Basic Neuroscience

Pro-social ultrasonic communication in rats: Insights from playback studies



Dominik Seffer, Rainer K.W. Schwarting, Markus Wöhr*

Behavioral Neuroscience, Experimental and Biological Psychology, Philipps-University of Marburg, Gutenbergstr. 18, D-35032 Marburg, Germany

HIGHLIGHTS

- Rat ultrasonic vocalizations (USV) serve as situation-dependent affective signals with important communicative functions.
- All studies using the 50-kHz USV radial maze playback paradigm indicate that 50-kHz USV serve as social contact calls.
- This playback paradigm allows studying pro-social ultrasonic communication in a reliable and highly standardized manner.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 November 2013
Received in revised form 13 January 2014
Accepted 14 January 2014
Available online 4 February 2014

Keywords:

Ultrasonic communication
Ultrasonic vocalizations
Social behavior
Animal model
Autism
Schizophrenia

ABSTRACT

Rodent ultrasonic vocalizations (USV) serve as situation-dependent affective signals and convey important communicative functions. In the rat, three major USV types exist: (I) 40-kHz USV, which are emitted by pups during social isolation; (II) 22-kHz USV, which are produced by juvenile and adult rats in aversive situations, including social defeat; and (III) 50-kHz USV, which are uttered by juvenile and adult rats in appetitive situations, including rough-and-tumble play. Here, evidence for a communicative function of 50-kHz USV is reviewed, focusing on findings obtained in the recently developed 50-kHz USV radial maze playback paradigm. Up to now, the following five acoustic stimuli were tested in this paradigm: (A) natural 50-kHz USV, (B) natural 22-kHz USV, (C) artificial 50-kHz sine wave tones, (D) artificial time- and amplitude-matched white noise, and (E) background noise. All studies using the 50-kHz USV radial maze playback paradigm indicate that 50-kHz USV serve a pro-social affiliative function as social contact calls. While playback of the different kinds of acoustic stimuli used so far elicited distinct behavioral response patterns, 50-kHz USV consistently led to social approach behavior in the recipient, indicating that pro-social ultrasonic communication can be studied in a reliable and highly standardized manner by means of the 50-kHz USV radial maze playback paradigm. This appears to be particularly relevant for rodent models of neurodevelopmental disorders, as there is a tremendous need for reliable behavioral assays with face validity to social communication deficits seen in autism and schizophrenia in order to study underlying genetic and neurobiological alterations.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mice and rats produce vocalizations in the ultrasonic range, i.e. in a frequency range clearly above the human hearing threshold and therefore not audible to humans, often referred to as ultrasonic vocalizations (USV). Rodent USV serve as situation-dependent affective signals (for reviews see: Brudzynski, 2013; Wöhr and Schwarting, 2013) and have attracted considerable interest in the behavioral neuroscience research community, particularly because it was suggested that they may serve as a direct measure of affect, i.e. of the animal's subjective emotional state (e.g. Panksepp, 2005; for review see: Burgdorf et al., 2011). Furthermore, since rodent

USV convey important communicative information as alarm and social contact calls, measuring USV provides the opportunity to study communication in rodent models for neuropsychiatric disorders characterized by social and communication deficits, most notably autism and schizophrenia (e.g. Won et al., 2012; for review see: Scattoni et al., 2009).

Typically, USV in rodents are categorized depending on the animal's developmental stage and acoustic call features, such as call duration and peak frequency. In the rat, the following three major USV types are most commonly differentiated: (I) 40-kHz USV, which are emitted by pups during social isolation when separated from mother and littermates (e.g. Wöhr and Schwarting, 2008a); (II) 22-kHz USV, which are produced by juvenile and adult rats in aversive situations, including social defeat (e.g. Sales, 1972a), predator exposure (e.g. Blanchard et al., 1991), and fear learning (e.g. Choi and Brown, 2003); and (III) 50-kHz USV, which are uttered

* Corresponding author. Tel.: +49 6421 28 23612; fax: +49 6421 28 23610.
E-mail address: markus.woehr@staff.uni-marburg.de (M. Wöhr).

by juvenile and adult rats in appetitive situations, including rough-and-tumble play (e.g. Knutson et al., 1998), mating (e.g. Sales, 1972b), and when tickled playfully (e.g. Panksepp and Burgdorf, 2000). In the mouse, similar USV types exist, with the exception of 22-kHz USV, which have not been detected in mice yet, despite tremendous effort and numerous USV studies focusing on aversive situations (for review see: Wöhr and Scattoni, 2013).

In support of the notion that rodent USV in juvenile and adult rats may serve as a direct measure of affect, 22-kHz USV and 50-kHz USV emission were repeatedly linked to components of the behavioral repertoire associated with negative and positive affect, respectively. Specifically, in aversive situations, such as fear learning, 22-kHz USV production typically correlates with freezing behavior, the most commonly used measure of fear in rats (Wöhr and Schwarting, 2008a,b), and depends on the individual disposition to display anxiety-related behavior, with rats characterized by high levels of anxiety emitting more 22-kHz USV during fear learning than less anxious rats (Borta et al., 2006). Furthermore, 22-kHz USV production was shown to systematically covary with aversiveness, experimentally manipulated by means of foot shock intensities (Wöhr et al., 2005). In this dose–response study, rats exposed to higher foot shock intensities were found to emit more 22-kHz USV than rats exposed to lower shock intensities during fear learning and testing, i.e. in absence of shock application when exposed to a formerly neutral stimulus that has been repeatedly paired with foot shocks.

In contrast, in appetitive situations, such as rough-and-tumble play, 50-kHz USV production is positively correlated with play behavior in juveniles (Burgdorf et al., 2008). In line with this observation, rats bred for low rates of 50-kHz USV were found to display altered rough-and-tumble play behavior (Webber et al., 2012) and a depression-like behavioral phenotype, along with elevated levels of anxiety (Burgdorf et al., 2009). Furthermore, individual differences in the emission of 50-kHz USV have been linked to response strategies in an ambiguous cue interpretation paradigm (Rygula et al., 2012) and hippocampal cell proliferation (Wöhr et al., 2009), with rats emitting high rates of 50-kHz USV displaying an “optimistic” bias and more newborn cells in the hippocampus. In contrast, rats characterized by a depression-like behavioral phenotype with low rates of 50-kHz USV were found to have markedly lower numbers of newborn cells in the hippocampus. This is in line with findings from preclinical treatment studies showing that hippocampal neurogenesis is required for the efficacy of major antidepressant drugs, such as selective serotonin reuptake inhibitors (Santarelli et al., 2003).

2. Pro-social function of 50-kHz USV

Besides studies linking USV emission and affective state, there is a wealth of evidence supporting the idea that USV serve important communicative functions. In fact, it is well established that isolation-induced 40-kHz USV emitted by pups serve as social contact calls and elicit maternal search and retrieval behavior (e.g. Allin and Banks, 1972; for review see: Hofer and Shair, 1993). It is further widely believed that 22-kHz USV emitted in aversive situations, such as predator exposure, serve as alarm calls (e.g. Blanchard et al., 1991; for review see: Litvin et al., 2007). Finally, there is evidence that 50-kHz USV serve communicative functions as well.

Most early studies focusing on a potential communicative function of 50-kHz USV were conducted in the sexual context (for review see: Barfield and Thomas, 1986). The most commonly used approach to assess the effects of 50-kHz USV was devocalization by cutting the laryngeal nerves. In such devocalization experiments it was shown that females display less darting behavior when exposed to a devocalized male mating partner and are more likely to move away while being mounted by a male unable to vocalize

(Thomas et al., 1981, 1982; White and Barfield, 1990; White et al., 1990). By means of combining devocalization and playback of 50-kHz USV, White and Barfield (1990) further showed that female receptive behavior is restored when they are exposed to tape-recorded male 50-kHz USV. Specifically, they reported that playback of male 50-kHz USV leads to an increase in the level of immobility shown by the female exposed to a devocalized mating partner that is sufficient for the male to obtain an intromission. In addition, Thomas et al. (1982) found that females display more darts directed toward devocalized males when male 50-kHz USV are played in their proximity. In line with this, Geyer et al. (1978) found that darting is facilitated in females exposed to male 50-kHz USV before mating and McIntosh et al. (1978) demonstrated that darting can even be enhanced by male 50-kHz USV in females receiving low levels of sexual stimulation while being confronted with a castrated mating partner. Moreover, Barfield et al. (1979) used a T-maze apparatus and demonstrated that females spent more time in the one of the two arms in which male 50-kHz USV were presented. However, in a very recent study, Snoeren and Ågmo (in press) did not detect clear behavioral changes in females exposed to playback of male 50-kHz USV and concluded that male 50-kHz USV have a most limited, if any, incentive value for sexually receptive females. Snoeren and Ågmo (in press) conducted three experiments. In the first two experiments, 50-kHz USV recorded from sexually active males during the precopulatory phase were used as playback stimuli. In each of the two experiments, four different acoustic stimuli were used: background noise, a natural 10 min sequence of male 50-kHz USV, a flat 50-kHz call, and a frequency-modulated 50-kHz call, with the latter two stimuli being presented repeatedly. The results were inconsistent and the overall effects of 50-kHz USV playback were found to be weak. While in the first experiment, a small, but significant preference toward the speaker was seen in response to the flat 50-kHz USV, but not the other acoustic stimuli, significant preference scores were obtained in response to all acoustic stimuli, with exception of background noise, in the second experiment. However, when comparing the time spent in front of the speaker with the time spent on the opposite side, significant approach behavior was seen in response to the natural 10 min sequence of male 50-kHz USV in the second experiment only. In the third experiment, a devocalization study, females did not display a preference for a non-devocalized over a devocalized male. Besides changes in overt behavior, USV emission by the recipient female was studied. White et al. (1993) found that male 50-kHz USV elicit USV in females, but such a response was not seen in another study (White et al., 1991). Finally, female USV emission is also believed to play an important role in coordinating sexual activity (White and Barfield, 1987, 1989; White et al., 1991), yet again, findings by Snoeren and Ågmo (2013) do not support such a communicative function. Overall, however, the main proportion of studies focusing on a potential communicative function of 50-kHz USV indicate that male 50-kHz USV play an important role in establishing proximity between mating partners and that they possibly orchestrate sexual activity. Yet, in contrast to the sexual context, strong evidence for a communicative function of 50-kHz USV in other social situations was almost completely lacking until recently.

The idea that 50-kHz USV serve communicative functions in the social context was born out of studies showing that remarkably high 50-kHz USV emission rates occur during rough-and-tumble play in juveniles (Burgdorf et al., 2008; Knutson et al., 1998; Webber et al., 2012) and that young rats spent more time with adults displaying higher levels of 50-kHz USV than with conspecifics characterized by limited 50-kHz USV emission rates (Panksepp et al., 2002). This view is further supported by the fact that deafening juvenile rats affects rough-and-tumble play (Siviy and Panksepp, 1987). Siviy and Panksepp (1987) showed that deafening

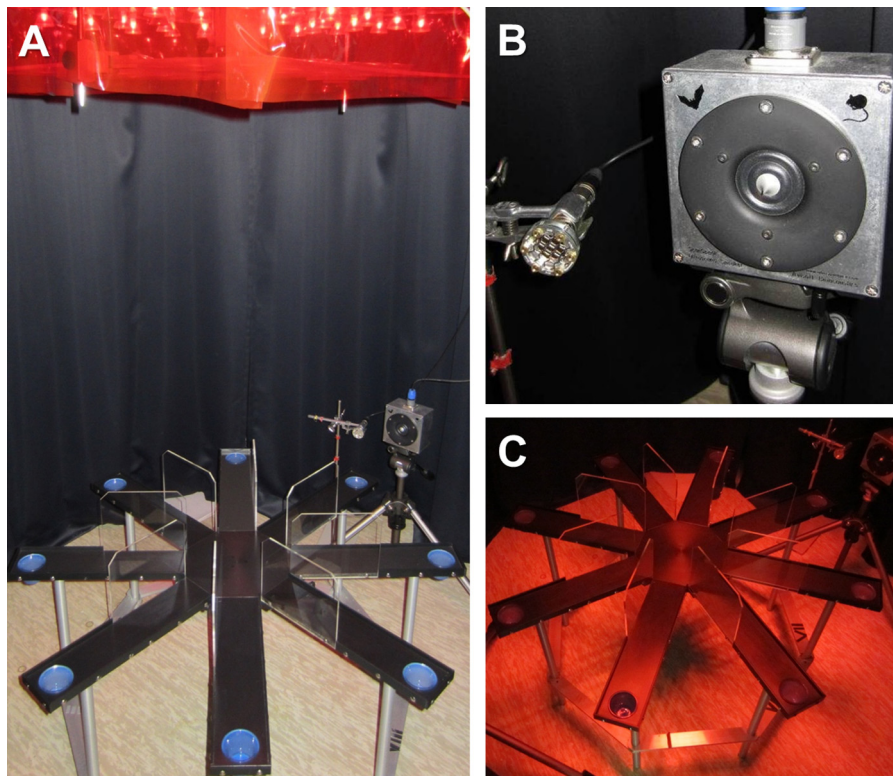


Fig. 1. (A) Setup of the 50-kHz USV radial maze playback paradigm. Elevated eight arm radial maze equipped with two ultrasonic microphones and two loudspeakers positioned opposite to each other (only one ultrasonic microphone and the active loudspeaker are shown; all equipment: Avisoft Bioacoustics; Berlin, Germany). The rat's behavioral responses during playback of acoustic stimuli are recorded with a video camera positioned above the elevated eight arm radial maze. (B) Microphone for ultrasonic recording and ultrasonic loudspeaker for playback presentation. (C) Testing is performed under dim red light. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

leads to robust reduction in pinning behavior; yet others did not see effects of deafening on social behavior in adult rats, with social behaviors of deaf rats being virtually identical to the behavioral pattern observed in controls (Borden et al., 1977). Furthermore, Brudzynski and Pniak (2002) investigated the effect of social context on 50-kHz USV production and found that 50-kHz USV are elicited when rats are exposed to odors of conspecifics, indicating that 50-kHz USV emission is driven by potential social contact. Finally, separation from conspecifics was also shown to elicit 50-kHz USV emission, with highest 50-kHz USV rates during the first few minutes of short-term social isolation (Schwartz et al., 2007; Wöhr et al., 2008). Together, these studies indicate that 50-kHz USV serve an important communicative function similar to the one observed in the sexual context, namely to (re)establish and/or maintain social proximity. Beyond that, 50-kHz USV possibly orchestrate complex social behaviors, such as cooperative behavior, as indicated by a positive correlation between the number of cooperative behaviors and 50-kHz USV (Łopuch and Popik, 2011). It has to be noted though that such a pro-social affiliative function was not observed in some recent playback studies (Burman et al., 2007; Endres et al., 2007), while Burgdorf et al. (2008) even showed that rats work to be exposed to 50-kHz USV in an operant task. Despite such inconsistencies, however, there is a playback paradigm available by which means it was repeatedly shown that 50-kHz USV lead to social approach behavior in juvenile and adult male rats (Wöhr and Schwartz, 2007, 2009, 2012) as well as female rats (Willadsen et al., in press).

3. The 50-kHz USV radial maze playback paradigm

In 2007, Wöhr and Schwartz presented the 50-kHz USV radial maze playback paradigm. In this paradigm a given rat is exposed

to an elevated radial eight arm maze, which the rat is allowed to explore for 15 min. Following this habituation period, 50-kHz USV and appropriate acoustic control stimuli are presented by means of an ultrasonic loudspeaker, with each phase of acoustic stimulus presentation followed by an inter-stimulus-interval of 10 min. Besides the active ultrasonic loudspeaker, the radial arm maze is equipped with two ultrasonic microphones for monitoring playback of acoustic stimuli and recording of possible USV emitted by the recipient rat (Fig. 1A–C). For the assessment of behavioral responses elicited by playback of acoustic stimuli in the recipient rat, the radial arm maze is divided into three areas, namely proximal arms, i.e. the three arms close to the active ultrasonic speaker, distal arms, i.e. the three arms opposite to the active ultrasonic speaker, and neutral arms, i.e. the two remaining arms (Fig. 2A). By means of this arena definition, entries into proximal and distal arms and the time spent thereon is assessed. In addition, locomotor activity is measured. Stimulus application and animal observation is performed in a separate experimental control room. Prior to testing, all animals receive 3 days of handling in a standardized way (5 min/day).

4. The 50-kHz USV radial maze playback paradigm: setup and stimuli

4.1. Experimental setup

All studies (Willadsen et al., in press; Wöhr and Schwartz, 2007, 2009, 2012) were performed on a radial eight arm maze made of black plastic which is elevated 52 cm above the floor. The arms (9.8 cm × 40.5 cm) extend radially from a central platform (diameter: 24 cm; Fig. 1A). An ultrasonic speaker (ScanSpeak, Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany; Fig. 1B) is placed 20 cm away from

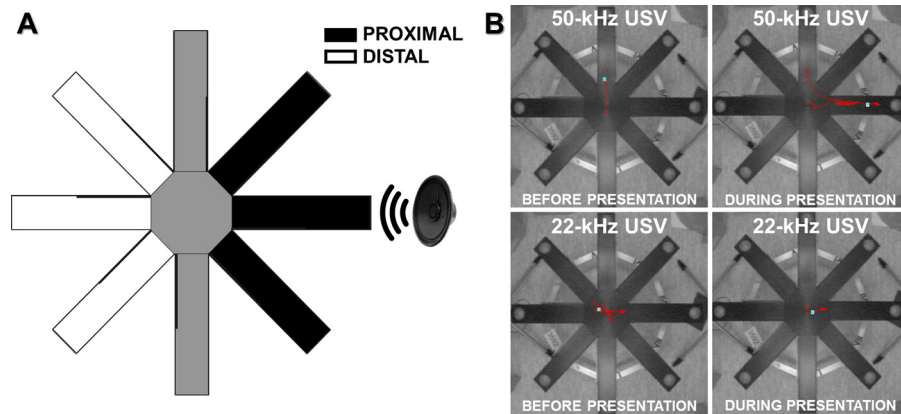


Fig. 2. (A) Schematic illustration of the elevated radial eight arm maze, depicting area definitions to assess social approach and avoidance behavior, with arms close to the loudspeaker denoted as proximal, central arms as neutral, and opposite arms as distal. (B) Exemplary patterns of behavioral activity measured by using the automated video tracking software EthoVision (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands), with tracking profiles shown in red. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

the end of one arm at a height of 52 cm above the floor to present acoustic stimuli, using an external sound card with a sampling rate of 192 kHz (Fire Wire Audio Capture FA-101, Edirol, London, UK) and a portable ultrasonic power amplifier with a frequency range of 1–125 kHz (Avisoft Bioacoustics). The loudspeaker has a frequency range of 1–120 kHz with a relatively flat frequency response (± 12 dB) between 15 and 80 kHz. In more recent experiments, the setting was complemented by an additional, but inactive ultrasonic speaker, arranged symmetrically at the opposite arm, as visual control (Willadsen et al., in press; Wöhr and Schwarting, 2012). Testing is performed under dim red light (~ 10 lux; Fig. 1C) in a testing room with no other rats present. Prior to each test, behavioral equipment is cleaned using a 0.1% acetic acid solution followed by drying.

4.2. Behavioral and USV recordings

Behavior is monitored by a video camera (Panasonic WV-BP 330/GE, Hamburg, Germany) from about 150 cm above the maze. Playback of acoustic stimuli is monitored by two UltraSoundGate Condenser Microphones (CM 16; Avisoft Bioacoustics; Fig. 1B) placed 20 cm away from the maze at a height of 55 cm. One of them is placed next to the active loudspeaker, i.e. in front of the three proximal arms, whereas the other one is placed vis-à-vis in front of the three distal arms. These microphones are sensitive to frequencies of 15–180 kHz with a flat frequency response (± 6 dB) between 25 and 140 kHz. They are connected via an Avisoft UltraSoundGate 416 USB Audio device (Avisoft Bioacoustics) to a personal computer, where acoustic data are displayed in real time by Avisoft RECORDER (version 2.7; Avisoft Bioacoustics) and recorded with a sampling rate of 214,285 Hz or higher in 16 bit format.

4.3. Acoustic stimuli

Up to now, the following five acoustic stimuli were tested in the 50-kHz USV radial maze playback paradigm: (A) natural 50-kHz USV (50-kHz USV), (B) natural 22-kHz USV (22-kHz USV), (C) artificial 50-kHz sine wave tones (SINE WAVE), (D) artificial time- and amplitude-matched white noise (WHITE NOISE), and (E) background noise (BACKGROUND NOISE; Fig. 3). All stimuli were presented with a sampling rate of 192 kHz in 16 bit format at ~ 69 dB (measured from a distance of 40 cm), with the exception of background noise that was presented at ~ 50 dB (measured from a distance of 40 cm).

- (A) 50-kHz USV: The 50-kHz USV were recorded from an adult male Wistar rat during exploration of a cage containing scents from a cage mate after being separated from it (for setting and recording see: Wöhr et al., 2008). This recording context was used as it was shown that playback of 50-kHz USV recorded during tickling or exploration of an empty cage has no or only very moderate effects on the behavior displayed by the recipient rat (for details see: Discussion). The acoustic stimulus was composed of a sequence of 3.5 s, which was presented in a loop. The sequence contains 13 50-kHz USV (total calling time: 0.90 s), with 10 of them being frequency-modulated 50-kHz USV and 3 flat ones. The sequence was presented in a loop to assure the presentation of a high number of frequency-modulated 50-kHz USV within a relatively short period of time. Average acoustic call parameters were as follows (mean \pm SEM): call duration: 0.07 ± 0.01 s; peak frequency: 61.24 ± 1.75 kHz; frequency modulation: 31.68 ± 4.62 kHz.
- (B) 22-kHz USV: The 22-kHz USV were recorded from a male Wistar rat which had received electric foot-shocks before, but not during recording (for setting and recording see: Wöhr et al., 2005). The acoustic stimulus contained 29 22-kHz USV. Average acoustic call parameters were as follows (mean \pm SEM): call duration: 1.18 ± 0.06 s; peak frequency: 23.61 ± 0.07 kHz; frequency modulation: 1.90 ± 0.09 kHz. To control for background noise present in the original natural 50-kHz USV stimulus, background noise was added to 22-kHz USV stimulus.
- (C) SINE WAVE: The artificial 50-kHz sine wave tones were generated with the SASLab Pro software (version 4.2, Avisoft Bioacoustics) by replacing all 50-kHz USV in the original natural 50-kHz USV stimulus material by sine wave tones. Specifically, each given 50-kHz USV was replaced by a sine wave tone with identical duration, frequency, amplitude, etc. Thus, the stimulus series had the same temporal patterning and was identical to the original natural 50-kHz USV series with respect to all call features, apart from the fact that the tones were not amplitude- and frequency-modulated as the natural 50-kHz USV. To control for background noise present in the original natural 50-kHz USV stimulus, background noise was added to the artificial 50-kHz sine wave tone stimulus.
- (D) WHITE NOISE: The artificial time- and amplitude-matched white noise was generated with SASLab Pro (Version 4.2, Avisoft Bioacoustics) by replacing all 50-kHz USV in the original natural 50-kHz USV stimulus material by white noise. Specifically, each given 50-kHz USV was replaced by white noise, which durations and amplitude modulations correspond to that of the

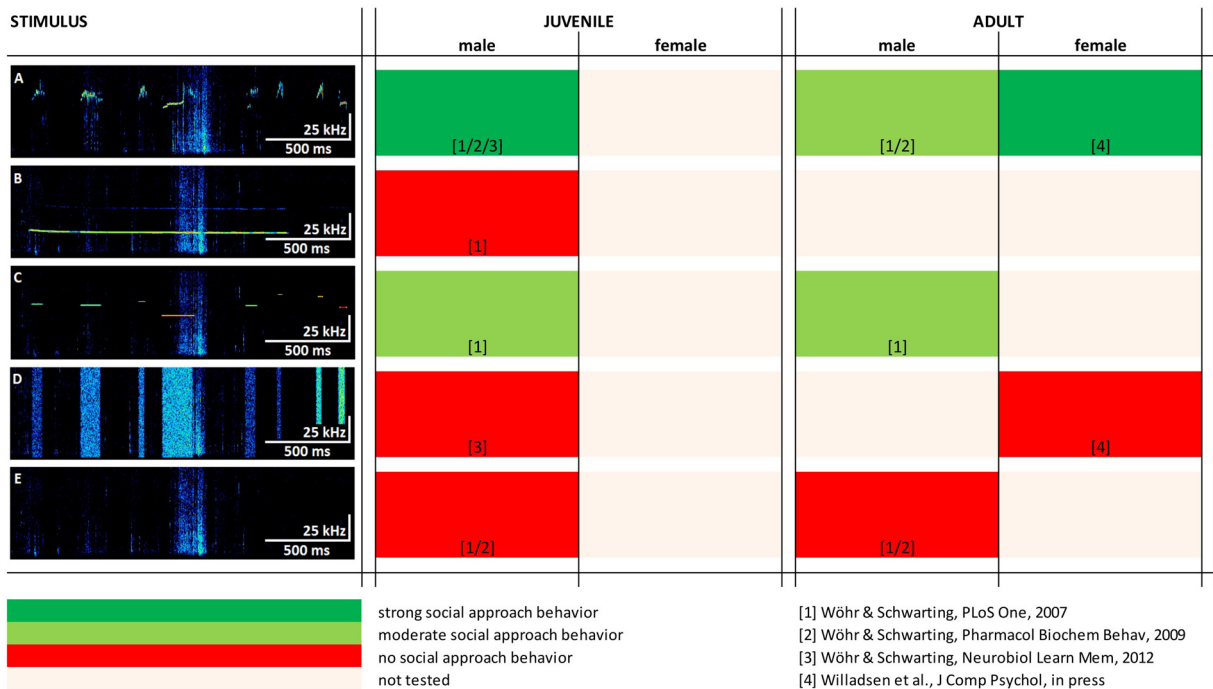


Fig. 3. Overview on the behavioral responses obtained in the 50-kHz USV radial maze playback paradigm by using the following five acoustic stimuli: (A) natural 50-kHz USV (50-kHz USV), (B) natural 22-kHz USV (22-kHz USV), (C) artificial 50-kHz sine wave tones (SINE WAVE), (D) artificial time- and amplitude-matched white noise (WHITE NOISE), and (E) background noise (BACKGROUND NOISE). All stimuli were presented with a sampling rate of 192 kHz in 16 bit format at ~69 dB (measured from a distance of 40 cm), with the exception of background noise that was presented at ~50 dB (measured from a distance of 40 cm).

original 50-kHz USV. Thus, the stimulus series had the same temporal patterning and was identical to the original natural 50-kHz USV series with respect to all call features, apart from the fact that sound energy was not confined to a certain frequency as in case of the natural 50-kHz USV. To control for background noise present in the original natural 50-kHz USV stimulus, background noise was added to the artificial time- and amplitude-matched white noise stimulus.

(E) BACKGROUND NOISE: Since the 50-kHz USV stimulus contained background noise, i.e. noises, which occur when a rat is exploring an arena with bedding, background noise without 50-kHz USV was presented to control for unspecific effects not linked to the communicative function of 50-kHz USV.

4.4. Behavioral and USV analysis

Behavioral analysis is typically performed in two ways. (I) A trained observer scores the videos for the following parameters: number of arm entries into the three proximal or distal arms and the time spent thereon. (II) By using an automated video tracking system (EthoVision, Noldus, Wageningen, The Netherlands) the total distance traveled (cm) is measured and track profiles are generated (Fig. 2B). For the automated analysis, input filters are activated to avoid an overestimation of locomotor activity due to head movements (minimal distance moved: 8 cm). For acoustical analysis, recordings are transferred to SASLab Pro (version 4.38; Avisoft Bioacoustics) and a fast Fourier transform is conducted (512 FFT-length, 100% frame, Hamming window and 75% time window overlap), typically resulting in spectrograms with 488 Hz of frequency resolution and 0.512 ms of time resolution.

5. The 50-kHz USV radial maze playback paradigm: findings

Up to now, four experiments using the 50-kHz USV radial maze playback paradigm were conducted (Willadsen et al., in press;

Wöhr and Schwarting, 2007, 2009, 2012; Fig. 3 and Table 1). In the first experiment of the study conducted by Wöhr and Schwarting (2007), juvenile male rats (66.7 ± 2.5 g; ~25 days of age) were exposed to 50-kHz USV, 22-kHz USV, and BACKGROUND NOISE, with each presentation lasting 1 min. While playback of 50-kHz USV led to a strong increase in locomotor activity, 22-kHz USV playback resulted in a moderate decrease in locomotion resembling freezing behavior, in line with a potential alarm function of 22-kHz USV (e.g. Blanchard et al., 1991; for review see: Litvin et al., 2007). BACKGROUND NOISE did not change locomotor activity. In the second experiment, juvenile male rats (80.9 ± 1.5 g; ~27 days of age) were exposed to 50-kHz USV, SINE WAVE, and BACKGROUND NOISE, each again for 1 min. In line with the first experiment, playback of 50-kHz USV led to a strong increase in locomotor activity, but not SINE WAVE or BACKGROUND NOISE. Importantly, locomotor activity elicited by playback of 50-kHz USV was found to be stimulus-directed. On average, juvenile male rats spent ~39 s on proximal arms, while on distal arms only ~2 s, reflecting strong levels of social approach behavior elicited by 50-kHz USV. In response to SINE WAVE, juvenile male rats tended to enter proximal arms more often than distal ones and spent more time in proximity to the sound source than away from it. BACKGROUND NOISE had no effect. In the third experiment, adult male rats (320.5 ± 6.3 g; ~12 weeks of age) were exposed to 50-kHz USV, SINE WAVE, and BACKGROUND NOISE, for 1 min as in juveniles. In line with the second experiment in juveniles, playback of 50-kHz USV led to an increase in locomotor activity. However, this increase was less prominent than in juveniles. Furthermore, SINE WAVE resulted in a similarly strong increase in locomotor activity as 50-kHz USV, which is again in contrast with the findings obtained in juveniles. Importantly, locomotor activity elicited by playback of 50-kHz USV was again found to be stimulus-directed. On average, adult male rats spent ~13 s on proximal arms, while on distal arms only ~3 s, reflecting a moderate level of social approach behavior elicited by 50-kHz USV. In response to SINE WAVE, adult

Table 1
Behavioral responses in rats exposed to 50-kHz USV by means of the 50-kHz USV radial arm playback paradigm (sex: M = male; F = female).

Arm entries (n/min)				Time spent on arms (s/min)				Sex	Reference
Juvenile		Adult		Juvenile		Adult			
Proximal	Distal	Proximal	Distal	Proximal	Distal	Proximal	Distal		
~1.9	~0.4	~1.3	~0.1	~39	~2	~13	~3	M	Wöhr and Schwarting, PLoS ONE, 2007
~2.9	~0.3	~1.5	~0.3	~42	~4	~23	~1	M	Wöhr and Schwarting, Pharmacol Biochem Behav, 2009
~1.8	~0.0	NA	NA	~24	~1	NA	NA	M	Wöhr and Schwarting, Neurobiol Learn Mem, 2012
NA	NA	~1.7	~0.1	NA	NA	~46	~1	F	Willadsen et al., J Comp Psychol, in press

male rats entered the proximal arms more often than the distal ones and spent more time thereon. BACKGROUND NOISE had no effect.

In the second study by [Wöhr and Schwarting \(2009\)](#), focusing on role of the endogenous opioid system in social behavior, juvenile male rats (73.2 ± 1.8 g; ~28 days of age) and adult male rats (315.0 ± 2.6 g; ~12 weeks of age) were exposed to 50-kHz USV and BACKGROUND NOISE for 1 min following drug treatment. In saline treated juvenile male rats, locomotor activity was strongly increased in response to playback of 50-kHz USV, in line with the first study ([Wöhr and Schwarting, 2007](#)). In saline treated adult male rats, however, the increase was very moderate. In juveniles and adults, the observed increase in locomotor activity was specific to 50-kHz USV, since playback of BACKGROUND NOISE led to moderate locomotor inhibition. Consistent with previous findings ([Wöhr and Schwarting, 2007](#)), locomotor activity in response to 50-kHz USV was directed toward the stimulus source, again indicating strong and moderate levels of social approach behavior in juvenile and adult male rats, respectively. On average, juvenile male rats spent ~42 s on proximal arms, while on distal arms only ~4 s. Adult male rats spent ~23 s on proximal arms, while on distal arms only ~1 s.

In the third study by [Wöhr and Schwarting \(2012\)](#), juvenile male rats (90.0 ± 1.5 g; ~28 days of age) were exposed to 50-kHz USV and WHITE NOISE in two experiments focusing on social acoustic memory processes. Because of this focus on memory effects, duration of acoustic stimuli presentation was increased from 1 min to 5 min. In the first experiment, playback of 50-kHz USV induced an immediate, but transient increase in locomotor activity in juvenile male rats. In stark contrast, WHITE NOISE exposure led to a profound and long-lasting behavioral inhibition. Again, the increased level of locomotor activity observed during playback of 50-kHz USV was found to be clearly directed toward the sound source. In the first min, juvenile male rats spent ~24 s on proximal arms, while only ~1 s on distal arms, reflecting the induction of social approach behavior. However, this behavioral change was found to be short-lasting, since in the subsequent four min of stimulus presentation, the time spent on proximal arms (~18; ~16; ~11; ~13 s, respectively) went back to baseline, with ~10 s on proximal arms, after the first min of stimulus presentation. Similar findings were obtained in the second experiment with an independent cohort of juvenile male rats. Together, this study further supports the idea of a communicative function of 50-kHz USV in the social, but non-sexual context.

The fourth study ([Willadsen et al., in press](#)) extended the pro-social communicative function of 50-kHz USV to female rats. Adult female rats (249.3 ± 3.4 g; ~16 weeks of age) were exposed to 50-kHz USV and WHITE NOISE for 1 min. In contrast to the studies conducted in males ([Wöhr and Schwarting, 2007, 2009, 2012](#)), locomotor activity was not increased in response to 50-kHz USV, probably because of high baseline activity rates. However, what is in line with previous findings ([Wöhr and Schwarting, 2012](#)) is the fact that locomotor activity was clearly higher during playback of 50-kHz USV than during playback of WHITE NOISE; a difference

due to the fact that WHITE NOISE led to a profound and long-lasting behavioral inhibition, similarly to the one observed in males. Furthermore, locomotor activity during playback of 50-kHz USV was directed toward the active ultrasonic speaker, again in line with the findings obtained in males ([Wöhr and Schwarting, 2007, 2009, 2012](#)). Female rats displayed social approach behavior, as indicated by more time spent on proximal than distal arms (~46 versus ~1 s, respectively). No preferences for proximal arms were found during playback of WHITE NOISE.

6. Discussion: comparing paradigms

The four studies using the 50-kHz USV radial maze playback paradigm ([Willadsen et al., in press](#); [Wöhr and Schwarting, 2007, 2009, 2012](#)) all indicate that 50-kHz USV serve a pro-social affiliative function as social contact calls. This is in line with findings obtained in playback studies in the sexual context where female rats were exposed to male 50-kHz USV, mostly in presence of devocalized male rats ([Barfield et al., 1979](#); [Geyer et al., 1978](#); [McIntosh et al., 1978](#); [Thomas et al., 1982](#); [White and Barfield, 1990](#); [White et al., 1990](#); for review see: [Barfield and Thomas, 1986](#)). However, the robust behavioral response elicited in response to 50-kHz USV by means of the 50-kHz USV radial maze playback paradigm is in contrast to some recent studies in the sexual ([Snoeren and Ågmo, in press](#)), but also non-sexual context ([Burman et al., 2007](#); [Endres et al., 2007](#)). Observed inconsistencies might be due to differences in experimental setup, equipment used for playback of acoustic stimuli, as well as type and duration of stimulus presentation. Firstly, in the 50-kHz USV radial maze playback paradigm a radial arm maze without walls is used to avoid reflections of the high-frequency acoustic stimuli, while in all of the studies not detecting strong behavioral responses during playback of 50-kHz USV arenas with walls were used ([Burman et al., 2007](#); [Endres et al., 2007](#); [Snoeren and Ågmo, in press](#)). Such walls might increase the likelihood of reflections that possibly affect the quality of the acoustic stimuli presented and thus possibly hindering the localization of the stimulus source. [Burman et al. \(2007\)](#) even used a start box, probably not only hindering the localization of the sound source, but also stimulus detection in general. Moreover, in the 50-kHz USV radial maze playback paradigm acoustic stimuli were presented by means of an ultrasonic speaker that was placed 20 cm away from the end of one arm at the same height as the radial arm maze. This allows horizontal stimulus presentation, probably mimicking most natural circumstances in which rats hear conspecifics vocalizing. In contrast to that, [Endres et al. \(2007\)](#) presented 50-kHz USV from above. This is probably not only contrasting with most natural circumstances, but also making it particularly challenging to assess behavior that is directed toward the sound source. Yet, it has to be said that the study by [Endres et al. \(2007\)](#) was not focused on 50-kHz USV, since they were mainly interested in the communicative function of 22-kHz USV. Secondly, in the 50-kHz USV radial maze playback paradigm the Avisoft system (Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany) was used for playback of acoustic stimuli, while other systems were used in the three studies not detecting clear

behavioral responses (Burman et al., 2007; Endres et al., 2007; Snoeren and Ågmo, *in press*). Thirdly, the 50-kHz USV used in the 50-kHz USV radial maze playback paradigm were recorded from an adult male Wistar rat during exploration of a cage containing scents from a cage mate after being separated from it (Wöhr et al., 2008). In the other three studies, 50-kHz USV recorded during exploration of an empty cage (Burman et al., 2007), tickling (Endres et al., 2007), or female exposure (Snoeren and Ågmo, *in press*) were used. Finally, stimulus duration might matter as well. In the 50-kHz USV radial maze playback paradigm, stimuli are presented for 1 min, since longer presentations result in diminished behavioral responses (Wöhr and Schwarting, 2012). Yet, Burman et al. (2007) presented their acoustic stimuli for 3 min and Snoeren and Ågmo (*in press*) used a latin square design and repeatedly exposed rats to acoustic stimuli with durations of up to 10 min. Only Endres et al. (2007) used short playback durations of 1 min. Together, there are a number of factors that might explain the inconsistent outcomes. However, it has to be highlighted that there are no studies available that systematically address individual factors, with the exception of stimulus duration (Wöhr and Schwarting, 2012). For instance, it would be interesting to see whether the position of the ultrasonic speaker affects the behavioral response elicited by 50-kHz USV. Finally, it is important to mention that the 50-kHz USV radial maze playback paradigm is not the only paradigm available to study the communicative function of 50-kHz USV. For instance, Burgdorf et al. (2008) used an instrumental task and showed that rats poke more often in holes when this behavior results in playback of 50-kHz USV, as compared to holes that result in playback of 22-kHz USV.

7. Discussion: age, sex, and acoustic stimulus configuration

In the 50-kHz USV radial maze playback paradigm, playback of the different kinds of acoustic stimuli used so far elicited distinct behavioral response patterns (Fig. 3), with 50-kHz USV consistently leading to social approach behavior in the recipient (Fig. 3 and Table 1). In juvenile and adult male rats, playback of 50-kHz USV induces an increase in locomotor activity directed toward the acoustic stimulus source (Wöhr and Schwarting, 2007, 2009, 2012). Consistently, behavioral effects were more pronounced in juvenile than adult males. The latter is probably linked to the fact that the level of social motivation is higher in juveniles than adults. For instance, Salchner et al. (2004) showed that aged rats spent less time actively interacting with conspecifics as compared to young rats. Juvenile rats tested in the studies using the 50-kHz USV radial maze playback paradigm were all in their rough-and-tumble play phase during which particularly high rates of 50-kHz USV are emitted (Burgdorf et al., 2008; Knutson et al., 1998; Webber et al., 2012). While male social approach behavior elicited by 50-kHz USV is clearly age-dependent, with only moderate responses in adult males, behavioral responses in adult females were much stronger than in adult males, reaching a level comparable to juveniles (Willadsen et al., *in press*). This result is in stark contrast to a recent study by Snoeren and Ågmo (*in press*), but consistent with a wealth of findings by Barfield and colleagues, supporting the conclusion that male pro-social 50-kHz USV are likely to play an important role in (re)establishing and maintaining social proximity and possibly in regulating mating behavior (Barfield et al., 1979; Geyer et al., 1978; McIntosh et al., 1978; Thomas et al., 1981, 1982; White and Barfield, 1990; White et al., 1990; for review see: Barfield and Thomas, 1986). It is therefore tempting to speculate that the sex-dependent difference in social approach behavior in response to 50-kHz USV is linked to the higher biological significance of the signal in females.

However, social approach behavior was not specifically seen in response to 50-kHz USV, as similar responses were also elicited by

playback of artificial 50-kHz sine wave tones, which were identical to 50-kHz USV with respect to peak frequency, call length and temporal patterning (Wöhr and Schwarting, 2007). This indicates that frequency modulation of 50-kHz USV is not required for eliciting social approach behavior, possibly because of categorical perception mechanisms similar to the ones observed in mice (Ehret, 1992; Ehret and Haack, 1981, 1982). It has to be noted, however, that the behavioral response pattern elicited by artificial 50-kHz sine wave tones was not identical to the one seen in response to 50-kHz USV. In the second experiment in juvenile male rats, playback of 50-kHz USV, but not artificial 50-kHz sine wave tones, led to a strong increase in locomotor activity. Also in the third experiment in adult male rats, differences were obtained. Here, artificial 50-kHz sine wave tones led to a similar increase in locomotor activity as 50-kHz USV, but only 50-kHz USV led to a clear preference as assessed by both, proximal arm entries and the time spent thereon. In order to test whether this is a biologically meaningful difference, it would be interesting to assess preferences in rats exposed to both stimuli at the same time.

In contrast to 50-kHz USV, playback of 22-kHz USV was found to be followed by moderate behavioral inhibition in juvenile male rats (Wöhr and Schwarting, 2007). Despite the weakness of the observed behavioral inhibition, this finding is consistent with the idea that 22-kHz USV serve as alarm calls to warn conspecifics about external danger (e.g. Blanchard et al., 1991; for review see: Litvin et al., 2007). The weakness of the observed effect is possibly due to the fact that the juvenile rats used in the experiment by Wöhr and Schwarting (2007) had not been exposed to aversive events before. In fact, there is evidence that the fear response to 22-kHz USV is not innate, but is learned through observational learning in the social context, i.e. social fear learning (Wöhr and Schwarting, 2008b) or auto-conditioning (Kim et al., 2010; Parsana et al., 2012b). Rats appear to be predisposed to associate aversive events and 22-kHz USV (Bang et al., 2008; Endres et al., 2007). Importantly, the opposite behavioral responses elicited by 50-kHz and 22-kHz USV are paralleled by distinct patterns of brain activation as assessed by means of the immediate early gene *c-fos* (Sadananda et al., 2008). While 50-kHz USV are followed by increased activity levels in the nucleus accumbens, a key structure for reward processing and 50-kHz USV emission (Burgdorf et al., 2001), 22-kHz USV induced activation in amygdala and periaqueductal gray, i.e. important parts of the fear circuitry (Fendt and Fanselow, 1999; LeDoux, 2000). Increased amygdala activity levels in response to 22-kHz USV were also found in electrophysiological recordings (Parsana et al., 2012a). Remarkably, 50-kHz USV led to decreased activation patterns in this study (Parsana et al., 2012a).

Strong behavioral inhibition was also seen in juvenile male and adult female rats exposed to time- and amplitude-matched white noise (Willadsen et al., *in press*; Wöhr and Schwarting, 2012). As the behavioral inhibition seen in response to time- and amplitude-matched white noise was much stronger than the effects observed in rats exposed to playback of background noise, with either no or only mild effects on locomotor activity (Wöhr and Schwarting, 2007, 2009), it is tempting to speculate that behavioral inhibition induced by the former stimulus is due to sound energy within the critical frequency range of 22-kHz USV. However, this would indicate that the long call durations that are typically seen in case of 22-kHz USV are not necessary for inducing behavioral inhibition, as white noise stimuli were time-matched to 50-kHz USV.

8. Discussion: opioid system and social acoustic memory

Besides age, sex, and acoustic stimulus configuration, social approach behavior elicited by 50-kHz USV depends on an intact opioid system and social acoustic memory processes, as indicated

in pharmacological studies using the 50-kHz USV radial maze playback paradigm (Wöhr and Schwarting, 2007, 2012). In juvenile and adult rats, social approach displayed in response to playback of 50-kHz USV was reduced following treatment with the opioid antagonist naloxone (1 mg/kg), but enhanced by morphine (1 mg/kg). Drug treatment did not affect the behavioral response to background noise, indicating that low doses of opioid ligands specifically affect social approach behavior induced by playback of 50-kHz USV. This observation is in line with similar drug effects on rough-and-tumble play (Vanderschuren et al., 1995a,b) and supports the notion that an important feature of social interaction in rats, namely ultrasonic communication, is at least partially regulated by endogenous opioids. It is noteworthy that mice lacking the μ -opioid receptor do not display behavioral changes when exposed to USV recorded during female–female interactions in the first application of the mouse version of the 50-kHz USV radial maze playback paradigm (Wöhr et al., 2011); a finding in line with their social communication deficits observed during early development (Moles et al., 2004).

As pointed out above, social approach behavior was found to be most robustly elicited in the first minute during a 5-min presentation of 50-kHz USV (Wöhr and Schwarting, 2012). In the same study, it was further shown that social approach behavior occurs during the first 5-min exposure to 50-kHz USVs, whereas no such response occurs during the second exposure one week later. However, when memory formation was blocked by systemic administration of the amnesia-inducing drug scopolamine (0.5 mg/kg or 1.5 mg/kg) immediately after the first exposure, rats displayed social approach behavior during the second exposure as if never exposed to 50-kHz USV before. Together, this indicates the involvement of social acoustic memory processes as an important aspect of the 50-kHz USV radial maze playback paradigm.

9. Future perspective

Social and communication deficits are prominent symptoms in a number of neuropsychiatric disorders, particularly in case of neurodevelopmental disorders, such as autism and schizophrenia. Autism is characterized by aberrant reciprocal social interactions, deficits in social communication, plus repetitive and stereotyped behaviors or interests (American Psychiatric Association, 2013). There is a remarkable overlap of symptoms in autism and schizophrenia, including negative symptoms, such as poverty of speech and social withdrawal (American Psychiatric Association, 2013). As autism and schizophrenia are purely behaviorally defined, there is a tremendous need for reliable behavioral assays with face validity to social communication deficits seen in neurodevelopmental disorders in order to study underlying genetic and neurobiological alterations (Silverman et al., 2010).

Up to now, group-housed Wistar rats were tested in all studies using the 50-kHz USV radial maze playback paradigm. Since rats are highly social animals and rough-and-tumble play during adolescence has an important role for social development, however, it appears likely that social isolation during this period affects social approach behavior elicited by 50-kHz USV. In fact, separation from conspecifics during adolescence is known to impair social behavior and post-weaning social isolation in rats is a widely used animal model for schizophrenia (Fone and Porkess, 2008; Lapiz et al., 2003). Also, the newly generated genetic rat models for autism could be easily tested in the 50-kHz USV radial maze playback paradigm (Wöhr and Scattoni, 2013). In general, it would be of great interest to see whether the newly developed rat social communication assay can help to reveal deficits in social communication in rat models for autism and schizophrenia. Currently available data indicate that pro-social ultrasonic communication can be studied in

a reliable and highly standardized manner by means of the 50-kHz USV radial maze playback paradigm.

Acknowledgement

M.W. is supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG WO 1732/1-1).

References

- Allin JT, Banks EM. Functional aspects of ultrasound production by infant albino rats (*Rattus norvegicus*). *Anim Behav* 1972;20:175–85.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th ed. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing; 2013.
- Bang SJ, Allen TA, Jones LK, Boguszewski P, Brown TH. Asymmetrical stimulus generalization following differential fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 2008;90:200–16.
- Barfield RJ, Auerbach P, Geyer LA, McIntosh TK. Ultrasonic vocalizations in rat sexual behavior. *Am Zool* 1979;19:469–80.
- Barfield RJ, Thomas DA. The role of ultrasonic vocalizations in the regulation of reproduction in rats. *Ann N Y Acad Sci* 1986;474:33–43.
- Blanchard RJ, Blanchard DC, Agullana R, Weiss SM. Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. *Physiol Behav* 1991;50:967–72.
- Borden R, Walker M, Latané B. Ultrasounds and social attraction in rats: concomitants or determinants. *Bull Psychon Soc* 1977;10:89–91.
- Borta A, Wöhr M, Schwarting RKW. Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. *Behav Brain Res* 2006;166:271–80.
- Brudzynski SM. Ethotransmission: communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Curr Opin Neurobiol* 2013;23:310–7.
- Brudzynski SM, Pniak A. Social contacts and production of 50-kHz short ultrasonic calls in adult rats. *J Comp Psychol* 2002;116:73–82.
- Burgdorf J, Knutson B, Panksepp J, Ikemoto S. Nucleus accumbens amphetamine microinjections unconditionally elicit 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Behav Neurosci* 2001;115:940–4.
- Burgdorf J, Kroes RA, Moskal JR, Pfau JG, Brudzynski SM, Panksepp J. Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. *J Comp Psychol* 2008;122:357–67.
- Burgdorf J, Panksepp J, Brudzynski SM, Beinfeld MC, Cromwell HC, Kroes RA, et al. The effects of selective breeding for differential rates of 50-kHz ultrasonic vocalizations on emotional behavior in rats. *Dev Psychobiol* 2009;51:34–46.
- Burgdorf J, Panksepp J, Moskal JR. Frequency-modulated 50 kHz ultrasonic vocalizations: a tool for uncovering the molecular substrates of positive affect. *Neurosci Biobehav Rev* 2011;35:1831–6.
- Burman OHP, Ilyat A, Jones G, Mendl M. Ultrasonic vocalizations as indicators of welfare for laboratory rats (*Rattus norvegicus*). *Appl Anim Behav Sci* 2007;104:116–29.
- Choi JS, Brown TH. Central amygdala lesions block ultrasonic vocalization and freezing as conditional but not unconditional responses. *J Neurosci* 2003;23:8713–21.
- Ehret G. Categorical perception of mouse-pup ultrasounds in the temporal domain. *Anim Behav* 1992;43:409–16.
- Ehret G, Haack B. Categorical perception of mouse pup ultrasound by lactating females. *Naturwissenschaften* 1981;68:208.
- Ehret G, Haack B. Ultrasound recognition in house mice: key-stimulus configuration and recognition mechanisms. *J Comp Physiol* 1982;148:245–51.
- Endres T, Widmann K, Fendt M. Are rats predisposed to learn 22 kHz calls as danger-predicting signals. *Behav Brain Res* 2007;185:69–75.
- Fendt M, Fanselow MS. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 1999;23:743–60.
- Fone K, Porkess V. Behavioral and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents – relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 2008;32:1087–102.
- Geyer LA, McIntosh TK, Barfield RJ. Effects of ultrasonic vocalizations and male's urine on female rat readiness to mate. *J Comp Physiol Psychol* 1978;92:457–62.
- Hofer MA, Shair HN. Ultrasonic vocalization, laryngeal braking, and thermogenesis in rat pups: a reappraisal. *Behav Neurosci* 1993;107:354–62.
- Kim EJ, Kim ES, Covey E, Kim JJ. Social transmission of fear in rats: the role of 22-kHz ultrasonic distress vocalizations. *PLoS ONE* 2010;5:e15077.
- Knutson B, Burgdorf J, Panksepp J. Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. *J Comp Psychol* 1998;112:65–73.
- Lapiz MD, Fulford A, Muchimapura S, Mason R, Parker T, Marsden CA. Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission. *Neurosci Behav Physiol* 2003;33:13–29.
- LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 2000;23:155–84.
- Litvin Y, Blanchard DC, Blanchard RJ. Rat 22 kHz ultrasonic vocalizations as alarm cries. *Behav Brain Res* 2007;182:166–72.
- Łopuch S, Popik P. Cooperative behavior of laboratory rats (*Rattus norvegicus*) in an instrumental task. *J Comp Psychol* 2011;125:250–3.
- McIntosh TK, Barfield RJ, Geyer LA. Ultrasonic vocalisations facilitate sexual behaviour in female rats. *Nature* 1978;272:163–4.

- Moles A, Kieffer BL, D'Amato FR. Deficit in attachment behavior in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Science* 2004;304:1983–6.
- Panksepp J. Psychology. Beyond a joke: from animal laughter to human joy. *Science* 2005;308:62–3.
- Panksepp J, Burgdorf J. 50-kHz chirping (laughter?) in response to conditioned and unconditioned tickle-induced reward in rats: effects of social housing and genetic variables. *Behav Brain Res* 2000;115:25–38.
- Panksepp J, Gordon N, Burgdorf J. Empathy and the action–perception resonances of basic socio-emotional systems of the brain. *Behav Brain Sci* 2002;25:43–4.
- Parsana AJ, Li N, Brown TH. Positive and negative ultrasonic social signals elicit opposing firing patterns in rat amygdala. *Behav Brain Res* 2012a;226:77–86.
- Parsana AJ, Moran EE, Brown TH. Rats learn to freeze to 22-kHz ultrasonic vocalizations through autoconditioning. *Behav Brain Res* 2012b;232:395–9.
- Rygula R, Pluta H, Popik P. Laughing rats are optimistic. *PLoS ONE* 2012;7:e51959.
- Salchner P, Lubec G, Singewald N. Decreased social interaction in aged rats may not reflect changes in anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res* 2004;151:1–8.
- Sadananda M, Wöhr M, Schwarting RKW. Playback of 22-kHz and 50-kHz ultrasonic vocalizations induces differential c-fos expression in rat brain. *Neurosci Lett* 2008;435:17–23.
- Sales GD. Ultrasound and aggressive behaviour in rats and other small mammals. *Anim Behav* 1972a;20:88–100.
- Sales GD. Ultrasound and mating behaviour in rodents with some observations on other behavioural situations. *J Zool* 1972b;168:149–64.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 2003;301:805–9.
- Scattoni ML, Crawley J, Ricceri L. Ultrasonic vocalizations: a tool for behavioural phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 2009;33:508–15.
- Schwarting RK, Jegan N, Wöhr M. Situational factors, conditions and individual variables which can determine ultrasonic vocalizations in male adult Wistar rats. *Behav Brain Res* 2007;182:208–22.
- Silverman JL, Yang M, Lord C, Crawley JN. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat Rev Neurosci* 2010;11:490–502.
- Siviy SM, Panksepp J. Sensory modulation of juvenile play in rats. *Dev Psychobiol* 1987;20:39–55.
- Snoeren EM, Ågmo A. Female ultrasonic vocalizations have no incentive value for male rats. *Behav Neurosci* 2013;127:439–50.
- Snoeren EM, Ågmo A. The incentive value of males' 50-kHz ultrasonic vocalizations for female rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 2014 [in press].
- Thomas DA, Howard SB, Barfield RJ. Male produced ultrasonic vocalizations and mating patterns in female rats. *J Comp Physiol Psychol* 1982;96:807–15.
- Thomas DA, Talalas L, Barfield RJ. Effects of devocalization of the male on mating behavior in rats. *J Comp Physiol Psychol* 1981;95:630–7.
- Vanderschuren LJMJ, Niesink RJM, Spruijt BM, Van Ree JM. Effects of morphine on different aspects of social play in juvenile rats. *Psychopharmacology (Berlin)* 1995a;117:225–31.
- Vanderschuren LJMJ, Niesink RJM, Spruijt BM, Van Ree JM. μ - and κ -opioid receptor-mediated opioid effects on social play in juvenile rats. *Eur J Pharmacol* 1995b;276:257–66.
- Webber ES, Harmon KM, Beckwith TJ, Peña S, Burgdorf J, Panksepp J, et al. Selective breeding for 50 kHz ultrasonic vocalization emission produces alterations in the ontogeny and regulation of rough-and-tumble play. *Behav Brain Res* 2012;229:138–44.
- White NR, Barfield RJ. Role of the ultrasonic vocalization of the female rat (*Rattus norvegicus*) in sexual behavior. *J Comp Psychol* 1987;101:73–81.
- White NR, Barfield RJ. Playback of female rat ultrasonic vocalizations during sexual behavior. *Physiol Behav* 1989;45:229–33.
- White NR, Colona LC, Barfield RJ. Sensory cues that elicit ultrasonic vocalizations in female rats (*Rattus norvegicus*). *Behav Neural Biol* 1991;55:154–65.
- White NR, Barfield RJ. Effects of male pre-ejaculatory vocalizations on female receptive behavior in the rat (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 1990;104:140–6.
- White NR, Cagiano R, Moises AU, Barfield RJ. Changes in mating vocalizations over the ejaculatory series in rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 1990;104:255–62.
- White NR, Gonzales RN, Barfield RJ. Do vocalizations of the male rat elicit calling from the female. *Behav Neural Biol* 1993;59:16–78.
- Willadsen M, Seffer D, Schwarting RKW, Wöhr M. Rodent ultrasonic communication: male prosocial 50-kHz ultrasonic vocalizations elicit social approach behavior in female rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 2014 [in press].
- Wöhr M, Borta A, Schwarting RKW. Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: a dose–response study in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 2005;84:228–40.
- Wöhr M, Houx B, Schwarting RKW, Spruijt B. Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. *Physiol Behav* 2008;93:766–76.
- Wöhr M, Kehl M, Borta A, Schänzer A, Schwarting RKW, Höglinger GU. New insights into the relationship of neurogenesis and affect: tickling induces hippocampal cell proliferation in rats emitting appetitive 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Neuroscience* 2009;163:1024–30.
- Wöhr M, Moles A, Schwarting RK, D'Amato FR. Lack of social exploratory activation in male μ -opioid receptor KO mice in response to playback of female ultrasonic vocalizations. *Soc Neurosci* 2011;6:76–87.
- Wöhr M, Scattoni ML. Behavioural methods used in rodent models of autism spectrum disorders: current standards and new developments. *Behav Brain Res* 2013;251:5–17.
- Wöhr M, Schwarting RKW. Ultrasonic communication in rats: can playback of 50-kHz calls induce approach behavior? *PLoS ONE* 2007;2:e1365.
- Wöhr M, Schwarting RKW. Maternal care, isolation-induced infant ultrasonic calling, and their relations to adult anxiety related behavior in the rat. *Behav Neurosci* 2008a;122:310–30.
- Wöhr M, Schwarting RKW. Ultrasonic calling during fear conditioning in the rat: no evidence for an audience effect. *Anim Behav* 2008b;76:749–60.
- Wöhr M, Schwarting RKW. Ultrasonic communication in rats: effects of morphine and naloxone on vocal and behavioral responses to playback of 50-kHz vocalizations. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;94:285–95.
- Wöhr M, Schwarting RKW. Testing social acoustic memory in rats: effects of stimulus configuration and long-term memory on the induction of social approach behavior by appetitive 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Neurobiol Learn Mem* 2012;98:154–64.
- Wöhr M, Schwarting RKW. Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. *Cell Tissue Res* 2013;354:81–97.
- Won H, Lee HR, Gee HY, Mah W, Kim JI, Lee J, et al. Autistic-like social behaviour in Shank2-mutant mice improved by restoring NMDA receptor function. *Nature* 2012;486:261–5.

STUDIE III:

Seffer D, Rippberger H, Schwarting RKW, Wöhr M. (2015) Pro-social 50-kHz ultrasonic communication in rats: Post-weaning but not post-adolescent social isolation leads to social impairments – phenotypic rescue by re-socialization. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9:102.

Pro-social 50-kHz ultrasonic communication in rats: post-weaning but not post-adolescent social isolation leads to social impairments—phenotypic rescue by re-socialization

Dominik Seffer*, Henrike Rippberger, Rainer K. W. Schwarting and Markus Wöhr*

Behavioral Neuroscience, Experimental and Biological Psychology, Philipps-University of Marburg, Marburg, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Regina Marie Sullivan,
Nathan Kline Institute and New York
University School of Medicine, USA

Reviewed by:

Mu Yang,
University of California Davis School of
Medicine, USA
Piotr Popik,
Polish Academy of Sciences, Poland

*Correspondence:

Dominik Seffer and Markus Wöhr,
Behavioral Neuroscience,
Experimental and Biological
Psychology, Faculty of Psychology,
Philipps-University of Marburg,
Gutenbergstr. 18, 35032 Marburg,
Germany
seffer@staff.uni-marburg.de;
woehrm@staff.uni-marburg.de

Received: 06 March 2015

Accepted: 07 April 2015

Published: 01 May 2015

Citation:

Seffer D, Rippberger H, Schwarting
RKW and Wöhr M (2015) Pro-social
50-kHz ultrasonic communication in
rats: post-weaning but not
post-adolescent social isolation leads
to social impairments—phenotypic
rescue by re-socialization.
Front. Behav. Neurosci. 9:102.
doi: 10.3389/fnbeh.2015.00102

Rats are highly social animals and social play during adolescence has an important role for social development, hence post-weaning social isolation is widely used to study the adverse effects of juvenile social deprivation and to induce behavioral phenotypes relevant to neuropsychiatric disorders, like schizophrenia. Communication is an important component of the rat's social behavior repertoire, with ultrasonic vocalizations (USV) serving as situation-dependent affective signals. High-frequency 50-kHz USV occur in appetitive situations and induce approach behavior, supporting the notion that they serve as social contact calls; however, post-weaning isolation effects on the behavioral changes displayed by the receiver in response to USV have yet to be studied. We therefore investigated the impact of post-weaning isolation on socio-affective information processing as assessed by means of our established 50-kHz USV radial maze playback paradigm. We showed that post-weaning social isolation specifically affected the behavioral response to playback of pro-social 50-kHz but not alarm 22-kHz USV. While group-housed rats showed the expected preference, i.e., approach, toward 50-kHz USV, the response was even stronger in short-term isolated rats (i.e., 1 day), possibly due to a higher level of social motivation. In contrast, no approach was observed in long-term isolated rats (i.e., 4 weeks). Importantly, deficits in approach were reversed by peer-mediated re-socialization and could not be observed after post-adolescent social isolation, indicating a critical period for social development during adolescence. Together, these results highlight the importance of social experience for affiliative behavior, suggesting a critical involvement of play behavior on socio-affective information processing in rats.

Keywords: juvenile social isolation, affiliative behavior, rough-and-tumble play, schizophrenia, negative symptoms

Introduction

In social species, like humans and other mammals, early life experiences are crucial for the development of social and cognitive skills. Positive relationships between parent and child, as well

as among peers promote appropriate acquisition of adult social competency. In contrast, disruptions of social attachment during critical developmental periods can lead to various behavioral alterations, including deficits in emotional regulation and social impairments, and are considered as non-specific risk factors for developing psychopathologies (Cicchetti and Toth, 1995; Veenema, 2009; Braun and Bock, 2011). In fact, child maltreatment, such as sexual/physical abuse and social neglect, contribute to various forms of impaired functioning characterized by social withdrawal, like the development of anxiety and depressive disorders, but also psychosis and schizophrenia (Brown et al., 1999; Lansford et al., 2002; Read et al., 2005; Gilbert et al., 2009; Spinhoven et al., 2010; Varese et al., 2012; DeRosse et al., 2014). This could possibly be due to adverse effects on social information processing, such as attention to social cues, consequently leading to inappropriate regulation of both negative affect and aggression (Dodge et al., 1990; Shackman and Pollak, 2014). For instance, children exposed to an extreme form of social deprivation while being raised in an orphanage have an increased risk for delayed cognitive and socio-affective development, along with mental health disorders. Specifically, they display attention deficits, hyperactivity, and increased anxiety, together with impaired emotional regulation and social attachment (Nelson et al., 2007; Bos et al., 2011). Moreover, their language development is delayed, with particular deficits in verbal skills (Frank et al., 1996).

In rats, maternal separation and post-weaning social isolation are widely used to study the adverse effects of early social deprivation. Importantly, rats are highly social animals and live in groups (Whishaw and Kolb, 2005) with a distinct hierarchy (Baenninger, 1966), offering optimal experimental conditions to investigate social behavior and communication. For instance, rats engage in social play (Panksepp, 1981) and cooperative behavior (Willner et al., 1989; Łopuch and Popik, 2011), display direct (Rutte and Taborsky, 2008) and generalized reciprocity (Rutte and Taborsky, 2007), and, as recently shown, prefer mutual rewards in a pro-social choice test, resulting in benefits not only for themselves but also for conspecifics (Hernandez-Lallement et al., 2015). Similarly, evidence for helping behavior and empathy has been provided (Ben-Ami Bartal et al., 2011; but see Silberberg et al., 2014). Play with peers emerges as one of the earliest forms of social behavior that is not directed to the mother. In rats, social play behavior (also called rough-and-tumble play or play fighting) mainly occurs after weaning and reaches its peak during the middle of the juvenile stage (Panksepp, 1981). Lack of play during the critical developmental period, due to post-weaning isolation, leads to a behavioral phenotype characterized by prominent social impairments in adulthood (Hol et al., 1999; van den Berg et al., 1999a). Most notably, long-term changes in behavior with relevance to various neuropsychiatric disorders can be observed, including hyperactivity in a novel environment, altered responses to drugs of abuse, impaired sensorimotor gating, cognitive inflexibility, increased aggressive behavior, and social withdrawal (Hall, 1998; Lapiz et al., 2003; Fone and Porkess, 2008).

For rats, communication is an important component in the social behavior repertoire. Rats produce and perceive calls in the ultrasonic range (so called ultrasonic vocalizations, USV). Based on their acoustic features, various USV types can be differentiated which serve distinct communicative functions, as situation-dependent affective signals (Portfors, 2007; Brudzynski, 2013; Wöhr and Schwarting, 2013). In juvenile and adult rats, a distinction is made between 22- and 50-kHz USV. Low-frequency 22-kHz USV occur in aversive situations, such as predator exposure, social defeat, and fear learning, and are thought to be reflecting a negative affective state of the sender. They serve as an alarm function and induce freezing behavior in the recipient. In contrast, high-frequency 50-kHz USV occur in appetitive situations, mostly social ones, such as rough-and-tumble play (Knutson et al., 1998), tickling (Panksepp and Burgdorf, 2000; Burgdorf and Panksepp, 2001), and sexual behavior (Sales, 1972), and are thought to be reflecting a positive affective state. In support for a communicative function, evidence was recently provided that juvenile 50-kHz USV promote and maintain playful social interactions (Himmler et al., 2014), while play behavior is reduced in pairs of devocalized rats (Kisko et al., 2015). Furthermore, it was repeatedly shown that playback of 50-kHz USV induces approach behavior in the recipient, supporting the notion that they serve as social contact calls (Wöhr and Schwarting, 2007, 2009, 2012; Willuhn et al., 2014).

Interestingly, there is evidence that post-weaning isolation affects USV production in rats. For instance, the rate of 50-kHz USV emission during social play and tickling is increased following isolation, possibly due to an increase in social motivation (Knutson et al., 1998; Panksepp and Burgdorf, 2000; Burgdorf and Panksepp, 2001). Furthermore, Inagaki et al. (2013) found a strong decrease in 50-kHz USV in male rats exposed to a sexually receptive female after prolonged isolation, likely reflecting their inability to recognize social cues and/or to respond appropriately. Finally, von Frijtag et al. (2002) observed that, in the presence of an aggressive resident, socially isolated male rats display impaired suppression of play behavior, suffer more harming attacks, and emit more 22-kHz USV than their group-housed counterparts. They suggested that 22-kHz USV production was dissociated from the sender's behavioral pattern and therefore lost its aggression-reducing communicative function.

In contrast, post-weaning isolation effects on the behavioral changes displayed by the receiver in response to USV have yet to be studied. Therefore, we investigated the impact of post-weaning isolation on socio-affective information processing as assessed by means of our established 50-kHz USV radial maze playback paradigm that allows to study pro-social ultrasonic communication in a reliable and highly standardized manner (Seffer et al., 2014). It was hypothesized that (I) post-weaning social isolation will impair approach behavior in response to playback of pro-social 50-kHz USV, that (II) this phenotype can be rescued by peer-mediated re-socialization, and that (III) isolation-induced deficits depend on the time period of isolation during development.

Materials and Methods

Animals

Male Wistar rats (HsdCpb:WU, Harlan, Venray, The Netherlands) served as subjects and were housed in an animal room with a 12:12 h light/dark cycle (lights on 8–20 h) where the environmental temperature was maintained between 20 and 23°C (humidity: 30–50%). Lab chow (Altromin, Lage, Germany) and water (0.0004% HCl-solution) were available *ad libitum*. Rats were handled for three consecutive days prior to testing in a standardized way for 5 min. All experimental procedures were performed according to legal requirements of Germany and approved by the ethical committee of the local government (Regierungspräsidium Gießen, Germany).

General Overview

To assess the impact of post-weaning social isolation on approach behavior induced by pro-social 50-kHz USV, we used our 50-kHz USV radial maze playback paradigm (Seffer et al., 2014). In total, three experiments were conducted, all using a 3 × 3 design with the factors experimental housing condition and acoustic stimulus (Figure 1A). Nine experimental groups of $N = 12$ rats per experimental housing/acoustic stimulus combination were used. Rats were exposed to one of the following three acoustic stimuli: (I) pro-social 50-kHz USV; (II) alarm 22-kHz USV; or (III) background noise (NOISE). 22-kHz USV and NOISE were used to assure specificity of the effects of isolation on approach

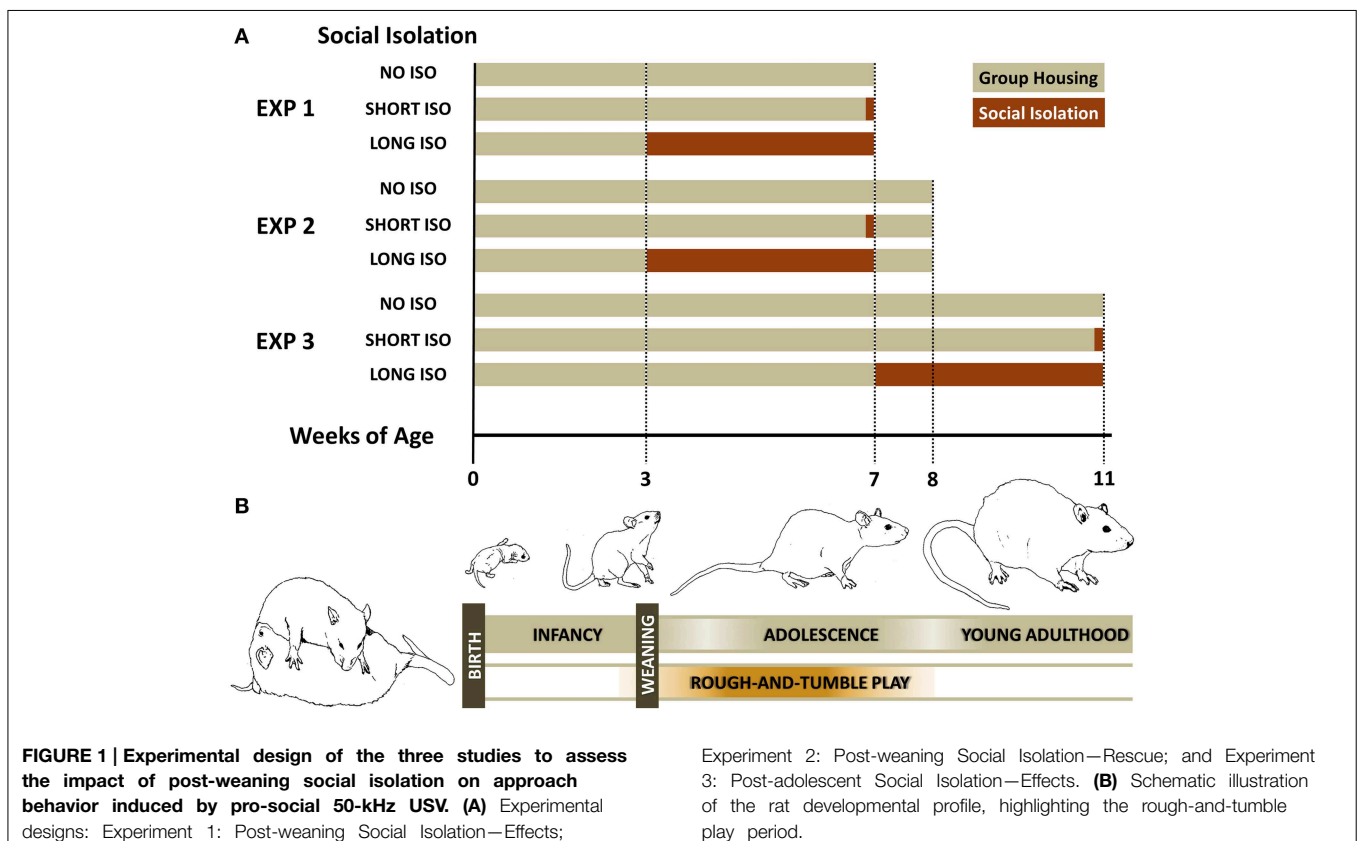
behavior induced by 50-kHz USV. Of note, Wistar rats were shown to have the ability to perceive acoustic stimuli in the audible and ultrasonic range (Borg, 1982).

Experiment 1: Post-weaning Social Isolation—Effects

In Experiment 1, we exposed rats to one of the following three experimental housing conditions for 4 weeks: (I) group housing (NO ISO), with rats being housed in groups of six; (II) short-term social isolation (SHORT ISO), with rats housed in groups of six, but isolated 24 h prior testing; or (III) long-term social isolation (LONG ISO), with rats being isolated for 28 days prior testing. Rats were isolated as weanlings at about 3 weeks of age. At about 7 weeks of age (body weight: 246.44 ± 1.43 g; range: 208.5–276.5 g), they were exposed to (I) 50-kHz USV, (II) 22-kHz USV, or (III) NOISE.

Experiment 2: Post-weaning Social Isolation—Rescue

In Experiment 2, we tested for phenotypic rescue by adding one additional week of peer rearing after being housed under one of the three experimental housing conditions for 4 weeks, i.e., (I) NO ISO, (II) SHORT ISO, or (III) LONG ISO, since recent findings demonstrated that social deficits displayed by a well-established autism model can be improved by peer intervention (Yang et al., 2011). As in Experiment 1, rats were isolated as weanlings at about 3 weeks of age. After one additional



week of peer rearing, at about 8 weeks of age (body weight: 280.88 ± 2.01 g; range: 236.5–326.0 g), they were exposed to (I) 50-kHz USV, (II) 22-kHz USV, or (III) NOISE, as in Experiment 1.

Experiment 3: Post-adolescent Social Isolation—Effects

In Experiment 3, we tested for the existence of a critical window for developing social deficits induced by post-weaning social isolation. To this aim, post-adolescent young adult rats at about 7 weeks of age, and after going through the rough-and-tumble play period (Figure 1B; Panksepp, 1981), were exposed to one of the three experimental housing conditions for 4 weeks, i.e., (I) NO ISO, (II) SHORT ISO, or (III) LONG ISO. At about 11 weeks of age (body weight: 383.93 ± 1.91 g; range: 349.0–444.0 g), they were exposed to (I) 50-kHz USV, (II) 22-kHz USV, or (III) NOISE, as in Experiment 1.

Experimental Housing

Group housing was conducted in polycarbonate Macrolon type IV cages ($380 \times 200 \times 590$ mm, plus high stainless steel covers) and isolation rearing in Macrolon type III cages ($265 \times 150 \times 425$ mm, plus high stainless steel covers), both filled with Tapvei peeled aspen bedding (indulab ag, Gams, Switzerland).

Experimental Setting

Playback of acoustic stimuli was conducted under dim red light (~ 10 lux) on a radial eight arm maze made of black plastic, elevated 52 cm above the floor (Figures 2A–D). The arms (9.8×40.5 cm) extend radially from a central platform (diameter: 24 cm). Acoustic stimuli were presented through an ultrasonic loudspeaker (ScanSpeak, Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany) using an external sound card with a sampling rate of 192 kHz (Fire Wire Audio Capture FA-101, Edirol, London, UK). The loudspeaker had a frequency range of 1–120 kHz with a relatively flat frequency response (± 12 dB) between 15 and 80 kHz and it was placed 20 cm away from the end of one arm. An additional, but inactive ultrasonic loudspeaker was arranged symmetrically at the opposite arm as visual control. Rats were tested in a testing room with no experimenter or other rats present. Stimulus application and animal observation was performed in a separate control room. Behavioral tests were conducted between 8 and 18 h. Before each test, behavioral equipment was cleaned (0.1% acetic acid solution) and dried.

Acoustic Stimuli

Rats were exposed to 5 min of playback of one of the following three acoustic stimuli: (I) pro-social 50-kHz USV, (II) alarm 22-kHz USV, and (III) background noise (NOISE; for details see (Wöhr and Schwarting, 2007, 2009, 2012; Seffer et al., 2014; Willuhn et al., 2014; Figures 3A–C, Supplementary Figures 2A–C, 3A–C). Briefly, playback of 50-kHz USV consisted of 1105 calls, including flat and frequency-modulated calls, recorded from an adult male Wistar rat during exploration of a cage containing scents from a recently separated cage mate (for setting and recording see Wöhr et al., 2008). This recording context had been chosen since playback of 50-kHz USV recorded

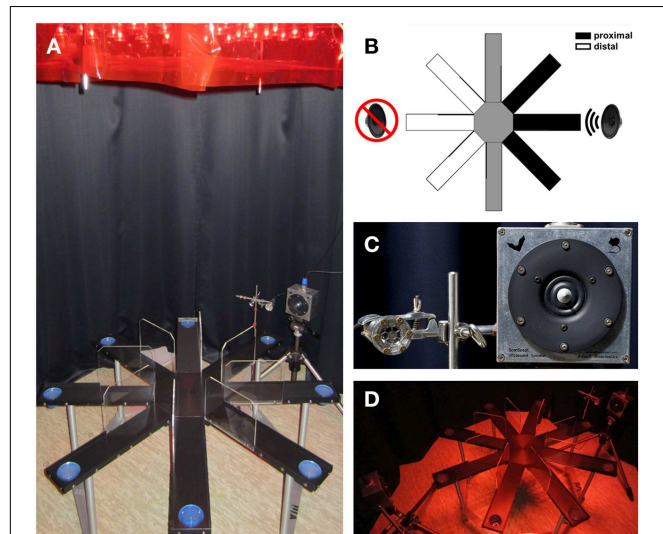


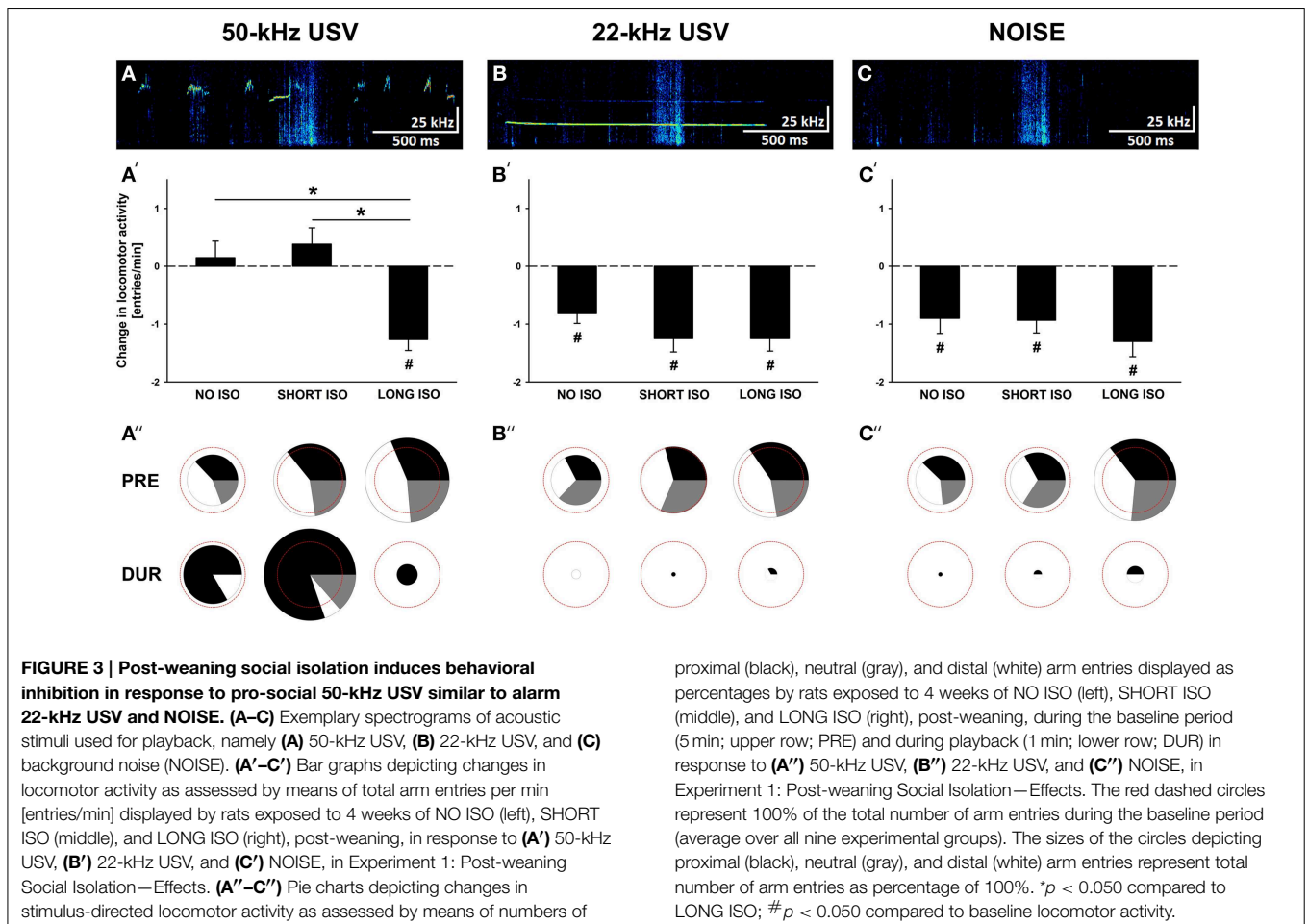
FIGURE 2 | Setup of the 50-kHz USV radial maze playback paradigm.

(A) Elevated eight arm radial maze equipped with two ultrasonic microphones and two ultrasonic loudspeakers positioned opposite to each other (only one ultrasonic microphone and the active loudspeaker are shown). The rat's behavioral responses during playback of acoustic stimuli were recorded with a video camera positioned above the radial maze. (B) Schematic illustration of the radial maze, depicting area definitions to assess approach behavior, with arms close to the loudspeaker denoted as proximal, central arms as neutral, and opposite arms as distal. (C) Acoustic stimuli were presented by an ultrasonic loudspeaker (sampling rate: 192 kHz; 16 bit), with accurate playback of acoustic stimuli being confirmed by means of ultrasonic microphones. (D) Testing was performed under dim red light.

during tickling or exploration of an empty cage had no or only very moderate effects on the behavior displayed by the receiver (Burman et al., 2007; Endres et al., 2007). Average acoustic call parameters were (mean \pm SEM): call duration: 0.07 ± 0.01 s; peak frequency: 61.24 ± 1.75 kHz; frequency modulation: 31.68 ± 4.62 kHz. Besides 50-kHz USV, playback contained background noise, produced by the rat while exploring the cage. Playback of 22-kHz USV consisted of 145 calls recorded from a male Wistar rat which had received electric foot-shocks before, but not during recording (for setting and recording see Wöhr et al., 2005). Average acoustic call parameters were: call duration: 1.18 ± 0.06 s; peak frequency: 23.61 ± 0.07 kHz; frequency modulation: 1.90 ± 0.09 kHz. To control for background noise as present in the 50-kHz USV stimulus, background noise was added to the 22-kHz USV stimulus. Background noise alone (NOISE), i.e., without USV, served to control for unspecific effects, i.e., novelty-induced changes in behavior not linked to the communicative function of 50-kHz USV. All stimuli were presented with a sampling rate of 192 kHz in 16 bit format at ~ 69 dB, with the exception of NOISE that was presented at ~ 50 dB (measured from a distance of 40 cm).

Experimental Procedure

Rats were placed onto the central platform of the radial maze with their body axis at an angle of 90° to the two ultrasonic loudspeakers. After an initial habituation phase of 15 min where



no acoustic stimuli were presented, the rat was exposed to one of the three acoustic stimuli for 5 min.

Behavioral Recording and Analysis

Behavior was monitored by a video camera (Panasonic WV-BP 330/GE, Hamburg, Germany) from about 150 cm above the radial maze, which fed into an external multimedia hard drive (ScreenPlay Pro HD, Iomega, San Diego, CA, USA). For behavioral analysis, a trained observer scored the videos for the following parameters (Seffer et al., 2014): (I) total number of arm entries, (II) number of entries into the three arms proximal to or distal from the active ultrasonic loudspeaker, and (III) the time spent on proximal and distal arms. An arm entry was counted when all four paws were in the arm. Total number of arm entries served as measure for general locomotor activity. Proximal vs. distal arm entries and the time spent thereon served as measures for stimulus-directed locomotor activity. Behavioral analysis was focused on the first min of acoustic stimulus exposure, since behavioral changes in response to 50-kHz USV are short-lasting, with most prominent changes occurring during the first min of playback (Wöhr and Schwarting, 2012; Willuhn et al., 2014; Supplementary Figures 1A,B).

USV Recording and Analysis

Accurate playback of acoustic stimuli was confirmed by means of two UltraSoundGate Condenser Microphones (CM16; Avisoft Bioacoustics) placed opposite to each other, 20 cm away from the radial maze (Seffer et al., 2014). For acoustical analysis, recordings (sampling rate: 250 kHz; format: 16 bit) were transferred to SASLab Pro (version 4.38; Avisoft Bioacoustics) and a fast Fourier transform was conducted (512 FFT-length, 100% frame, Hamming window and 75% time window overlap; Seffer et al., 2014). Importantly, no substantial USV production (<1/min on average) by the rats under study was detected (data not shown).

Statistical Analysis

General locomotor activity during the baseline period (PRE: total arm entries 5 min prior playback; average per min) was analyzed using ANOVAs with the between-subject factor experimental housing condition (NO ISO, SHORT ISO, vs. LONG ISO). To assess the effects of experimental housing conditions on stimulus-induced locomotor activity, ANOVAs for repeated measurements were calculated with the within-subject factor stimulus presentation before and during playback; average per min) and the between-subject factor experimental

housing condition (NO ISO, SHORT ISO, vs. LONG ISO) for 50-kHz USV, 22-kHz USV, and NOISE. To directly compare the latter, ANOVAs with the between-subject factor stimulus type were used. ANOVAs were followed by LSD *post-hoc* or paired *t*-tests when appropriate ($p < 0.050$). Paired *t*-tests were also used to compare proximal and distal arm entries and the time spent thereon before and during playback. Three rats had to be excluded from data analysis due to technical problems (Experiment 1: $N = 1$ from the NO ISO/22-kHz USV combination; Experiment 2: $N = 1$ from the SHORT ISO/50-kHz USV combination; Experiment 3: $N = 1$ from the NO ISO/NOISE combination). Data are presented as mean \pm SEM. A *p*-value of < 0.050 was considered statistically significant.

Results

Experiment 1: Post-weaning Social Isolation—Effects

To assess the impact of post-weaning isolation on approach behavior induced by 50-kHz USV, we used our 50-kHz USV radial maze playback paradigm (Seffer et al., 2014) and assessed approach in post-weaning rats exposed to (I) NO ISO, (II) SHORT ISO, or (III) LONG ISO.

In response to all three acoustic stimuli presented, i.e., pro-social 50-kHz USV, alarm 22-kHz USV, and NOISE, changes in locomotor activity, as assessed by means of total arm entries, were detected (Figures 3A'–C'). While 22-kHz USV and NOISE led to behavioral inhibition irrespective of experimental housing condition [main effect stimulus presentation: $F_{(1, 32)} = 82.719$; $p < 0.001$; interaction housing \times stimulus presentation: NS; and main effect stimulus presentation: $F_{(1, 32)} = 52.538$; $p < 0.001$; interaction housing \times stimulus presentation: NS, respectively], the behavioral response to 50-kHz USV was strongly affected by post-weaning isolation [main effect stimulus presentation: NS; interaction housing \times stimulus presentation: $F_{(1, 32)} = 12.147$; $p < 0.001$]. Specifically, rats exposed to LONG ISO displayed behavioral inhibition in response to 50-kHz USV [$t_{(11)} = 6.680$; $p < 0.001$], whereas NO ISO or SHORT ISO maintained their level of locomotor activity [$t_{(11)} = 0.526$; $p = 0.609$ and $t_{(11)} = 1.358$; $p = 0.202$, respectively], with both being significantly different from LONG ISO ($p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively). Importantly, LONG ISO rats displayed a level of behavioral inhibition in response to 50-kHz USV that was similar to the one seen in rats exposed to 22-kHz USV or NOISE (main effect stimulus type: NS).

Behavioral inhibition in response to 22-kHz USV and NOISE was typically reflected by a reduction in both, proximal and distal arm entries (not shown in detail; Figures 3B'', C''). In contrast, locomotor activity displayed by NO ISO and SHORT ISO rats in response to 50-kHz USV was clearly directed toward the sound source, as reflected by an increase in the number of proximal arm entries [$t_{(11)} = 2.820$; $p = 0.017$ and $t_{(11)} = 3.336$; $p = 0.007$, respectively], often paralleled by a decrease in distal arm entries [$t_{(11)} = 0.527$; $p = 0.609$ and $t_{(11)} = 3.960$; $p = 0.002$, respectively], whereas in LONG ISO rats proximal arm entries did not increase, with distal arm entries being reduced due to

behavioral inhibition [$t_{(11)} = 0.924$; $p = 0.375$ and $t_{(11)} = 9.544$; $p < 0.001$, respectively; Figure 3A'']. In general, locomotor activity during the baseline period was increased in rats exposed to LONG ISO [main effect housing: $F_{(2, 104)} = 6.816$; $p = 0.002$; LONG ISO vs. NO ISO: $p < 0.001$; LONG ISO vs. SHORT ISO: $p = 0.059$; SHORT ISO vs. NO ISO: $p = 0.076$]. This effect was also detectable in the subset of rats exposed to the 50-kHz USV stimulus condition, as reflected in the size of the pie charts [main effect housing: $F_{(2, 33)} = 3.702$; $p = 0.035$; LONG ISO vs. NO ISO: $p = 0.011$; LONG ISO vs. SHORT ISO: $p = 0.355$; SHORT ISO vs. NO ISO: $p = 0.091$].

Approach behavior induced by 50-kHz USV was not only reflected by proximal and distal arm entries but also by the time spent thereon. In NO ISO rats, the proximal time increased [$t_{(11)} = 2.920$; $p = 0.014$], while the distal time decreased [$t_{(11)} = 2.450$; $p = 0.032$], resulting in a significant preference toward the stimulus source during 50-kHz USV playback [$t_{(11)} = 3.621$; $p = 0.004$; Figure 4A]. Likewise, in SHORT ISO rats the proximal time increased [$t_{(11)} = 2.526$; $p = 0.028$], while the distal time decreased [$t_{(11)} = 5.947$; $p < 0.001$], again resulting in a significant preference toward the stimulus source during 50-kHz USV playback [$t_{(11)} = 5.641$; $p < 0.001$; Figure 4B]. However, this response pattern was not seen in LONG ISO rats when exposed to 50-kHz USV, since they displayed avoidance behavior and spent less time on both, proximal and distal arms [$t_{(11)} = 2.889$; $p = 0.015$ and $t_{(11)} = 14.581$; $p < 0.001$, respectively], and no significant preference toward the stimulus source during 50-kHz USV playback [$t_{(11)} = 2.040$; $p = 0.066$; Figure 4C]. No significant preferences were seen before playback (all *p*-values > 0.050).

Together, Experiment 1 shows that post-weaning isolation has a strong impact on approach behavior elicited by 50-kHz USV. Consistent with previous studies (Wöhr and Schwarting, 2007, 2009, 2012; Willuhn et al., 2014), approach is seen in NO ISO and SHORT ISO rats. Rats exposed to LONG ISO, however, respond to 50-kHz USV by behavioral inhibition, similar to the one seen in response to 22-kHz USV or NOISE, resulting in a complete lack of approach behavior. Importantly, post-weaning isolation specifically affected the behavioral response to 50-kHz USV and did not change the responses seen in rats exposed to 22-kHz USV or NOISE.

Experiment 2: Post-weaning Social Isolation—Rescue

To test whether it is possible to revert the deficits in approach behavior induced by post-weaning isolation, we assessed approach in post-weaning rats exposed to (I) NO ISO, (II) SHORT ISO, or (III) LONG ISO, followed by an additional week of peer rearing.

As in Experiment 1, changes in locomotor activity were detected in response to all three acoustic stimuli presented (Supplementary Figures 2A'–C'). Alarm 22-kHz USV led to behavioral inhibition, irrespective of experimental housing condition [main effect stimulus presentation: $F_{(1, 33)} = 35.597$; $p < 0.001$; interaction housing \times stimulus presentation: NS]. Behavioral inhibition was also seen in response to NOISE in all experimental housing conditions, yet most prominently in

displayed a slight increase in proximal arm entries [$t_{(11)} = 1.984$; $p = 0.073$], paralleled by a decrease in distal arm entries [$t_{(11)} = 4.899$; $p < 0.001$; Supplementary Figure 2A''].

Furthermore, in NO ISO rats the proximal time increased [$t_{(11)} = 3.088$; $p = 0.010$], while the distal time decreased [$t_{(11)} = 4.894$; $p < 0.001$], resulting in a significant preference toward the stimulus source during 50-kHz USV playback [$t_{(11)} = 3.874$; $p = 0.003$; **Figure 4D**]. Likewise, SHORT ISO rats, after one additional week of group housing, displayed a preference toward the stimulus source during 50-kHz USV playback [preference: $t_{(10)} = 3.448$; $p = 0.006$; proximal time: $t_{(10)} = 1.063$; $p = 0.313$; distal time: $t_{(11)} = 5.287$; $p < 0.001$; **Figure 4E**]. Most importantly, however, LONG ISO rats, after one additional week of group housing, also displayed a preference toward 50-kHz USV playback [preference: $t_{(11)} = 5.957$; $p = 0.009$; proximal time: $t_{(10)} = 0.879$; $p = 0.398$; distal time: $t_{(11)} = 4.014$; $p = 0.002$; **Figure 4F**]. No significant preferences were seen before playback (all p -values > 0.050).

Together, Experiment 2 shows that deficits in approach behavior induced by post-weaning isolation can be rescued by additional exposure to 1 week of peer rearing. This is in line with recent findings demonstrating that social deficits can be improved by peer intervention in a well-established autism model (Yang et al., 2011).

Experiment 3: Post-adolescent Social Isolation—Effects

To test whether the deficits in approach behavior induced by post-weaning social isolation occur specifically during the juvenile developmental period, we repeated the experiment and assessed approach in post-adolescent rats exposed to (I) NO ISO, (II) SHORT ISO, or (III) LONG ISO.

As before, changes in locomotor activity were detected in response to alarm 22-kHz USV and NOISE, yet, in Experiment 3, no effect of pro-social 50-kHz USV was detected (Supplementary Figures 3A'–C'). Again, 22-kHz USV and NOISE led to behavioral inhibition irrespective of experimental housing condition [main effect stimulus presentation: $F_{(1, 33)} = 53.598$; $p < 0.001$; interaction housing \times stimulus presentation: NS and main effect stimulus presentation: $F_{(1, 32)} = 30.517$; $p < 0.001$; interaction housing \times stimulus presentation: NS, respectively], while no change in locomotor activity in response to 50-kHz USV was detected (main effect stimulus presentation: NS; interaction housing \times stimulus presentation: NS). Importantly, post-adolescent LONG ISO rats did not display a level of behavioral inhibition in response to 50-kHz USV that is similar to the one seen in rats exposed to 22-kHz USV or NOISE [main effect stimulus type: $F_{(1, 35)} = 4.663$; $p = 0.016$; $p = 0.029$ and $p = 0.007$, respectively]. Such a behavioral inhibition was shown by LONG ISO rats in Experiment 1 after post-weaning isolation.

Again, as in Experiments 1 and 2, behavioral inhibition in response to 22-kHz USV and NOISE was typically reflected by a reduction in both, proximal and distal arm entries (not shown in detail; Supplementary Figures 3B',C'). In contrast, locomotor activity in response to 50-kHz USV was clearly directed toward the sound source, as reflected by an increase in the number

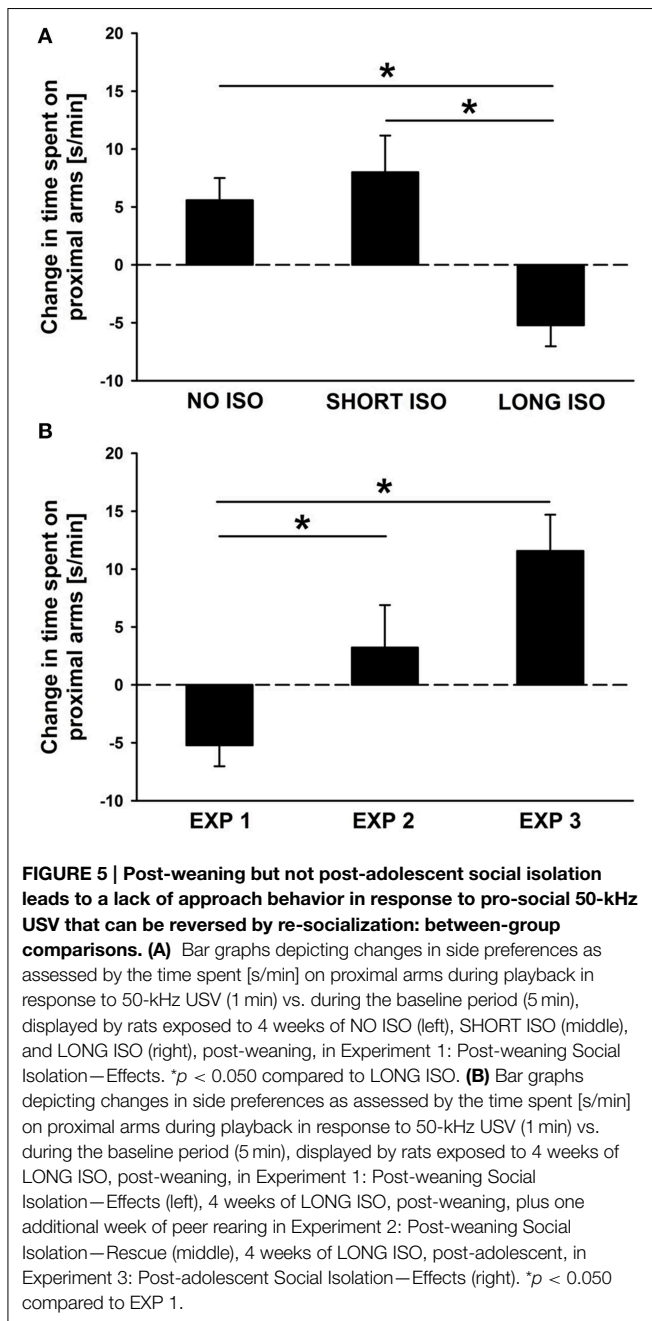
of proximal arm entries, in post-adolescent rats of all three experimental housing conditions, namely NO ISO [$t_{(11)} = 2.871$; $p = 0.015$], SHORT ISO [$t_{(11)} = 3.490$; $p = 0.005$], and LONG ISO [$t_{(11)} = 3.874$; $p = 0.003$], typically paralleled by a decrease in distal arm entries [$t_{(11)} = 3.442$; $p = 0.006$, $t_{(11)} = 3.149$; $p = 0.009$, and $t_{(11)} = 1.590$; $p = 0.140$, respectively; Supplementary Figure 3A'].

Furthermore, in post-adolescent NO ISO rats the proximal time increased [$t_{(11)} = 3.336$; $p = 0.007$], while the distal time decreased [$t_{(11)} = 6.416$; $p < 0.001$], resulting in a significant preference toward the stimulus source during 50-kHz USV playback [$t_{(11)} = 5.957$; $p < 0.001$; **Figure 4G**]. Likewise, post-adolescent SHORT ISO rats displayed a preference toward the stimulus source during 50-kHz USV playback [preference: $t_{(11)} = 5.566$; $p < 0.001$; proximal time: $t_{(11)} = 1.063$; $p = 0.313$; distal time: $t_{(11)} = 5.287$; $p < 0.001$; **Figure 4H**]. Most importantly, however, post-adolescent LONG ISO rats also displayed a preference toward 50-kHz USV playback [preference: $t_{(11)} = 4.726$; $p = 0.001$; proximal time: $t_{(11)} = 3.709$; $p = 0.003$; distal time: $t_{(11)} = 3.903$; $p = 0.002$; **Figure 4I**]. No significant preferences were seen before playback (all p -values > 0.050).

Together, Experiment 3 shows that post-adolescent isolation did not affect approach behavior elicited by 50-kHz USV. This indicates that the deficits in approach induced by post-weaning isolation is specific for the juvenile period, while no such effects are seen in post-adolescents, i.e., young adults after their rough-and-tumble play period (Panksepp, 1981).

Comparison across Experiments

In Experiment 1 (effects of post-weaning social isolation), NO ISO and SHORT ISO rats displayed approach behavior in response to playback of pro-social 50-kHz USV, as reflected in an increase in the time spent on proximal arms, whereas LONG ISO rats displayed social avoidance, as reflected in a decrease in proximal arm times, resulting in a significant difference between experimental housing conditions [main effect housing: $F_{(1, 35)} = 8.770$; $p = 0.001$; **Figure 5A**]. Specifically, LONG ISO rats differed from NO ISO and SHORT ISO rats ($p = 0.003$ and $p < 0.001$, respectively), with the latter ones not differing from each other ($p = 0.478$). Importantly, when comparing LONG ISO rats between the three experiments, LONG ISO rats exposed to post-weaning isolation displaying social avoidance differed from the LONG ISO rats of the other two experiments [main effect housing: $F_{(1, 35)} = 7.997$; $p = 0.001$; **Figure 5B**], namely LONG ISO rats exposed to post-weaning isolation after one additional week of group housing ($p = 0.028$; one-tailed) and LONG ISO rats exposed to post-adolescent social isolation ($p < 0.001$; one-tailed), both displaying approach behavior. However, approach tended to be stronger in LONG ISO rats exposed to post-adolescent isolation than in LONG ISO rats exposed to post-weaning isolation after one additional week of group housing ($p = 0.055$). This indicates that the rescue by social peer intervention was only partial. Of note, the trend for stronger approach behavior in LONG ISO rats exposed to post-adolescent isolation is unlikely to be explained by age-differences, as approach behavior diminishes with age (Wöhr and Schwarting, 2007).



Discussion

Post-weaning social isolation had a strong impact on approach behavior elicited by pro-social 50-kHz USV, as shown in Experiment 1. Approach was seen in group-housed and short-term isolated rats, which is consistent with previous studies (Wöhr and Schwarting, 2007, 2009, 2012; Willuhn et al., 2014). Rats exposed to long-term isolation, however, responded to 50-kHz USV by behavioral inhibition, similar to that seen in rats exposed to alarm 22-kHz USV or NOISE, resulting in a complete lack of approach behavior. General locomotor activity during the baseline period was increased in long-term isolated rats, in line

with other studies reporting hyperactivity in response to a novel environment after post-weaning isolation (Hall, 1998; Lapiz et al., 2003; Fone and Porkess, 2008; Gaskin et al., 2014). Therefore, deficits in approach behavior cannot be due to a general lack of locomotor activity. Most notably, as shown in Experiments 2 and 3, respectively, such impairments could be rescued by exposure to one additional week of peer rearing and were not seen after post-adolescent social isolation.

Importantly, post-weaning isolation specifically affected the behavioral response to 50-kHz USV and did not change the responses to 22-kHz USV or NOISE. Playback of 22-kHz USV consistently led to behavioral inhibition in all three experiments, irrespective of experimental housing condition, i.e., in nine independent groups of rats. This is in line with previous studies, supporting the notion that they serve an alarm function (Burman et al., 2007; Endres et al., 2007; Wöhr and Schwarting, 2007, 2010). However, what appears surprising is that NOISE also led to behavioral inhibition, challenging the view that 22-kHz USV specifically induce behavioral inhibition as background noise was also present during 22-kHz USV playback. Future studies specifically focusing on behavioral inhibition induced by 22-kHz USV, thus appear requisite. In particular, a detailed analysis of freezing behavior might allow a more sensitive assessment of minor differences in the level of behavioral inhibition induced by 22-kHz USV and NOISE, as compared to the measure applied here, namely total number of arm entries. In the present context, however, it needs to be emphasized that 50-kHz USV playback consistently led to approach behavior, despite the presence of background noise, with only one exception, namely rats exposed to post-weaning long-term isolation. In future studies, it would be interesting to assess whether deficits in approach behavior following post-weaning social isolation are also seen in response to related acoustic stimuli, such as artificially/computer-generated 50-kHz sine wave tones.

Our present finding that post-weaning long-term isolation results in a complete lack of approach behavior in the receiver when exposed to 50-kHz USV, is in line with a number of studies reporting isolation-induced social deficits in rats, like reduced social activity, including approach, anogenital sniffing, and reciprocal interaction (Meaney and Stewart, 1979; Hol et al., 1999; van den Berg et al., 1999a,b,c; Kokare et al., 2010; Möller et al., 2011, 2013; but see Ferdman et al., 2007; Han et al., 2011), as well as heightened aggression (Wongwitdecha and Marsden, 1996; Vale and Montgomery, 1997; Meng et al., 2010; Wall et al., 2012; Grotewold et al., 2014), which is possibly due to impaired communication (Tóth et al., 2008). In fact, besides social behavior, post-weaning long-term isolation was also shown to affect communication. Specifically, male rats were found to emit fewer 50-kHz USV when exposed to a sexually receptive female, probably reflecting their inability to recognize social cues and/or to respond appropriately (Inagaki et al., 2013). Furthermore, it was reported that isolation-rearing leads to a dissociation of 22-kHz USV production from the sender's behavioral pattern, possibly resulting in a loss of its aggression-reducing communicative function (von Frijtag et al., 2002). In contrast, the receiver's response to 22-kHz USV was not affected by social isolation in our experiments, suggesting that they

were either innately recognized as alarm calls or had gained alarm signal value through autoconditioning prior to isolation (Parsana et al., 2012), which is potentially facilitated by biological preparedness (Wöhr and Schwarting, 2010).

Most importantly, however, our findings demonstrate for the first time that post-weaning isolation not only induces behavioral changes displayed by the sender, but also by the receiver in response to 50-kHz USV. This is in line with a study on scent marking behavior where post-weaning long-term isolation increased the time spent investigating conspecific odors, but reduced the amount of urine counter-marking, together with an alteration in odor preferences (Brown, 1991). Lack of approach behavior during 50-kHz USV playback following long-term isolation could be interpreted in terms of increased anxiety and/or reduced social motivation, possibly resembling a depression-like behavioral phenotype (Wright et al., 1991; van den Berg et al., 1999b; Lukkes et al., 2009; Kokare et al., 2010; Meng et al., 2010). The idea that social isolation affects the level of social motivation in the receiver is supported by our bidirectional modulation of approach behavior in response to 50-kHz USV through short- and long-term isolation. While group-housed rats showed a clear preference toward 50-kHz USV, this response was enhanced after short-term isolation, whereas it was absent in long-term isolated rats. In fact, there is evidence that increased social motivation in the sender is reflected by higher rates of 50-kHz USV emission, e.g., during social play or tickling (Knutson et al., 1998; Panksepp and Burgdorf, 2000; Burgdorf and Panksepp, 2001).

A further explanation for the lack of approach behavior following post-weaning long-term isolation, is a deficit in socio-affective information processing, induced by withholding social play. Importantly, play behavior reaches its peak during the middle of the juvenile stage (Panksepp, 1981; Thor and Holloway, 1984), exactly during the period of isolation. Play fighting differs from serious fighting in regards to the target of attack (Takahashi and Lore, 1983; Pellis and Pellis, 1987), and consists of various behavioral components which appear to be programmed during development, promoting reciprocity, i.e., comparable outcome of successful play encounters within a pair, by reducing the behavioral control over the partner (Pellis, 2002; Pellis et al., 2005). It is assumed that social play facilitates neural and behavioral development by equipping an individual adequately for the needs in adulthood (Vanderschuren et al., 1997). In support of the critical period hypothesis (Scott, 1962; Hol et al., 1999; van den Berg et al., 1999a), a full manifestation of isolation-induced behavioral alterations is only observed when the intervention takes place during this sensitive developmental period (Fone and Porkess, 2008). During play, juveniles frequently experience a loss of control by exposing themselves to unpredictable events. Training for the unexpected allows rats to develop flexible responses to cope with rapidly changing environments (Spinka et al., 2001; Pellis et al., 2010). Most notably, physical interactions during adolescence are important to acquire social competency. This includes social, emotional, and cognitive skills; such as the ability to express and understand communicative signals from conspecifics (Wöhr and Schwarting, 2013).

While deficits in approach behavior were induced by post-weaning isolation, no such effects were seen in young adults reared in post-adolescent isolation, i.e., after going through the rough-and-tumble play period. This is also in line with other studies that could not find behavioral deficits in rats that were at least partially reared in groups during this critical period, before being isolated (Wright et al., 1991; Hol et al., 1999). There is some evidence that additional playful experience during the course of isolation may, to some extent, prevent impaired development of social competencies (Potegal and Eimon, 1989; Eimon and Potegal, 1991; but see van den Berg et al., 2000), further suggesting that there is a critical involvement of play behavior on socio-affective information processing in rats.

In support of this notion, it was shown in a well-established autism model that social deficits can be improved by peer intervention (Yang et al., 2011). In our study, deficits in approach induced by post-weaning isolation were partially rescued by 1 week of group housing. Yet, other studies investigating behavioral changes following re-socialization are inconsistent. For instance, it was shown that increased anxiety, abnormal aggression, and defense behavior, as well as reduced social interaction were not alleviated by re-socialization (Potegal and Eimon, 1989; Eimon and Potegal, 1991; Wright et al., 1991; van den Berg et al., 1999a; Lukkes et al., 2009; Tulogdi et al., 2014). In line with our results, however, beneficial effects of re-socialization could be demonstrated, like attenuation of anxiety-like behavior, depression-like behavior, and isolation-induced aggression (Vale and Montgomery, 1997; Kokare et al., 2010; Meng et al., 2010), as well as recovery of sleep-related huddling (Tulogdi et al., 2014) and social interaction (Kokare et al., 2010). There is also evidence for restored social cooperation by re-socialization after isolation during adulthood (Willner et al., 1989). Data from human adoption studies further support a re-socialization effect insofar as placement of children in a beneficial family environment was shown to reverse deficits in cognitive development, as compared to children remaining in institutional care (Nelson et al., 2007; Bos et al., 2011).

Apparently, efficacy of rat re-socialization depends both on isolation duration (Hol et al., 1999) and re-socialization duration, with at least 3 days of social housing being required to attenuate certain behavioral deficits (Kokare et al., 2010). Regarding our results, 1 week of group housing might still not be sufficient to completely rescue the adverse effects caused by 4 weeks of post-weaning isolation in this paradigm. Also, it appears possible that social experiences made by the peers before peer intervention play an important role (Hol et al., 1999; Tulogdi et al., 2014). In the future it would therefore be interesting to assess the effects of longer peer intervention periods and previous social experiences made by the peers.

Importantly, behavioral alterations following post-weaning isolation, such as deficits in the social behavior repertoire, mimic negative symptoms typically observed in schizophrenia (Hall, 1998; Lapid et al., 2003; Fone and Porkess, 2008). Our present finding that post-weaning long-term isolation results in a complete lack of approach behavior in the receiver when exposed to 50-kHz USV is in line with that view. In fact, in schizophrenia patients, several domains of

social behavior are impaired (Penn et al., 2008), including theory of mind (Brüne, 2005; Biedermann et al., 2012), emotional perception (Schneider et al., 2006; Irani et al., 2012), and verbal and non-verbal communication (Couture et al., 2006; Lavelle et al., 2013). According to the DSM-5 (American Psychiatric Association, 2013), patients display severe disorganized and/or reduced speech output (alogia) that substantially impairs effective communication, as well as diminished emotional expression and a lack of interest in social interactions (asociality).

Consistently, pharmacological treatments, including antipsychotics, were shown to rescue isolation-induced deficits in rats. Sub-chronic, but not acute administration of the antipsychotic drug clozapine or N-acetyl cysteine, a modulator of glutamatergic transmission, restores social interaction and deficits in other domains linked to schizophrenia, such as sensorimotor gating and memory (Möller et al., 2011, 2013). Also, acute treatment with the selective MC4 receptor antagonist HS014 reverses social deficits, as well as anxiety- and depression-like symptoms (Kokare et al., 2010). In contrast, benzodiazepines attenuate increased aggression but the effects on social interaction are inconsistent, thus challenging the notion that isolation-induced abnormal social behavior is anxiety-related (Wongwitdecha and Marsden, 1996; Vale and Montgomery, 1997). Furthermore, chronic application of the antidepressants imipramine or fluoxetine, after isolation during adulthood, was demonstrated to re-establish cooperative behavior (Willner et al., 1989). Importantly, chronic morphine treatment counteracts reduced social activity, accompanied by a reversal of upregulated μ -opioid-receptor binding sites (van den Berg et al., 1999c, 2000). Since it was shown that social play induces the release of opioids in specific brain regions (Vanderschuren et al., 1997), alterations in social behavior due to deprivation of play might be the result of reduced opioid release during this critical developmental period. Morphine treatment appears to substitute for the lack of play-induced opioid peptide release. Consistently, knocking-out μ -opioid-receptors in mice (Wöhr et al., 2011) or administering a μ -opioid-receptor-antagonist in rats (Wöhr and Schwarting, 2009) negatively affects approach behavior during USV playback, suggesting that endogenous opioids are not only involved in social behavior but also in socio-affective information processing (Oddi et al., 2013).

Besides the systems targeted in these pharmacological studies, behavioral alterations observed following post-weaning isolation are further accompanied by various neuromorphological changes and neurochemical imbalances, including neurotransmitter systems implicated in schizophrenia, such as dopamine and serotonin (Hall, 1998; Lapid et al., 2003; Fone and Porkess,

2008). Consistently, by means of the post-weaning isolation paradigm applied here, we recently induced alterations in regulators of neuronal development and synaptic plasticity, such as ubiquitin ligase and microRNAs (Valluy et al., 2015). In future studies, it would therefore be interesting to assess changes in neurotransmission and synaptic plasticity that specifically occur in response to post-weaning, but not post-adolescent isolation, and to test which of them can be reversed by peer intervention. This approach would likely lead to the identification of promising targets for novel pharmacological treatment approaches, the efficacy of which could be tested in rodent models for negative symptoms of schizophrenia.

Conclusion

We showed that post-weaning social isolation specifically affected the behavioral response to playback of pro-social 50-kHz but not alarm 22-kHz USV. While group-housed rats showed the expected preference toward 50-kHz USV, the response was even stronger in short-term isolated rats, possibly due to a higher level of social motivation. In contrast, no approach behavior to 50-kHz USV was observed in long-term isolated rats. Importantly, deficits in approach behavior were reversed by peer-mediated re-socialization and could not be observed after post-adolescent social isolation, indicating a critical period for social development during adolescence. Together, these results highlight the importance of social experience for affiliative behavior, suggesting a critical involvement of play behavior on socio-affective information processing in rats.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to RS (SCHW 559/10-1 and SCHW 559/14-1) and MW (WO 1732/4-1). The authors wish to thank Karl-Alexander Engelhardt, Katharina Günther, Kerstin Haas, Clara Krzikalla, Andrea Lörwald, Christoph Renninger, Verena Schuster, and Laura Wendt for their help in this project. The authors further wish to thank Karl-Alexander Engelhardt for his help with **Figure 1**, Theresa Kisko for reading the manuscript, and the reviewers for their helpful comments.

Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2015.00102/abstract>

References

- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edn.* Arlington, VA: American Psychiatric Publishing. doi: 10.1176/appi.books.9780890425596
- Baenninger, L. P. (1966). The reliability of dominance orders in rats. *Anim. Behav.* 14, 367–371. doi: 10.1016/S0003-3472(66)80099-4
- Ben-Ami Bartal, I., Decety, J., and Mason, P. (2011). Empathy and pro-social behavior in rats. *Science* 334, 1427–1430. doi: 10.1126/science.1210789
- Biedermann, F., Frajo-Apor, B., and Hofer, A. (2012). Theory of mind and its relevance in schizophrenia. *Curr. Opin. Psychiatr.* 25, 71–75. doi: 10.1097/YCO.0b013e3283503624

- Borg, E. (1982). Auditory thresholds in rats of different age and strain. A behavioral and electrophysiological study. *Hear. Res.* 8, 101–115. doi: 10.1016/0378-5955(82)90069-7
- Bos, K., Zeanah, C. H., Fox, N. A., Drury, S. S., McLaughlin, K. A., and Nelson, C. A. III. (2011). Psychiatric outcomes in young children with a history of institutionalization. *Harv. Rev. Psychiatry* 19, 15–24. doi: 10.3109/10673229.2011.549773
- Braun, K., and Bock, J. (2011). The experience-dependent maturation of prefronto-limbic circuits and the origin of developmental psychopathology: implications for the pathogenesis and therapy of behavioural disorders. *Dev. Med. Child Neurol.* 53, 14–18. doi: 10.1111/j.1469-8749.2011.04056.x
- Brown, J., Cohen, P., Johnson, J. G., and Smailes, E. M. (1999). Childhood abuse and neglect: specificity of effects on adolescent and young adult depression and suicidality. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 38, 1490–1496. doi: 10.1097/00004583-199912000-00009
- Brown, R. E. (1991). Effects of rearing condition, gender, and sexual experience on odor preferences and urine marking in Long-Evans rats. *Anim. Learn. Behav.* 19, 18–28. doi: 10.3758/BF03197856
- Brudzynski, S. M. (2013). Ethotransmission: communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 310–317. doi: 10.1016/j.conb.2013.01.014
- Brüne, M. (2005). “Theory of mind” in schizophrenia: a review of the literature. *Schizophr. Bull.* 31, 21–42. doi: 10.1093/schbul/sbi002
- Burgdorf, J., and Panksepp, J. (2001). Tickling induces reward in adolescent rats. *Physiol. Behav.* 72, 167–173. doi: 10.1016/S0031-9384(00)00411-X
- Burman, O. H. P., Ilyat, A., Jones, G., and Mendl, M. (2007). Ultrasonic vocalizations as indicators of welfare for laboratory rats (*Rattus norvegicus*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 104, 116–129. doi: 10.1016/j.applanim.2006.04.028
- Cicchetti, D., and Toth, S. L. (1995). A developmental psychopathology perspective on child abuse and neglect. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 34, 541–565. doi: 10.1097/00004583-199505000-00008
- Couture, S. M., Penn, D. L., and Roberts, D. L. (2006). The functional significance of social cognition in schizophrenia: a review. *Schizophr. Bull.* 32(Suppl. 1), S44–63. doi: 10.1093/schbul/sbl029
- DeRosse, P., Nitzburg, G. C., Kompancaril, B., and Malhotra, A. K. (2014). The relation between childhood maltreatment and psychosis in patients with schizophrenia and non-psychiatric controls. *Schizophr. Res.* 155, 66–71. doi: 10.1016/j.schres.2014.03.009
- Dodge, K. A., Bates, J. E., and Pettit, G. S. (1990). Mechanisms in the cycle of violence. *Science* 250, 1678–1683. doi: 10.1126/science.2270481
- Einon, D., and Potegal, M. (1991). Enhanced defense in adult rats deprived of playfighting experience as juveniles. *Aggress. Behav.* 17, 27–40.
- Endres, T., Widmann, K., and Fendt, M. (2007). Are rats predisposed to learn 22 kHz calls as danger-predicting signals? *Behav. Brain Res.* 185, 69–75. doi: 10.1016/j.bbr.2007.07.012
- Ferdman, N., Murmu, R. P., Bock, J., Braun, K., and Leshem, M. (2007). Weaning age, social isolation, and gender, interact to determine adult explorative and social behavior, and dendritic and spine morphology in prefrontal cortex of rats. *Behav. Brain Res.* 180, 174–182. doi: 10.1016/j.bbr.2007.03.011
- Fone, K. C. F., and Porkess, M. V. (2008). Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents—relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 1087–1102. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.03.003
- Frank, D. A., Klass, P. E., Earls, F., and Eisenberg, L. (1996). Infants and young children in orphanages: one view from pediatrics and child psychiatry. *Pediatrics* 97, 569–578.
- Gaskin, P. L. R., Alexander, S. P. H., and Fone, K. C. F. (2014). Neonatal phencyclidine administration and post-weaning social isolation as a dual-hit model of ‘schizophrenia-like’ behaviour in the rat. *Psychopharmacology* 231, 2533–2545. doi: 10.1007/s00213-013-3424-y
- Gilbert, R., Widom, C. S., Browne, K., Fergusson, D., Webb, E., and Janson, S. (2009). Burden and consequences of child maltreatment in high-income countries. *Lancet* 373, 68–81. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61706-7
- Grotewold, S. K., Wall, V. L., Goodell, D. J., Hayter, C., and Bland, S. T. (2014). Effects of cocaine combined with a social cue on conditioned place preference and nucleus accumbens monoamines after isolation rearing in rats. *Psychopharmacology* 231, 3041–3053. doi: 10.1007/s00213-014-3470-0
- Hall, F. S. (1998). Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. *Crit. Rev. Neurobiol.* 12, 129–162. doi: 10.1615/CritRevNeurobiol.v12.i1-2.50
- Han, X., Wang, W., Shao, F., and Li, N. (2011). Isolation rearing alters social behaviors and monoamine neurotransmission in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of adult rats. *Brain Res.* 1385, 175–181. doi: 10.1016/j.brainres.2011.02.035
- Hernandez-Lallement, J., van Wingerden, M., Marx, C., Srejic, M., and Kalenscher, T. (2015). Rats prefer mutual rewards in a prosocial choice task. *Front. Neurosci.* 8:443. doi: 10.3389/fnins.2014.00443
- Himmeler, B. T., Kisko, T. M., Euston, D. R., Kolb, B., and Pellis, S. M. (2014). Are 50-kHz calls used as play signals in the playful interactions of rats? I. Evidence from the timing and context of their use. *Behav. Process.* 106, 60–66. doi: 10.1016/j.beproc.2014.04.014
- Hol, T., van den Berg, C. L., van Ree, J. M., and Spruijt, B. M. (1999). Isolation during the play period in infancy decreases adult social interactions in rats. *Behav. Brain Res.* 100, 91–97. doi: 10.1016/S0166-4328(98)00116-8
- Inagaki, H., Kuwahara, M., Tsubone, H., and Mori, Y. (2013). The effect of post-weaning individual housing on 50-kHz calls emitted from male rats to sexually receptive female rats. *Physiol. Behav.* 110–111, 30–33. doi: 10.1016/j.physbeh.2012.11.009
- Irani, F., Seligman, S., Kamath, V., Kohler, C., and Gur, R. C. (2012). A meta-analysis of emotion perception and functional outcomes in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 137, 203–211. doi: 10.1016/j.schres.2012.01.023
- Kisko, T. M., Himmeler, B. T., Himmeler, S. M., Euston, D. R., and Pellis, S. M. (2015). Are 50-kHz calls used as play signals in the playful interactions of rats? II. Evidence from the effects of devocalization. *Behav. Process.* 111, 25–33. doi: 10.1016/j.beproc.2014.11.011
- Knutson, B., Burgdorf, J., and Panksepp, J. (1998). Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. *J. Comp. Psychol.* 112, 65–73. doi: 10.1037/0735-7036.112.1.65
- Kokare, D. M., Dandekar, M. P., Singru, P. S., Gupta, G. L., and Subhedar, N. K. (2010). Involvement of α -MSH in the social isolation induced anxiety- and depression-like behaviors in rat. *Neuropharmacology* 58, 1009–1018. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.01.006
- Lansford, J. E., Dodge, K. A., Pettit, G. S., Bates, J. E., Crozier, J., and Kaplow, J. (2002). A 12-year prospective study of the long-term effects of early child physical maltreatment on psychological, behavioral, and academic problems in adolescence. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 156, 824–830. doi: 10.1001/archpedi.156.8.824
- Lapiz, M. D. S., Fulford, A., Muchimapura, S., Mason, R., Parker, T., and Marsden, C. A. (2003). Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission. *Neurosci. Behav. Physiol.* 33, 13–29. doi: 10.1023/A:1021171129766
- Lavelle, M., Healey, P. G. T., and McCabe, R. (2013). Is nonverbal communication disrupted in interactions involving patients with schizophrenia? *Schizophr. Bull.* 39, 1150–1158. doi: 10.1093/schbul/sbs091
- Lopuch, S., and Popik, P. (2011). Cooperative behavior of laboratory rats (*Rattus norvegicus*) in an instrumental task. *J. Comp. Psychol.* 125, 250–253. doi: 10.1037/a0021532
- Lukkes, J. L., Mokin, M. V., Scholl, J. L., and Forster, G. L. (2009). Adult rats exposed to early-life social isolation exhibit increased anxiety and conditioned fear behavior, and altered hormonal stress responses. *Horm. Behav.* 55, 248–256. doi: 10.1016/j.yhbeh.2008.10.014
- Meaney, M. J., and Stewart, J. (1979). Environmental factors influencing the affiliative behavior of male and female rats (*Rattus norvegicus*). *Anim. Learn. Behav.* 7, 397–405. doi: 10.3758/BF03209692
- Meng, Q., Li, N., Han, X., Shao, F., and Wang, W. (2010). Peri-adolescence isolation rearing alters social behavior and nociception in rats. *Neurosci. Lett.* 480, 25–29. doi: 10.1016/j.neulet.2010.05.067
- Möller, M., Du Preez, J. L., Emsley, R., and Harvey, B. H. (2011). Isolation rearing-induced deficits in sensorimotor gating and social interaction in rats are related to cortico-striatal oxidative stress, and reversed by sub-chronic clozapine administration. *Eur. Neuropsychopharm.* 21, 471–483. doi: 10.1016/j.euroneuro.2010.09.006

- Möller, M., Du Preez, J. L., Viljoen, F. P., Berk, M., Emsley, R., and Harvey, B. H. (2013). Social isolation rearing induces mitochondrial, immunological, neurochemical and behavioural deficits in rats, and is reversed by clozapine or N-acetyl cysteine. *Brain Behav. Immun.* 30, 156–167. doi: 10.1016/j.bbi.2012.12.011
- Nelson, C. A. III, Zeanah, C. H., Fox, N. A., Marshall, P. J., Smyke, A. T., and Guthrie, D. (2007). Cognitive recovery in socially deprived young children: the Bucharest Early Intervention Project. *Science* 318, 1937–1940. doi: 10.1126/science.1143921
- Oddi, D., Crusio, W. E., D'Amato, F. R., and Pietropaolo, S. (2013). Monogenic mouse models of social dysfunction: implications for autism. *Behav. Brain Res.* 251, 75–84. doi: 10.1016/j.bbr.2013.01.002
- Panksepp, J. (1981). The ontogeny of play in rats. *Dev. Psychobiol.* 14, 327–332. doi: 10.1002/dev.420140405
- Panksepp, J., and Burgdorf, J. (2000). 50-kHz chirping (laughter?) in response to conditioned and unconditioned tickle-induced reward in rats: effects of social housing and genetic variables. *Behav. Brain Res.* 115, 25–38. doi: 10.1016/S0166-4328(00)00238-2
- Parsana, A. J., Moran, E. E., and Brown, T. H. (2012). Rats learn to freeze to 22-kHz ultrasonic vocalizations through autoconditioning. *Behav. Brain Res.* 232, 395–399. doi: 10.1016/j.bbr.2012.03.031
- Pellis, S. M. (2002). “Keeping in touch: Play fighting and social knowledge,” in *The Cognitive Animal. Empirical and Theoretical Perspectives on Animal Cognition*, eds M. Bekoff, C. Allen, and G. M. Burghardt (Cambridge, MA: MIT Press), 421–427.
- Pellis, S. M., and Pellis, V. C. (1987). Play-fighting differs from serious fighting in both target of attack and tactics of fighting in the laboratory rat *Rattus norvegicus*. *Aggress. Behav.* 13, 227–242.
- Pellis, S. M., Pellis, V. C., and Bell, H. C. (2010). The function of play in the development of the social brain. *Am. J. Play* 2, 278–296.
- Pellis, S. M., Pellis, V. C., and Foroud, A. (2005). “Play fighting: Aggression, affiliation, and the development of nuanced social skills,” in *Developmental Origins of Aggression*, eds R. E. Tremblay, W. W. Hartup, and J. Archer (New York, NY: Guilford Press), 47–62.
- Penn, D. L., Sanna, L. J., and Roberts, D. L. (2008). Social cognition in schizophrenia: an overview. *Schizophr. Bull.* 34, 408–411. doi: 10.1093/schbul/sbn014
- Portfors, C. V. (2007). Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 46, 28–34.
- Potegal, M., and Einon, D. (1989). Aggressive behaviors in adult rats deprived of playfighting experience as juveniles. *Dev. Psychobiol.* 22, 159–172. doi: 10.1002/dev.420220206
- Read, J., Os, J., Morrison, A. P., and Ross, C. A. (2005). Childhood trauma, psychosis and schizophrenia: a literature review with theoretical and clinical implications. *Acta Psychiatr. Scand.* 112, 330–350. doi: 10.1111/j.1600-0447.2005.00634.x
- Rutte, C., and Taborsky, M. (2007). Generalized reciprocity in rats. *PLoS Biol.* 5:e196. doi: 10.1371/journal.pbio.0050196
- Rutte, C., and Taborsky, M. (2008). The influence of social experience on cooperative behaviour of rats (*Rattus norvegicus*): direct vs generalised reciprocity. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 62, 499–505. doi: 10.1007/s00265-007-0474-3
- Sales, G. D. (1972). Ultrasound and aggressive behaviour in rats and other small mammals. *Anim. Behav.* 20, 88–100. doi: 10.1016/S0003-3472(72)80177-5
- Schneider, F., Gur, R. C., Koch, K., Backes, V., Amunts, K., Shah, N. J., et al. (2006). Impairment in the specificity of emotion processing in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 163, 442–447. doi: 10.1176/appi.ajp.163.3.442
- Scott, J. P. (1962). Critical periods in behavioral development. *Science* 138, 949–958. doi: 10.1126/science.138.3544.949
- Seffer, D., Schwarting, R. K. W., and Wöhr, M. (2014). Pro-social ultrasonic communication in rats: insights from playback studies. *J. Neurosci. Methods* 234, 73–81. doi: 10.1016/j.jneumeth.2014.01.023
- Shackman, J. E., and Pollak, S. D. (2014). Impact of physical maltreatment on the regulation of negative affect and aggression. *Dev. Psychopathol.* 26, 1021–1033. doi: 10.1017/S0954579414000546
- Silberberg, A., Allouch, C., Sandfort, S., Kearns, D., Karpel, H., and Slotnick, B. (2014). Desire for social contact, not empathy, may explain “rescue” behavior in rats. *Anim. Cogn.* 17, 609–618. doi: 10.1007/s10071-013-0692-1
- Spinhoven, P., Elzinga, B. M., Hovens, J. G. F. M., Roelofs, K., Zitman, F. G., van Oppen, P., et al. (2010). The specificity of childhood adversities and negative life events across the life span to anxiety and depressive disorders. *J. Affect. Disorders* 126, 103–112. doi: 10.1016/j.jad.2010.02.132
- Spinka, M., Newberry, R. C., and Bekoff, M. (2001). Mammalian play: training for the unexpected. *Q. Rev. Biol.* 76, 141–168. doi: 10.1086/393866
- Takahashi, L. K., and Lore, R. K. (1983). Play fighting and the development of agonistic behavior in male and female rats. *Aggress. Behav.* 9, 217–227.
- Thor, D. H., and Holloway, W. R. Jr. (1984). Developmental analyses of social play behavior in juvenile rats. *Bull. Psychon. Soc.* 22, 587–590. doi: 10.3758/BF03333916
- Tóth, M., Halász, J., Mikics, É., Barsy, B., and Haller, J. (2008). Early social deprivation induces disturbed social communication and violent aggression in adulthood. *Behav. Neurosci.* 122, 849–854. doi: 10.1037/0735-7044.122.4.849
- Tulogdi, Á., Tóth, M., Barsvári, B., Biró, L., Mikics, É., and Haller, J. (2014). Effects of resocialization on post-weaning social isolation-induced abnormal aggression and social deficits in rats. *Dev. Psychobiol.* 56, 49–57. doi: 10.1002/dev.21090
- Vale, A. L., and Montgomery, A. M. (1997). Social interaction: responses to chlordiazepoxide and the loss of isolation-reared effects with paired-housing. *Psychopharmacology* 133, 127–132. doi: 10.1007/s002130050382
- Valluy, J., Bicker, S., Aksoy-Aksel, A., Lackinger, M., Sumer, S., Fiore, R., et al. (2015). A coding-independent function of an alternative Ube3a transcript during neuronal development. *Nat. Neurosci.* doi: 10.1038/nn.3996. [Epub ahead of print].
- van den Berg, C. L., Hol, T., van Ree, J. M., Spruijt, B. M., Everts, H., and Koolhaas, J. M. (1999a). Play is indispensable for an adequate development of coping with social challenges in the rat. *Dev. Psychobiol.* 34, 129–138.
- van den Berg, C. L., Pijlman, F. T. A., Koning, H. A. M., Diergaarde, L., van Ree, J. M., et al. (1999b). Isolation changes the incentive value of sucrose and social behaviour in juvenile and adult rats. *Behav. Brain Res.* 106, 133–142.
- van den Berg, C. L., van Ree, J. M., and Spruijt, B. M. (2000). Morphine attenuates the effects of juvenile isolation in rats. *Neuropharmacology* 39, 969–976. doi: 10.1016/S0028-3908(99)00216-6
- van den Berg, C. L., van Ree, J. M., Spruijt, B. M., and Kitchen, I. (1999c). Effects of juvenile isolation and morphine treatment on social interactions and opioid receptors in adult rats: behavioural and autoradiographic studies. *Eur. J. Neurosci.* 11, 3023–3032.
- Vanderschuren, L. J. M. J., Niesink, R. J. M., and van Ree, J. M. (1997). The neurobiology of social play behavior in rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 309–326. doi: 10.1016/S0149-7634(96)00020-6
- Varese, F., Smeets, F., Drukker, M., Lieverse, R., Lataster, T., Viechtbauer, W., et al. (2012). Childhood adversities increase the risk of psychosis: a meta-analysis of patient-control, prospective- and cross-sectional cohort studies. *Schizophr. Bull.* 38, 661–671. doi: 10.1093/schbul/sbs050
- Veenema, A. H. (2009). Early life stress, the development of aggression and neuroendocrine and neurobiological correlates: what can we learn from animal models? *Front. Neuroendocrinol.* 30, 497–518. doi: 10.1016/j.yfrne.2009.03.003
- von Frijtag, J. C., Schot, M., van den Bos, R., and Spruijt, B. M. (2002). Individual housing during the play period results in changed responses to and consequences of a psychosocial stress situation in rats. *Dev. Psychobiol.* 41, 58–69. doi: 10.1002/dev.10057
- Wall, V. L., Fischer, E. K., and Bland, S. T. (2012). Isolation rearing attenuates social interaction-induced expression of immediate early gene protein products in the medial prefrontal cortex of male and female rats. *Physiol. Behav.* 107, 440–450. doi: 10.1016/j.physbeh.2012.09.002
- Whishaw, I. Q., and Kolb, B. (2005). *The Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests*. New York, NY: Oxford University Press.
- Willner, P., Sampson, D., Phillips, G., Fichera, R., Foxlow, P., and Muscat, R. (1989). Effects of isolated housing and chronic antidepressant treatment on cooperative social behaviour in rats. *Behav. Pharmacol.* 1, 85–90. doi: 10.1097/00008877-198900110-00010
- Willuhn, I., Tose, A., Wanat, M. J., Hart, A. S., Hollon, N. G., Phillips, P. E. M., et al. (2014). Phasic dopamine release in the nucleus accumbens in response to pro-social 50 kHz ultrasonic vocalizations in rats. *J. Neurosci.* 34, 10616–10623. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1060-14.2014
- Wöhr, M., Borta, A., and Schwarting, R. K. W. (2005). Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: a dose-response study

- in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 84, 228–240. doi: 10.1016/j.nlm.2005.07.004
- Wöhr, M., Houx, B., Schwarting, R. K. W., and Spruijt, B. (2008). Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. *Physiol. Behav.* 93, 766–776. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.11.031
- Wöhr, M., Moles, A., Schwarting, R. K. W., and D'Amato, F. R. (2011). Lack of social exploratory activation in male μ -opioid receptor KO mice in response to playback of female ultrasonic vocalizations. *Soc. Neurosci.* 6, 76–87. doi: 10.1080/17470911003765560
- Wöhr, M., and Schwarting, R. K. W. (2007). Ultrasonic communication in rats: can playback of 50-kHz calls induce approach behavior? *PLoS ONE* 2:e1365. doi: 10.1371/journal.pone.0001365
- Wöhr, M., and Schwarting, R. K. W. (2009). Ultrasonic communication in rats: effects of morphine and naloxone on vocal and behavioral responses to playback of 50-kHz vocalizations. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 94, 285–295. doi: 10.1016/j.pbb.2009.09.008
- Wöhr, M., and Schwarting, R. K. W. (2010). “Activation of limbic system structures by replay of ultrasonic vocalization in rats,” in *Handbook of Mammalian Vocalization. An Integrative Neuroscience Approach*, ed S. Brudzynski (Amsterdam: Elsevier - Academic Press), 113–124. doi: 10.1016/B978-0-12-374593-4.00012-7
- Wöhr, M., and Schwarting, R. K. W. (2012). Testing social acoustic memory in rats: effects of stimulus configuration and long-term memory on the induction of social approach behavior by appetitive 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Neurobiol. Learn. Mem.* 98, 154–164. doi: 10.1016/j.nlm.2012.05.004
- Wöhr, M., and Schwarting, R. K. W. (2013). Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. *Cell Tissue Res.* 354, 81–97. doi: 10.1007/s00441-013-1607-9
- Wongwitdecha, N., and Marsden, C. A. (1996). Social isolation increases aggressive behaviour and alters the effects of diazepam in the rat social interaction test. *Behav. Brain Res.* 75, 27–32. doi: 10.1016/0166-4328(96)00181-7
- Wright, I. K., Upton, N., and Marsden, C. A. (1991). Resocialisation of isolation-reared rats does not alter their anxiogenic profile on the elevated X-maze model of anxiety. *Physiol. Behav.* 50, 1129–1132. doi: 10.1016/0031-9384(91)90572-6
- Yang, M., Perry, K., Weber, M. D., Katz, A. M., and Crawley, J. N. (2011). Social peers rescue autism-relevant sociability deficits in adolescent mice. *Autism Res.* 4, 17–27. doi: 10.1002/aur.163

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Seffer, Rippberger, Schwarting and Wöhr. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary Material

**Pro-social 50-kHz ultrasonic communication in rats: Post-weaning
but not post-adolescent social isolation leads to social impairments
– phenotypic rescue by re-socialization**

Short title: Post-weaning isolation induces communication deficits

Original Research Article

Dominik Seffer, Henrike Rippberger, Rainer K.W. Schwarting & Markus Wöhr

Behavioral Neuroscience, Experimental and Biological Psychology,
Philipps-University of Marburg, Marburg, Germany

Correspondence should be addressed to:

Dominik Seffer, Dipl.Biol.
Behavioral Neuroscience
Faculty of Psychology
Philipps-University of Marburg
Gutenbergstr. 18, 35032 Marburg,
Germany

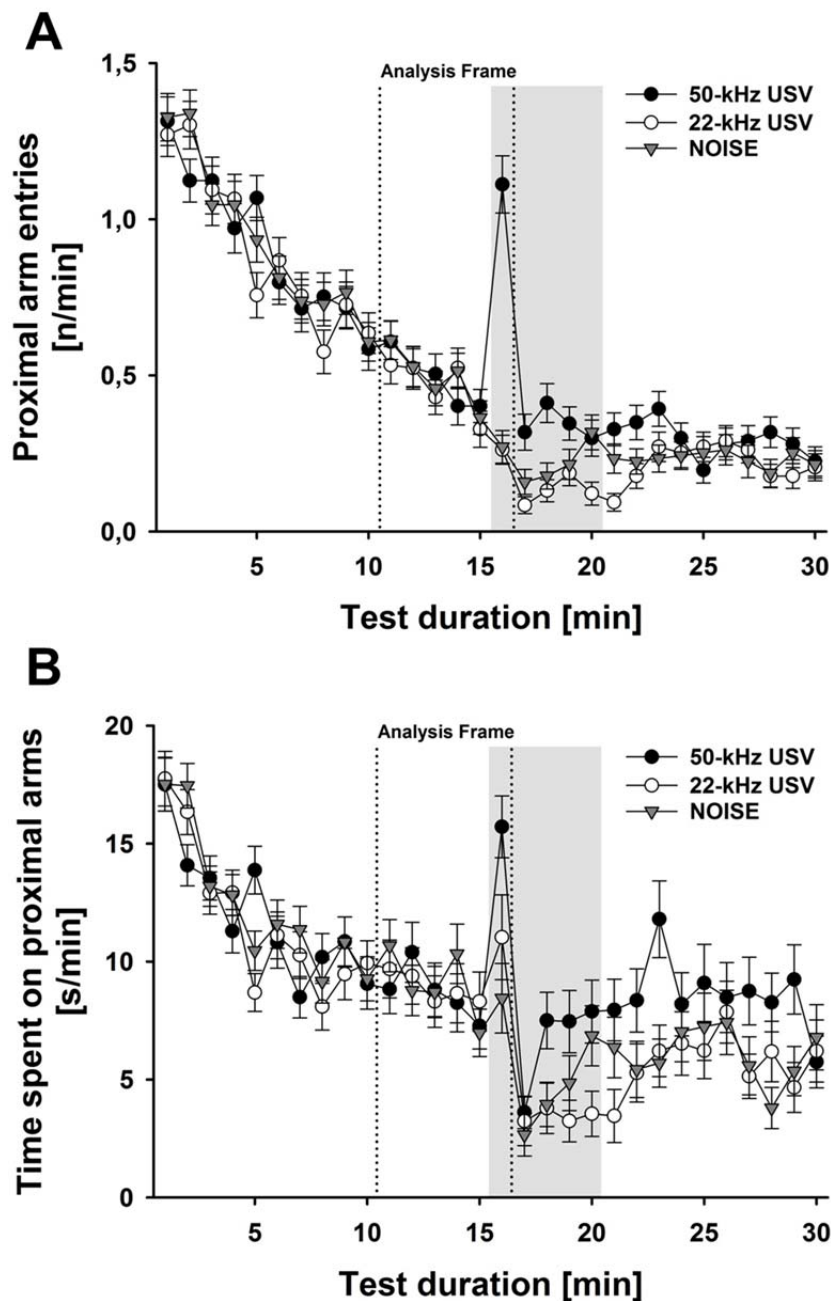
Tel: +496421 2823646
Fax: +496421 2823610
e-mail: seffer@staff.uni-marburg.de

Or to:

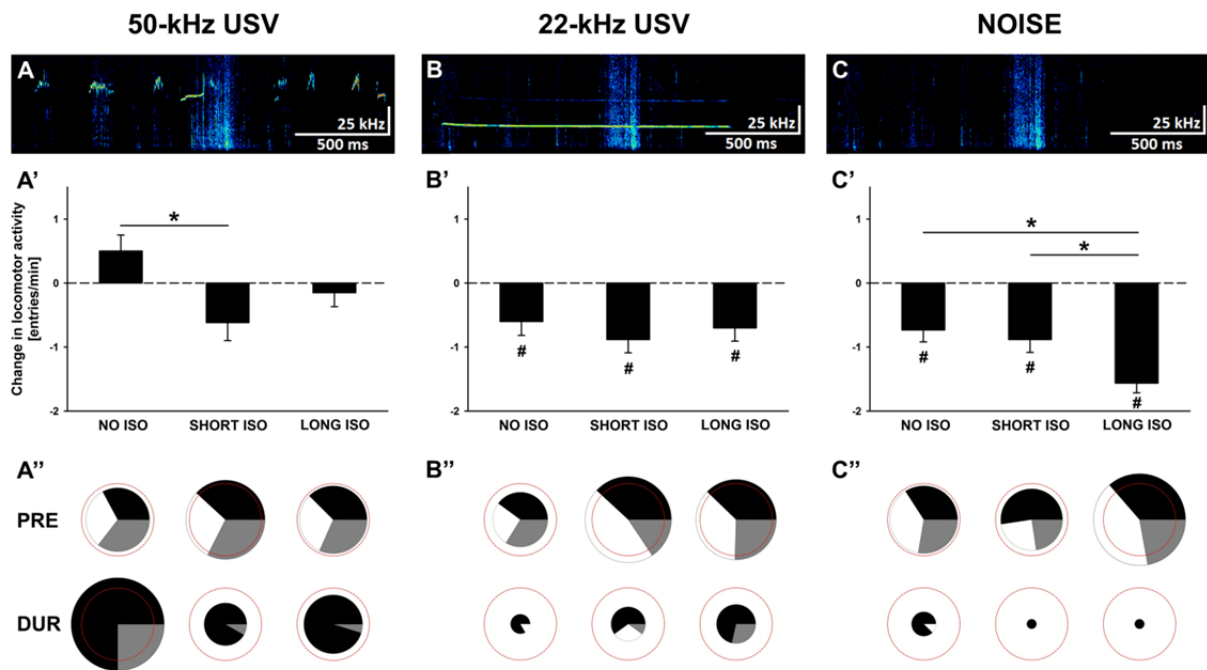
Markus Wöhr, PhD
Behavioral Neuroscience
Faculty of Psychology
Philipps-University of Marburg
Gutenbergstr. 18, 35032 Marburg,
Germany

Tel: +496421 2823612
Fax: +496421 2823610
e-mail: woehrm@staff.uni-marburg.de

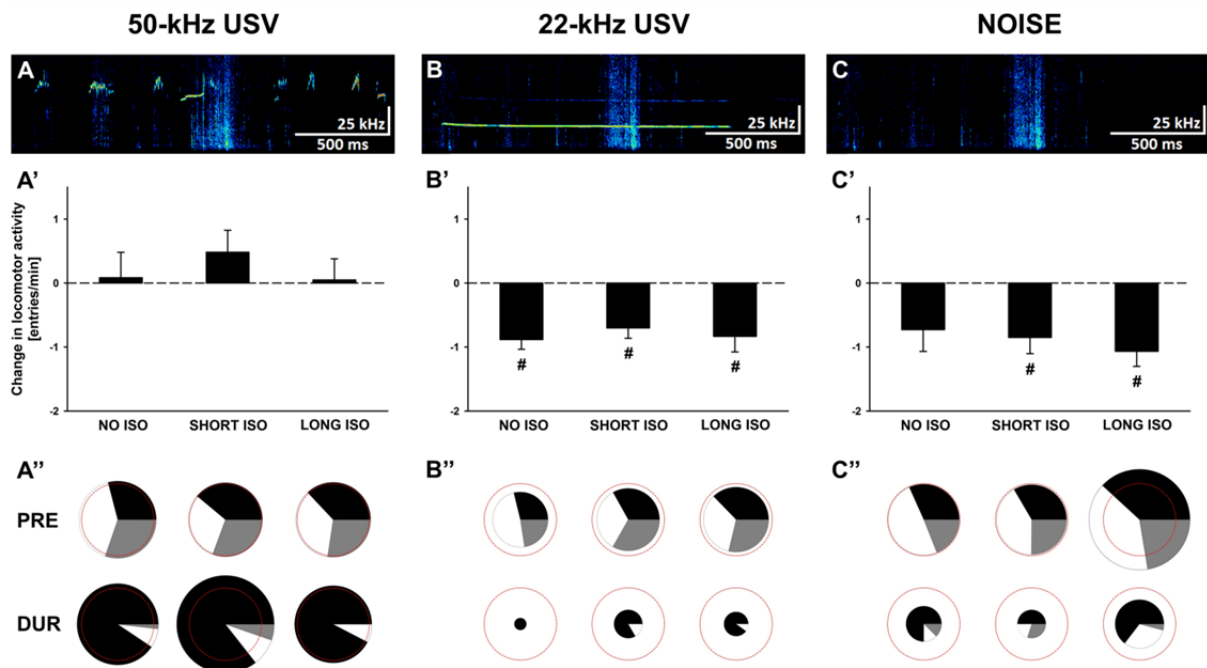
SUPPLEMENTARY FIGURES



Supplementary Figure 1: Social approach behavior is specifically induced by pro-social 50-kHz USV but not alarm 22-kHz USV and NOISE. (A) Line graphs depicting the time course of proximal arm entries [n/min] displayed by rats in response to 50-kHz USV (black circles), 22-kHz USV (white circles), and NOISE (grey triangles), irrespective of experimental housing condition in Experiment 1: Post-weaning Social Isolation - Effects. (B) Line graphs depicting the time course of the time spent on proximal arms [s/min] displayed by rats in response to 50-kHz USV (black circles), 22-kHz USV (white circles), and NOISE (grey triangles), irrespective of experimental housing condition in Experiment 1: Post-weaning Social Isolation - Effects. The playback phase is highlighted in grey. The dotted lines represent the analysis frame used in all three experiments: Experiment 1: Post-weaning Social Isolation – Effects; Experiment 2: Post-weaning Social Isolation – Rescue; and Experiment 3: Post-adolescent Social Isolation - Effects.



Supplementary Figure 2: Post-weaning social isolation induced behavioral inhibition in response to pro-social 50-kHz USV similar to alarm 22-kHz USV and NOISE can be reversed by re-socialization. (A), (B), and (C) Exemplary spectrograms of acoustic stimuli used for playback, namely (A) 50-kHz USV, (B) 22-kHz USV, and (C), background noise (NOISE). (A'), (B'), and (C') Bar graphs depicting changes in locomotor activity as assessed by means of total arm entries per min [entries/min] displayed by rats exposed to four weeks of NO ISO (left), SHORT ISO (middle), and LONG ISO (right), post-weaning, plus one additional week of peer rearing, in response to (A') 50-kHz USV, (B') 22-kHz USV, and (C') NOISE, in Experiment 2: Post-weaning Social Isolation - Rescue. (A''), (B''), and (C''), Pie charts depicting changes in stimulus-directed locomotor activity as assessed by means of numbers of proximal (black), neutral (grey), and distal (white) arm entries displayed as percentages by rats exposed to four weeks of NO ISO (left), SHORT ISO (middle), and LONG ISO (right), post-weaning, plus one additional week of peer rearing, during the baseline period (5 min; upper row; PRE) and during playback (1 min; lower row; DUR) in response to (A'') 50-kHz USV, (B'') 22-kHz USV, and (C'') NOISE, in Experiment 2: Post-weaning Social Isolation - Rescue. The red dashed circles represent 100 % of the total number of arm entries during the baseline period (average over all nine experimental groups). The sizes of the circles depicting proximal (black), neutral (grey), and distal (white) arm entries represent total number of arm entries as percentage of 100 %. * $p < 0.050$ compared to SHORT ISO; # $p < 0.050$ compared to baseline locomotor activity.



Supplementary Figure 3: Post-adolescent social isolation does not induce behavioral inhibition in response to pro-social 50-kHz USV but in response to alarm 22-kHz USV and NOISE. (A), (B), and (C) Exemplary spectrograms of acoustic stimuli used for playback, namely (A) 50-kHz USV, (B) 22-kHz USV, and (C) background noise (NOISE). (A'), (B'), and (C') Bar graphs depicting changes in locomotor activity as assessed by means of total arm entries per min [entries/min] displayed by rats exposed to four weeks of NO ISO (left), SHORT ISO (middle), and LONG ISO (right), post-adolescent, in response to (A') 50-kHz USV, (B') 22-kHz USV, and (C') NOISE, in Experiment 3: Post-adolescent Social Isolation - Effects. (A''), (B''), and (C'') Pie charts depicting changes in stimulus-directed locomotor activity as assessed by means of numbers of proximal (black), neutral (grey), and distal (white) arm entries displayed as percentages by rats exposed to four weeks of NO ISO (left), SHORT ISO (middle), and LONG ISO (right), post-adolescent, during the baseline period (5 min; upper row; PRE) and during playback (1 min; lower row; DUR) in response to (A'') 50-kHz USV, (B'') 22-kHz USV, and (C'') NOISE, in Experiment 3: Post-adolescent Social Isolation - Effects. The red dashed circles represent 100 % of the total number of arm entries during the baseline period (average over all nine experimental groups). The sizes of the circles depicting proximal (black), neutral (grey), and distal (white) arm entries represent total number of arm entries as percentage of 100 %. #p<0.050 compared to baseline locomotor activity.

DISKUSSION



Kommunikative Funktion von 50-kHz USV im sexuellen Kontext (Studie I)

Die Ergebnisse aus der vorgelegten Studie I (Willadsen et al., 2014) zeigen ein deutliches Annäherungsverhalten der Weibchen in Reaktion auf männliche prosoziale 50-kHz USV, aber nicht gegenüber zeit- und amplitudenangepasstem weißen Rauschen. Diese Befunde stehen im Einklang mit den Erkenntnissen aus zahlreichen Studien, die bereits eine Bedeutung männlicher 50-kHz USV im sexuellen Kontext belegen konnten (Barfield et al., 1979; Geyer et al., 1978; McIntosh et al., 1978; Thomas et al., 1981; 1982; White & Barfield, 1987, 1989; 1990; White et al., 1990; 1991; 1993). Sehr ähnliche Ergebnisse lieferte eine Studie von Barfield et al. (1979), die in einem Y-Labyrinth zeigen konnten, dass Weibchen eine Präferenz für männliche 50-kHz Rufe gegenüber Stille aufwiesen.

In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie konnte jedoch im Vergleich zu einem olfaktorischen Stimulus keine eindeutige Evidenz einer Präferenz für männliche 50-kHz USV gefunden werden, woraus die Autoren schlossen, dass diese keinerlei oder höchstens stark eingeschränkten Anreizwert für Weibchen besitzen (Snoeren & Ågmo, 2014). Diese stark gegensätzlichen Befunde könnten zum einen durch Unterschiede in der Zyklusphase der Weibchen oder in der experimentellen Umsetzung (Versuchsaufbau, USV-Aufnahmesystem, USV-Stimulusmaterial) begründet sein. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Studien ist jedoch die Darbietungshäufigkeit und -dauer des Stimulusmaterials. Während die Weibchen in der Studie von Willadsen et al. (2014) dem Playback von 50-kHz USV in lediglich einem Durchgang für nur eine Minute ausgesetzt waren, wurde bei Snoeren & Ågmo (2014) ein Design verwendet, bei dem die Weibchen dem Stimulus mehrmals und für bis zu zehn Minuten ausgesetzt wurden. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Weibchen über die Durchgänge hinweg gelernt haben könnten, dass kein Männchen anwesend ist bzw. keine Interaktionsmöglichkeit mit ihnen besteht. Auch bei Mäusen wurde dieser Effekt beobachtet. Während sie auf die erste Präsentation von männlichen Rufen mit Annäherungsverhalten reagierten, verschwand diese Präferenz bei wiederholter Darbietung (Hammerschmidt et al., 2009). In einer kürzlich veröffentlichten Playback-Studie bei Ratten konnte zudem gezeigt werden, dass selbst eine Woche Unterbrechung zwischen zwei Durchgängen kein Annäherungsverhalten auf die zweite Präsentation zu Folge hatte. Es wird vermutet, dass Gedächtnisprozesse bei diesem Mechanismus involviert sind. So konnte Annäherungsverhalten bei erneuter Rufdarbietung beobachtet werden, wenn die

Gedächtnisbildung nach der ersten Präsentation blockiert wurde (Wöhr & Schwarting, 2012). Darüber hinaus berichten Snoeren & Ågmo (2014) von inkonsistenten Ergebnissen bezüglich des Annäherungsverhaltens während der ersten Stimulusminute im Vergleich zur Gesamtdauer. Während bei einem Stimulustyp lediglich ein Effekt in der ersten Playback-Minute gefunden wurde, schien ein anderer Stimulus nur bei Betrachtung der gesamten Präsentationsdauer effektiv zu sein. Die Autoren schließen daraus, dass bestimmte Elemente einer Rufsequenz einen dauerhaften Anreizwert darstellen könnten. Tatsächlich konnte das Phänomen der kurzanhaltenden 50-kHz USV Playback-Effekte auch in anderen Studien beobachtet werden (Seffer et al., 2015 [Suppl. Fig. 1A,B]; Willuhn et al., 2014; Wöhr & Schwarting, 2012). Ein markantes Annäherungsverhalten konnte ebenfalls nur während der ersten Präsentationsminute gefunden werden, wohingegen es in den folgenden Minuten nur schwach oder gänzlich verschwunden war.

Insgesamt lässt sich aus den Ergebnissen von Willadsen et al. (2014) schließen, dass männliche 50-kHz USV eine wichtige Rolle zur Herstellung von sozialer Nähe spielen und vermutlich auch an der Regulation von Sexualverhalten beteiligt sind. Dabei war die Intensität des Annäherungsverhaltens der adulten Weibchen insofern besonders bemerkenswert, als adulte Männchen in vorherigen Studien eher vergleichsweise moderate Reaktionen zeigten.

Einfluss von Alter und Geschlecht auf die kommunikative Funktion prosozialer 50-kHz USV (Studie II)

In der vorgelegten Studie II (Seffer et al., 2014) wurde eine Übersichtsarbeit zu den bis zu diesem Zeitpunkt veröffentlichten Studien erstellt, in denen das Playback-Paradigma verwendet wurde (Willadsen et al., 2014; Wöhr & Schwarting, 2007; 2009; 2012). Dieser Übersicht ist zu entnehmen, dass Playback von 50-kHz USV konsistent Annäherungsverhalten beim Empfänger auslöst, wobei die Effekte jedoch von Alter und Geschlecht der Versuchstiere beeinflusst sind. Während bei juvenilen Männchen ein hohes Maß an Annäherungsverhalten zu beobachten ist, zeigen adulte Männchen eine vergleichsweise moderate Reaktion. Dies könnte in einer stärker ausgeprägten sozialen Motivation juveniler Männchen begründet sein. So wurde beispielsweise gezeigt, dass ältere Ratten, im Vergleich zu ihren jüngeren Artgenossen, weniger Zeit in sozialer Interaktion verbrachten (Salchner et al., 2004). Das soziale Interesse ist bei juvenilen Tieren stärker ausgeprägt, sie befinden sich zu dem Zeitpunkt in der Spielphase (Panksepp, 1981) und nehmen soziale Stimuli vermutlich als belohnender wahr (Douglas et al., 2004). Auch der Anreizwert von 50-kHz Rufen könnte gesteigert sein. Während des sozialen Spiels sind hohe Emissionsraten von 50-kHz USV zu verzeichnen (Burgdorf et al., 2008; Knutson et al., 1998). Vergleicht man die in der vorgelegten Studie I (Willadsen et al., 2014) bereits beschriebenen Ergebnisse von adulten Weibchen mit den Verhaltenseffekten der juvenilen und adulten Männchen, so zeigt sich, dass sich das Annäherungsverhalten eher auf dem Niveau der juvenilen Männchen bewegt. Der Anreizwert von männlichen 50-kHz Rufen ist für adulte Weibchen höher als für adulte Männchen. Dieser Geschlechtsunterschied bestärkt die Hypothese, dass 50-kHz USV neben der kommunikativen Funktion als soziale Kontaktrufe auch eine Funktion im sexuellen Kontext besitzen könnten. Interessanterweise reagierten Ratten nicht nur auf Playback einer natürlichen Rufsequenz mit Annäherungsverhalten, sondern auch auf artifizielle 50-kHz Sinustöne, die bis auf die fehlende Amplituden- und Frequenzmodulation die gleichen akustischen Merkmale besaßen, wie die Rufe (Wöhr & Schwarting, 2007). Dies zeigt, dass auch 50-kHz Signale ohne diese Modulation einen appetitiven Charakter besitzen, wenngleich das Annäherungsverhalten durch natürliche Rufe bei juvenilen Männchen noch stärker ausgelöst wurde.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Playback von 50-kHz USV konsistent Annäherungsverhalten beim Empfänger auslöst und somit eine reliable und hoch standardisierte Untersuchung von prosozialem Ultraschallkommunikationsverhalten bei Ratten ermöglicht. Dieses Paradigma erscheint aus diesem Grund besonders nützlich für den Einsatz in Verbindung mit Tiermodellen zu sein, die sich durch ein defizitäres Sozialverhalten auszeichnen.

22-kHz USV und Kontrollstimuli – Kommunikative Funktion und Einfluss juveniler sozialer Isolation (Studie II & III)

Im Gegensatz zu 50-kHz USV löst Playback von 22-kHz USV kein Annäherungsverhalten aus. Während der Stimuluspräsentation konnte keine Präferenz für die der Quelle zugewandten proximalen Arme, weder hinsichtlich Eintritte noch Aufenthaltszeit, beobachtet werden. Stattdessen führten 22-kHz USV bei juvenilen männlichen Ratten zu einer moderaten Verhaltensinhibition, welche sich in einer verringerten lokomotorischen Aktivität zeigte (Wöhr & Schwarting, 2007). Dieser Befund ist im Einklang mit vorherigen Studien und unterstützt die Hypothese, dass 22-kHz USV eine Alarmfunktion besitzen und von Ratten verwendet werden, um Artgenossen vor drohenden Gefahren zu warnen (Blanchard et al., 1991; Burman et al., 2007; Endres et al., 2007; Litvin et al., 2007; Wöhr & Schwarting, 2007; 2010).

Auch die Daten aus den drei Experimenten zur sozialen Isolation bestätigen diesen Effekt (Studie III: Seffer et al., 2015). Unabhängig von der Haltungsbedingung führte Playback von 22-kHz USV in neun unabhängigen Gruppen zu einer Verhaltensinhibition. Die Anzahl der Armeintritte (proximal, distal und neutral) war im Vergleich zur Minute vor der Stimuluspräsentation während der gesamten Präsentationsdauer stark reduziert. Dieser Effekt blieb zudem nach Beendigung des 22-kHz USV Playbacks für wenige Minuten weiter bestehen.

Überraschenderweise zeigten alle neun Gruppen auch nach Präsentation von Hintergrundrauschen eine vergleichbare Verhaltensinhibition (Seffer et al., 2015). Ein derart starker Effekt konnte in einer vorherigen Studie nicht beobachtet werden, bei der keine oder lediglich eine schwache Inhibition der lokomotorischen Aktivität gefunden wurde (Wöhr & Schwarting, 2007). Die neuen Ergebnisse stellen die Hypothese der spezifischen Bedeutung von 22-kHz Rufen für dieses Verhalten zumindest ein Stück weit in Frage, da der 22-kHz USV Stimulus aus 22-kHz Rufen, die bei der Furchtkonditionierung aufgenommen wurden, und Hintergrundrauschen zusammengesetzt ist. Allerdings weist auch der 50-kHz USV Stimulus Hintergrundrauschen als Bestandteil auf und führt zu einer eindeutigen Aktivitätssteigerung. Daraus folgt, dass der appetitive Charakter der 50-kHz USV die aversive Komponente des Hintergrundrauschens beim Auslösen der Verhaltensantwort überwiegt. Im Einklang damit steht die Beobachtung, dass Ratten bei gleichzeitiger Präsentation von 50-kHz und 22-kHz USV Annäherungsverhalten gegenüber den 50-kHz Rufen zeigen und nicht mit Verhaltensinhibition auf die 22-kHz Rufe reagieren (Markus Wöhr, persönlicher Bericht).

Eine starke Verhaltensinhibition wurde zudem in Reaktion auf zeit- und amplitudenangepasstem weißen Rauschen bei juvenilen Männchen (Wöhr & Schwarting, 2012) und adulten Weibchen (Willadsen et al., 2014) beobachtet. Da dieser Stimulus jedoch, im Gegensatz zum Hintergrundrauschen, Schallenergie innerhalb des kritischen 22-kHz Bereichs besitzt, könnte sich dadurch sein inhibitorischer Effekt erklären. Allerdings ist die Dauer der einzelnen Bestandteile an die Länge der 50-kHz Rufe angepasst. Folglich würde die für die 22-kHz USV charakteristische lange Rufdauer keine Rolle bei der Verhaltensinhibition spielen.

Aufgrund dieser uneinheitlichen Befundlage sind weitere Studien erforderlich, um die Inhibitionseffekte der 22-kHz USV auf das Verhalten zu untersuchen. Die bisher verwendeten Verhaltensmaße, nämlich Armeintritte und Aufenthaltszeit, scheinen für derlei Fragestellungen als alleinige Indikatoren für Angstverhalten nicht auszureichen. So könnte die Tatsache, dass sich keine Haltungseffekte feststellen ließen, durch das Vorliegen eines Bodeneffekts erklärt werden, welcher eine Differenzierung zwischen eingeschränkter lokomotorischer Aktivität und Angstverhalten nicht ermöglichte. Das bedeutet, dass bei den Kontrolltieren das Verhalten durch die Präsentation von 22-kHz USV bereits maximal eingeschränkt gewesen ist und sich vermeintlich stärkere Effekte bei den Experimentaltieren nicht durch das Erfassen der Armeintritte detektieren ließen. Daher sollte die bestehende Verhaltensanalyse mit Fokus auf 22-kHz USV durch sensitivere und spezifischere Maße ergänzt werden, wie beispielsweise die Erfassung von Verhaltensstarre oder der Risikoeinschätzung. Ebenso erfordern die Kontrollstimuli eine weitere Untersuchung bezüglich ihrer inhibitorischen Effekte.

Juvenile soziale Isolation hatte keinen Einfluss auf das Verhalten der Ratten in Reaktion auf Playback von 22-kHz USV. Bisher durchgeführte Isolationsstudien untersuchten überwiegend Veränderungen in der 22-kHz USV Produktion. So konnte gezeigt werden, dass soziale Langzeitisolation (10 bzw. 14 Tage) bei Ratten zu einer reduzierten Emission von 22-kHz USV führte, ausgelöst durch Exposition einer unbekanntenen Umgebung (Bassi et al., 2007; Nunes Mamede Rosa et al., 2005; Tomazini et al., 2006). Im Gegensatz dazu war die Rufproduktion nach eintägiger Kurzzeitisolation im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht (Bassi et al., 2007; Tomazini et al., 2006). Während die Effekte der Kurzzeitisolation nach einwöchiger Resozialisierungsphase verschwanden, persistierten die Effekte der Langzeitisolation (Bassi et al., 2007; Nunes Mamede Rosa et al., 2005). Es wird angenommen, dass Kurz- und Langzeitisolation unterschiedliche affektive Zustände induzieren. Eine kurzzeitige soziale Isolation resultiere demnach in eine „angstlinderungs-sensitive Verstärkung der Defensivreaktion“ (Tomazini et al., 2006), was sich in einer stärkeren Emissionsrate von 22-kHz USV äußerte, nachweislich ein Indikator für Angst

(Borta et al., 2006). Damit einhergehend konnte dieser Effekt durch die Gabe eines Anxiolytikums aufgehoben werden (Tomazini et al., 2006). Soziale Langzeitisolation scheint hingegen die Defensivreaktion gegenüber aversive Stimuli zu reduzieren, was eine Verringerung der 22-kHz Rufproduktion zur Folge hatte. Eine Aktivierung des dorsalen zentralen Höhlengraus, welches mit Furchtverhalten assoziiert ist (Fendt, 1998; Fendt & Fanselow, 1999), durch Injektion des Neuropeptids Substanz P, führte ebenfalls zu einer Reduktion des Rufverhaltens (Bassi et al., 2007). Generell konnte eine unterdrückte Emission von 22-kHz USV in Situationen von intensiver Furcht beobachtet werden (Jelen et al., 2003). Es sei angemerkt, dass soziale Langzeitisolation keine Furcht auslöst, da Furcht die Reaktion auf eine konkrete Bedrohung ist. Allerdings könnte die Langzeitisolation, im Gegensatz zur Kurzzeitisolation, neuronale Substrate aktivieren, die für emotionale Zustände mit distinkter biologische Bedeutung verantwortlich sind (Bassi et al., 2007; Tomazini et al., 2006). Eine reduzierte Rufproduktion nach Langzeitisolation wurde zudem in Reaktion auf aversive physische Reize, wie Luftstöße, gefunden (Inagaki & Mori, 2013; Inagaki et al., 2005; Prohorecki, 2008). Außerdem könnte die sexuelle Vorerfahrung der Versuchstiere einen modulierenden Einfluss auf den affektiven Zustand nach sozialer Isolation haben. So wurde bei adulten Ratten eine reduzierte 22-kHz USV Produktion nach einwöchiger sozialer Isolation festgestellt, wenn diese vor der Isolation zusammen mit einem weiteren Männchen gehalten wurden (Wen & Xu, 2010). Hatten die Tiere zuvor jedoch Kontakt zu einem Weibchen, war die Rufproduktion nicht beeinträchtigt.

Soziale Kommunikation in Verbindung mit juveniler Isolation ist bei Ratten bisher jedoch kaum erforscht. Bei zuvor isolierten Männchen wurde eine gestörte Unterdrückung des Spielverhaltens in Anwesenheit eines aggressiven Artgenossen beobachtet, was zu einer größeren Zahl verletzender Angriffe führte (von Frijtag et al., 2002). Dabei wurde festgestellt, dass die 22-kHz USV Produktion erhöht ist, wodurch sie sich vom Verhaltensmuster des Senders losgelöst haben könnten. Dadurch könnten die 22-kHz Rufe ihre beruhigende und deeskalierende kommunikative Funktion verloren haben (Lore & Flanely, 1977).

Die Verhaltensinhibition in Reaktion auf 22-kHz USV ist nach sozialer Isolation nicht beeinträchtigt gewesen. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass 22-kHz Rufe entweder von Geburt an als Alarmsignale erkannt werden oder durch Autokonditionierung vor der Isolation ihren Signalwert erhalten (Kim et al., 2010; Parsana et al., 2012b). Letztere könnte eine Erklärung für die uneinheitliche Befundlage bezüglich der Stärke des Inhibitionseffekts in Reaktion auf 22-kHz USV liefern. Während bei Seffer et al. (2015) eine haltungsunabhängige starke Verhaltensinhibition in neun unabhängigen Gruppen gefunden wurde, konnten Wöhr und Schwarting (2007) lediglich einen schwachen Effekt in Reaktion auf 22-kHz USV beobachten. Eine unterschiedliche Vorerfahrung der Versuchstiere könnte

die Ursache für diese Inkonsistenz sein. So lösen 22-kHz USV bei Ratten keine Verhaltensstarre aus, wenn diese zuvor keinerlei aversiven Situationen ausgesetzt waren (Kim et al., 2010; Parsana et al., 2012b). Die Wahrnehmung der eigenen Rufe scheint eine Assoziation der USV mit dem aversiven Kontext zu verursachen. Tatsächlich gibt es weitere Befunde, wonach die 22-kHz USV-induzierte Angstreaktion nicht angeboren ist, sondern durch assoziative Lernprozesse erworben wird, welche durch eine biologische „*Preparedness*“ (engl. Bereitschaft) erleichtert sein könnten (Wöhr & Schwarting, 2010). So scheinen Ratten eine Prädisposition für die Assoziation aversiver Ereignisse mit 22-kHz USV zu besitzen. In einer Studie von Endres et al. (2007) konnten zunächst keine spezifischen Verhaltensänderungen nach Playback von 22-kHz USV detektiert werden. Allerdings lernten die Ratten sehr schnell, 22-kHz Rufe mit aversiven Situationen zu verknüpfen. Im Vergleich zu anderen akustischen Stimuli wurde darüber hinaus eine stabilere Gedächtnisspur beobachtet. So zeigten die auf 22-kHz Rufe konditionierten Versuchstiere eine signifikant verringerte Extinktion. Die Rufe besaßen eine länger anhaltende Alarmfunktion und hatten folglich eine größere Bedeutung für die Vorhersage aversiver Stimuli. Außerdem wurde die Information länger im Langzeitgedächtnis behalten, da die Ratten auch noch nach zehn Tagen mit Verhaltensstarre auf Playback von konditionierten 22-kHz USV reagierten. Im Einklang damit stehen Befunde von Bang et al. (2008), die eine asymmetrische Generalisierung der Stimuli bei der Furchtkonditionierung finden konnten. Auch sie verwendeten Stimuli, die vor der Konditionierung, also der gleichzeitigen Darbietung mit einem aversiven Fußschock, eine gleichermaßen neutrale Bedeutung besaßen und keine Verhaltensstarre auslösten. Die Furchtkonditionierung zeigte für alle akustischen Stimuli zwar vergleichbare Effekte, allerdings konnten die Versuchstiere nicht länger zwischen einem konditionierten (CS+) und einem unkonditionierten Stimulus (CS-) diskriminieren, wenn 22-kHz USV als CS- eingesetzt wurden. Folglich wurde die vom CS+ (z.B. 50-kHz USV) ausgelöste Furcht auf die 22-kHz USV generalisiert. Gegenteilige Effekte wurden erhalten, wenn 22-kHz USV als CS+ verwendet wurden. In diesem Fall wurde die vom CS+ (22-kHz USV) induzierte Furcht nicht auf den CS- (z.B. 50-kHz USV) generalisiert.

Die Ergebnisse der Studie von Seffer et al. (2015) widersprechen nicht der Hypothese, dass die Erkennung von 22-kHz USV als Alarmsignale angeboren ist. Allerdings stehen sie auch nicht im Gegensatz zu der Annahme einer biologischen „*Preparedness*“ für den Erwerb dieser Alarmfunktion, da aversive Erfahrungen vor der sozialen Isolation nicht ausgeschlossen werden können.

Einfluss juveniler sozialer Isolation auf prosoziales Kommunikationsverhalten (Studie III)

In der vorgelegten Studie III (Seffer et al., 2015) wurde eine starke Beeinträchtigung des Annäherungsverhaltens in Reaktion auf prosoziale 50-kHz USV nach juveniler sozialer Isolation bei Ratten gefunden. Im Einklang mit vorherigen Studien zeigten die gruppengehaltenen Kontrolltiere Annäherungsverhalten auf Playback von 50-kHz Rufen (Willuhn et al., 2014; Wöhr & Schwarting, 2007; 2009; 2012). Bei den Tieren, die einer eintägigen Kurzzeitisolation ausgesetzt waren, war dieses Verhalten noch stärker ausgeprägt. Nach vierwöchiger juveniler Langzeitisolation reagierten die Ratten jedoch mit einem sehr eingeschränkten Verhalten während der Präsentation von 50-kHz USV und es konnte keine Annäherung beobachtet werden. Tatsächlich entsprach diese Verhaltensinhibition der jener Ratten, die 22-kHz USV oder Hintergrundrauschen als Stimulus vorgespielt bekamen.

Generell war die lokomotorische Aktivität bei langzeitisolierten Tieren während der Baseline-Periode (5 Minuten vor Stimuluspräsentation) erhöht. Damit wird ein sehr häufig in Studien zur juvenilen sozialen Isolation beobachteter Effekt bestätigt, nämlich die Hyperaktivität in einer unbekanntem Umgebung (Fone & Porkess, 2008; Gaskin et al., 2014; Hall, 1998; Lapid et al., 2003). Diese wird als Indikator für eine gestörte Habituation angesehen (Gentsch et al., 1988; Sahakian et al., 1977), welche zu einer gesteigerten Neophobie führen könnte. Daraus resultiert wiederum eine verstärkte Neigung zu Fluchtverhalten, die sich in Hyperlokomotion äußert (Fone et al., 1996). Aus diesem Grund kann die gefundene Beeinträchtigung des Annäherungsverhaltens nach juveniler Isolation wahrscheinlich nicht durch eine generell eingeschränkte lokomotorische Aktivität erklärt werden.

Das Fehlen des Annäherungsverhaltens in Reaktion auf prosoziale 50-kHz USV stimmt mit anderen Studien überein, die ein defizitäres Sozialverhalten bei Ratten nach juveniler Isolation finden konnten. Eine reduzierte soziale Aktivität zeigte sich im Annäherungsverhalten, Explorationsverhalten, anogenitalen Schnüffeln und gegenseitigen Interaktionsverhalten (Hol et al., 1999; Kokare et al., 2010; Meaney & Stewart, 1979; Möller et al., 2011; 2013; Van den Berg et al., 1999a; b; c, aber siehe auch: Ferdman et al., 2007; Han et al., 2011). Widersprüchliche Ergebnisse könnten teilweise dadurch erklärt werden, dass juvenile soziale Isolation auch zu einem gesteigerten Aggressionsverhalten führt (Grotewold et al., 2014; Meng et al., 2010; Vale & Montgomery, 1997; Wall et al., 2012; Wongwitdecha & Marsden, 1996) und die Abgrenzung von ernsthaften Kämpfen zum sozialen Spiel in den Studien unterschiedlich durchgeführt wurde. Die Erfassung von gesteigertem Interaktionsverhalten könnte also ein größeres soziales Interesse oder ein erhöhtes aggressives Verhalten bedeuten.

Juvenile soziale Isolation scheint das Kommunikationsverhalten bei Ratten zu beeinträchtigen, was zu gesteigerter Aggression führt. So könnten die 22-kHz Rufe ihre deeskalierende Funktion verlieren, wodurch die Anzahl an verletzenden Angriffen steigt (Lore & Flanelly, 1977; von Frijtag et al., 2002). Außerdem nahmen juvenil isolierte Ratten nicht sofort eine unterwürfige Haltung ein, wenn sie territorialer Aggression ausgesetzt wurden (Van den Berg et al., 1999a). Es wurde zudem beobachtet, dass langzeitisolierte Ratten gegenüber Gruppengehaltenen einen drastischen Anstieg der gezielt auf verletzbare Körperstellen ausgerichteten Attacken zeigten (Kopf, Kehle und Unterleib) und auch weniger Drohgebärden äußerten (Tóth et al., 2008). Tatsächlich wurde beobachtet, dass insbesondere die heftigen Bisse vorher nicht durch Angriffssignale angekündigt wurden. Durch das Fehlen dieser Signale kann eine angegriffene Ratte nicht rechtzeitig mit Unterwürfigkeit reagieren, um die Attacke zu verhindern (Blanchard & Blanchard, 1977; Miczek & de Boer, 2005).

Auch die Produktion von 50-kHz USV wurde durch juvenile soziale Langzeitisolation beeinflusst. Beispielsweise wird das Rufverhalten in Reaktion auf „*Tickling*“ verstärkt, einhergehend mit schnellerer Akquisition einer instrumentellen Aufgabe für und weniger Vermeidung von „*Tickling*“ (Burgdorf & Panksepp, 2001; Panksepp & Burgdorf, 2000). Das „*Tickling*“ wird als belohnend wahrgenommen und die 50-kHz Rufe spiegeln einen gesteigerten positiven affektiven Zustand wider (Burgdorf & Panksepp, 2006; Burgdorf et al., 2011). Nach sozialer Isolation sind Ratten anfälliger für belohnende Stimuli (Einon & Sahakian, 1979; Hall, 1998; Jones et al., 1990), was sich beim „*Tickling*“ in einem gesteigertem Konsumverhalten zeigt.

Eine isolations-induzierte gestörte Kommunikation scheint neben dem aggressiven Verhalten auch das Sozialverhalten zu beeinträchtigen. Es wurde gezeigt, dass körperliche Interaktionen während der Adoleszenz wichtig für den Erwerb sozialer, emotionaler und kognitiver Fähigkeiten sind, wie beispielsweise das Ausdrücken und Verstehen kommunikativer Signale von Artgenossen (Hol et al., 1999; Meaney & Stewart, 1981; Van den Berg et al., 1999a; Vanderschuren et al., 1997). So emittierten adulte männliche Ratten nach sozialer Langzeitisolation weniger 50-kHz USV in Gegenwart eines sexuell empfänglichen Weibchens. Dies könnte durch eine gestörte Wahrnehmung sozialer und belohnender Hinweisreize interpretiert werden und/oder durch eine Unfähigkeit, adäquat auf diese Signale zu reagieren (Inagaki et al., 2013b). Diese Interpretation wird durch den Befund unterstützt, dass isolierte Männchen zudem eine veränderte Reaktion des autonomen Nervensystems zeigten, wenn ihnen ein empfängliches Weibchen präsentiert wurde (Inagaki et al., 2013a). Im Vergleich zu gruppengehaltenen Männchen konnten bei den Langzeitisolierten Unterschiede in der Herzschlagfrequenz und in spektralen Parametern der Herzfrequenzvariabilität gefunden werden.

Des Weiteren wurde beobachtet, dass gruppengehaltene adoleszente Ratten keine konditionierte Platzpräferenz entwickelten, wenn das Kompartiment mit einem isolierten Tier dargeboten wurde (Douglas et al., 2004). Die belohnende Eigenschaft der sozialen Interaktion könnte ebenfalls durch eine gestörte Kommunikationsfähigkeit verloren gegangen sein. Tatsächlich konnte in einer anderen Studie ebenfalls eine reduzierte soziale Motivation während der Interaktion mit isolierten Versuchstieren gezeigt werden. So versuchten gruppengehaltene Ratten ihre Spielpartner zu meiden, wenn diese zuvor langzeitisoliert wurden (Varlinskaya et al., 1999). Interessanterweise schien die soziale Motivation losgelöst von der sozialen Aktivität zu sein, da ein Anstieg im Spielverhalten zu verzeichnen war. In einer Studie von Van den Berg et al. (1999d) wurde eine reduzierte Motivation für adultes Sozialverhalten bei zuvor isolierten Ratten gefunden, wobei das Verhaltensmuster nach Initiierung des Sozialkontakts unauffällig gewesen ist.

Die bisher durchgeführten Isolationsstudien konnten nicht zwischen gestörter Wahrnehmung und Interpretation sozialer Hinweisreize und beeinträchtigtem Senden kommunikativer Signale unterscheiden, da häufig Interaktionen erfasst werden. Eine Studie konnte zeigen, dass das Duftmarkierungsverhalten und die Geruchspräferenz von langzeitisolierten Ratten verändert sind. Es wurde zwar eine stärkere Untersuchung der Duftspuren von Artgenossen festgestellt, allerdings sank die Zahl der Gegenmarkierungen mit Urin (Brown, 1991). Die prosoziale Ultraschallkommunikation ist in diesem Tiermodell bisher jedoch kaum untersucht, wobei ausschließlich Verhaltenseffekte auf die Rufproduktion erfasst wurden.

Die Ergebnisse von Seffer et al. (2015) demonstrieren erstmals eine isolations-induzierte kommunikative Beeinträchtigung auf der Seite des Empfängers in Reaktion auf prosoziale 50-kHz USV. Das Fehlen des Annäherungsverhaltens während der USV-Präsentation kann sowohl als Indikator für gesteigerte Angst als auch als Indiz für einen Mangel an sozialer Motivation interpretiert werden, was phänotypisch eher einem depressionsähnlichen Verhalten ähnelt (da Silva et al., 1996; Kokare et al., 2010; Lukkes et al., 2009; Meng et al., 2010; Van den Berg et al., 1999b; Wright et al., 1991, aber siehe auch: Van den Berg et al., 1999a). Belastende Kindheitserfahrungen, wie körperlicher oder sexueller Missbrauch und soziale Vernachlässigung, erhöhen auch bei Menschen das Risiko eine Angststörung oder Depression zu entwickeln (Brown et al., 1999; Lansford et al., 2002; Spinhoven et al., 2010). Im Rahmen dieser Studie wurden keine spezifischen Tests zur Erfassung des Angstverhaltens, wie Offenfeld oder erhöhtes Pluslabyrinth, durchgeführt. Da zudem das Verhalten in Reaktion auf aversive 22-kHz USV aufgrund eines möglichen Bodeneffekts keine Differenzierung zwischen eingeschränkter lokomotorischer Aktivität und Angstverhalten ermöglichte, kann erhöhte Ängstlichkeit nicht als Erklärung für die Verhaltensinhibition der langzeitisolierten Tiere in Reaktion auf Playback von 50-kHz USV ausgeschlossen werden.

Die Hypothese der verringerten sozialen Motivation des Empfängers wird jedoch durch die bidirektionale Modulation des Annäherungsverhaltens in Reaktion auf 50-kHz USV durch Kurz- und Langzeitisolation unterstützt. Während gruppengehaltene Ratten eine klare Präferenz für die Rufe zeigten, war diese Reaktion bei den Kurzzeitisolierten sogar noch verstärkt, wohingegen die Langzeitisolierten nicht reagierten. Einige Studien legen nahe, dass eine gesteigerte soziale Motivation des Senders durch einen Anstieg der 50-kHz USV Emission reflektiert wird, beispielsweise beim sozialen Spiel oder „*Tickling*“ (Burgdorf & Panksepp, 2001; Knutson et al., 1998; Panksepp & Burgdorf, 2000). Nach einer moderaten Isolationsdauer von zwölf Tagen konnte bei adoleszenten Ratten ein Anstieg in der 50-kHz USV Produktion detektiert werden (Willey & Spear, 2013).

Eine weitere Erklärung für die Beeinträchtigung des Annäherungsverhaltens nach juveniler Langzeitisolation ist ein Defizit der sozio-affektiven Informationsverarbeitung, welches durch Vorenthaltung des sozialen Spiels induziert wurde. Das Spielverhalten erreicht seinen Höhepunkt in der Mitte der juvenilen Phase (Panksepp, 1981; Thor & Holloway, 1984), also genau zu dem Zeitpunkt der sozialen Isolation. Es wird angenommen, dass soziales Spielverhalten die neuronale Entwicklung und die Ausprägung von Sozialverhalten fördert, um ein Individuum adäquat auf die Anforderungen vorzubereiten, die es im Erwachsenenalter erwartet (Panksepp, 1998; Pellis & Pellis, 2007; Vanderschuren et al., 1997). Im Einklang mit der Hypothese einer kritischen Entwicklungsperiode (Hol et al., 1999; Scott, 1962; Van den Berg et al., 1999a), kann eine volle Ausprägung der Verhaltensdefizite nur beobachtet werden, wenn die soziale Isolation exakt während dieser sensitiven Phase stattfindet (Fone & Porkess, 2008). Während des Spiels setzen sich Ratten regelmäßig Situationen aus, in denen sie keine absolute Kontrolle über den Ablauf besitzen. Sie trainieren unerwartete Ereignisse, wodurch sie vermutlich flexible Bewältigungsstrategien für eine unvorhersehbare und sich ständig ändernde Umwelt entwickeln (Pellis et al., 2010; Špinko et al., 2001). Darüber hinaus sind körperliche Interaktionen während der Adoleszenz wichtig, um soziale, emotionale und kognitive Fähigkeiten zu erwerben, wie beispielsweise das Ausdrücken und Verstehen kommunikativer Signale von Artgenossen (Hol et al., 1999; Meaney & Stewart, 1981; Van den Berg et al., 1999a; Vanderschuren et al., 1997; Wöhr & Schwarting, 2013). Ein Mangel an diesen Interaktionsmöglichkeiten während der kritischen Entwicklungsphase könnte eine Erklärung für die beschriebenen Kommunikationsdefizite liefern.

Einfluss post-adoleszenter sozialer Isolation und Resozialisierung auf prosoziales Kommunikationsverhalten (Studie III)

Die durch juvenile soziale Isolation verursachten Defizite im Sozialverhalten konnten durch eine einwöchige Resozialisierungsphase teilweise wieder aufgehoben werden. Bei adulten Ratten wurden nach post-adoleszenter Isolation, die nach Vollendung der Spielphase stattfand, keinerlei Beeinträchtigungen beobachtet (Seffer et al., 2015). Letzterer Befund steht im Einklang mit anderen Studien, die ebenfalls keine Verhaltensdefizite ausmachen konnten, wenn die Versuchstiere während der kritischen Phase zumindest teilweise in Gruppen gehalten wurden, bevor sie isoliert wurden. So zeigten sie im Vergleich zu juvenil isolierten Ratten weder reduziertes Sozialverhalten (Hol et al., 1999), noch erhöhtes Objektkontaktverhalten im Offenfeld (Einon & Morgan, 1977), gesteigertes Angstverhalten auf dem erhöhten Pluslabyrinth (Wright et al., 1991) oder Defizite in der Präpulsinhibition (Wilkinson et al., 1994).

Es wurde bereits in einem etablierten Mausmodell für Autismus gezeigt, dass soziale Defizite durch Gruppenhaltung mit Artgenossen verbessert werden können (Yang et al., 2011). Dieser Befund unterstützt die Ergebnisse der vorgelegten Studie III (Seffer et al., 2015), in der kein defizitäres Annäherungsverhalten in Reaktion auf prosoziale 50-kHz USV beobachtet wurde, wenn sich eine Resozialisierungsphase an die juvenile Isolation anschloss.

Erkenntnisse aus den Adoptionsstudien bei rumänischen Waisenkindern unterstützen ebenfalls einen Resozialisierungseffekt. So konnten Defizite in der kognitiven Entwicklung rückgängig gemacht werden, wenn die Kinder in einer Familie unterkamen, im Vergleich zu Kindern, denen dieses förderliche Umfeld bei Verbleib im Waisenhaus nicht geboten werden konnte (Bos et al., 2011; Nelson 3rd et al., 2007). Insgesamt ist die Ergebnislage der Studien zu Resozialisierungseffekten nach sozialer Isolation jedoch sehr inkonsistent. Beispielsweise konnten reduziertes Sozialverhalten (Lukkes et al., 2009), erhöhtes Angstverhalten (Lukkes et al., 2009; Wright et al., 1991), abnormales Aggressions- und Defensivverhalten (Einon & Potegal, 1991; Potegal & Einon, 1989; Tulogdi et al., 2014) sowie Defizite in der Präpulsinhibition (Cilia et al., 2001) nicht durch Resozialisierung gelindert werden. Im Einklang mit dem zum Teil wiederhergestellten Annäherungsverhalten wurden jedoch auch vorteilhafte Effekte einer Resozialisierung gefunden. So konnten Angstverhalten, depressionsähnliches Verhalten und Aggressionsverhalten abgeschwächt (Kokare et al., 2010; Meng et al., 2010; Vale & Montgomery, 1997) sowie „*Huddling*“ (engl. Zusammenkauern; Tulogdi et al., 2014) und soziales Interaktionsverhalten (Kokare et al., 2010) wiederhergestellt werden. Zudem gibt es Hinweise auf eine Wiederherstellung sozialer Kooperation durch Resozialisierung nach adulter Isolation (Willner et al., 1989).

Offenbar hängt die Effizienz einer Resozialisierung bei Ratten sowohl von der Isolationsdauer (Hol et al., 1999) als auch der Resozialisierungsdauer ab, wobei mindestens drei Tage Gruppenhaltung notwendig scheinen, um bestimmte Verhaltensdefizite abzuschwächen (Kokare et al., 2010). Im Hinblick auf die Ergebnisse von Seffer et al. (2015), könnte die einwöchige Resozialisierung nicht ausgereicht haben, um das Verhaltensdefizit völlig aufzuheben. Außerdem erscheint es möglich, dass die soziale Vorerfahrung der Artgenossen bei der Resozialisierung eine wichtige Rolle spielt (Hol et al., 1999; Tulogdi et al., 2014). In dieser Studie wurden ausschließlich zuvor sozial isolierte Tiere miteinander resozialisiert, was eine Abmilderung des förderlichen Effekts verursacht haben könnte.

Es stellt sich die Frage, ob tatsächlich das Vorenthalten der sozialen Interaktion während der Spielphase das defizitäre Sozialverhalten bei Ratten verursacht. Es konnte vielfach gezeigt werden, dass soziale Deprivation einen Rebound-Effekt verursacht. Das bedeutet, dass kurze bzw. moderate Deprivationsphasen die Motivation für und damit das Auftreten von Spielverhalten stark erhöhen (Hole, 1991; Holloway & Suter, 2003; Ikemoto & Panksepp, 1992; Niesink & van Ree, 1989; Panksepp, 1981; Varlinskaya & Spear, 2008; Varlinskaya et al., 1999). Interessanterweise findet sich dieser Effekt auch nach juveniler sozialer Langzeitisolation (Grotewold et al., 2014; Han et al., 2001; Wall et al., 2012), was teilweise darin begründet sein könnte, dass sich die Spielkämpfe zu ernsthaften Kämpfen entwickeln und somit eher für ein gesteigertes Aggressionsverhalten sprechen. Die Entwicklung des Spielverhaltens scheint zudem sehr robust zu sein, da eine moderate soziale Deprivation weder während des frühen Absetzens von der Mutter (postnataler Tag [PND] 15-24; Ikemoto & Panksepp, 1992) noch kurz darauf (PND Tag 24-31; Himmler et al., 2015) die Ausprägung verhaltenstypischer Elemente beeinflusst. Lediglich nach einer längeren Isolationsphase (PND 18-40) zeigte sich am ersten Versuchstag ein Defizit im sozialen Spiel, welches an den darauffolgenden Tagen nicht mehr auszumachen war (Panksepp, 1981). Im Vergleich zu gruppengehaltenen Tieren zeigten sozial deprivierte Ratten eine gesteigerte soziale Präferenz (Douglas et al., 2004), die auch in aversiven Situationen zu beobachten war, in denen die Kontrolltiere mit sozialer Vermeidung reagierten (Varlinskaya & Spear, 2008). Darüber hinaus bevorzugten sie soziale Interaktion gegenüber Futter (Ikemoto & Panksepp, 1992) und Amphetamin (Yates et al., 2013), was für ein starkes Verlangen nach Sozialkontakt spricht und den gesteigerten Anreizwert des Spielverhaltens nach sozialer Deprivation unterstreicht. Interessanterweise scheinen sozial deprivierte Ratten aufgrund dieser erhöhten Motivation an sozialer Attraktivität für die Gruppengehaltenen zu verlieren, was sich in Vermeidungsverhalten äußerte (Varlinskaya et al., 1999) und die Ausbildung sozialer Platzpräferenz verhinderte (Douglas et al., 2004).

In einer Studie von Hole (1991) wurde untersucht, inwieweit der Rebound-Effekt nach sozialer Kurzzeitisolation vom sozialen Spiel abhängig ist. Dazu wurde das Spielverhalten von drei Gruppen nach vorheriger eintägiger Manipulation beobachtet. Während die Kontrolltiere regulären Zugang zu einem Spielpartner hatten, wurde bei einer Gruppe der Sozialkontakt mit einer Plexiglasscheibe im Käfig unterbunden, die lediglich auditorische, visuelle und olfaktorische Hinweisreize ermöglichte. Bei einer dritten Gruppe befand sich ein Drahtgitter im Käfig, das zudem physischen Kontakt ermöglichte und lediglich das Auftreten von Spielverhalten verhinderte. Es zeigte sich, dass physischer Kontakt nicht ausreichte, um den Rebound-Effekt aufzuheben, da bei beiden Experimentalgruppen ein starker Anstieg im sozialen Spiel zu verzeichnen war. Holloway & Suter (2004) konnten diesen Befund nach zweiwöchiger Deprivation replizieren und untersuchten darüber hinaus, ob generelle körperliche Aktivität das Fehlen des Spiels kompensieren kann. Den Versuchstieren wurde Zugang zu einem Laufrad gewährt, was jedoch keinerlei Effekt hatte. Auch eine Variation der Käfiggröße (Holloway & Suter, 2004; Siegel & Jensen, 1986) oder eine mit Objekten angereicherte Umgebung (Tanaś et al., 2015) veränderte das gesteigerte Spielverhalten nach sozialer Deprivation nicht. Es gibt allerdings Hinweise, dass das Aufwachsen in einer physikalisch angereicherten Umgebung kognitives, emotionales und motivationales Verhalten beeinflusst (Hoffmann et al., 2009), die Erholung nach pränatalem (Morley-Fletcher et al., 2003) und psychosozialem (Schloesser et al., 2010) Stress begünstigt sowie während sozialer Isolation die Ausprägung des gesteigerten Angstverhaltens verhindert (Hellemans et al., 2004). Wie jedoch in einer kürzlich veröffentlichten Studie gezeigt wurde, kann sich eine angereicherte Umgebung auch negativ auf das Sozialverhalten auswirken, was sich in einer reduzierten 50-kHz Rufproduktion sowie einer Beeinträchtigung des Annäherungsverhaltens in Reaktion auf 50-kHz USV Playback äußerte (Brenes et al., im Druck). Das defizitäre Kommunikationsverhalten könnte dadurch erklärt werden, dass sich die Ratten bevorzugt mit den dargebotenen Objekten beschäftigt haben, anstatt mit dem Sozialpartner zu interagieren. Nach Meinung der Autoren könnte eine ausgedehnte physikalische Anreicherung der Umwelt in einer Reizüberflutung resultieren, was unter anderem zu sozialem Rückzug führen könnte und damit im Einklang mit der „*Intense World Theory*“ für Autismus stehen würde (Markram & Markram, 2010). Allerdings könnte eine physikalische Anreicherung der Umwelt für isolierte Ratten auch einen Vorteil darstellen, indem sie den fehlenden Sozialkontakt möglicherweise kompensiert. Aus diesem Grund sollte in zukünftigen Studien die Auswirkung von physikalischer Anreicherung während juveniler sozialer Isolation auf das Kommunikationsverhalten getestet werden. Bisherige Isolationsstudien verwendeten meist kürzere Isolationszeiträume und/oder erfassten lediglich Spiel- oder Angstverhalten. Da Spielverhalten jedoch, im Gegensatz zu anderen sozialen Verhaltensweisen, nach juveniler Langzeitisolation erhöht ist, konnten potentielle Effekte der

angereicherten Umgebung auf soziale Defizite möglicherweise nicht detektiert werden. Die Erfassung des Annäherungsverhaltens in Reaktion auf Playback von prosozialen 50-kHz USV bietet daher ein verlässliches Maß.

Die kritische Bedeutung des Spielverhaltens für die sozio-affektive Informationsverarbeitung bei Ratten wird außerdem von Studien unterstützt, die zeigen konnten, dass die Beeinträchtigung sozialer Kompetenzen bereits durch wenige Spielereignisse während juveniler sozialer Isolation verhindert wurde (Einon & Potegal, 1991; Potegal & Einon, 1989; Tanaś et al., 2015, aber siehe auch: Van den Berg et al., 2000). Interessanterweise scheint auch „*Tickling*“ als eine Art soziale Anreicherung zu fungieren und fehlendes Spielverhalten zum Teil zu kompensieren. So konnten sowohl isolations-induziertes Angstverhalten als auch eine Abnahme der 50-kHz USV Rufproduktion durch tägliches „*Tickling*“ verhindert werden (Cloutier et al., 2013).

Juvenile soziale Isolation als Tiermodell für die Schizophrenie (Studie III)

Hinsichtlich der Übertragbarkeit der in diesem Tiermodell gefundenen Ergebnisse kann zusammengefasst werden, dass die Verhaltensauffälligkeiten, die nach juveniler sozialer Isolation beobachtet werden können, klinische Relevanz für Erkrankungen besitzen, die sich durch ein soziales Defizit auszeichnen, wie beispielsweise tiefgreifende Entwicklungsstörungen, etwa Autismus, oder Depressive Störungen.

Ein defizitäres Sozial- und Kommunikationsverhalten bildet aber auch einen Teil der Negativsymptomatik ab, wie man sie bei der Schizophrenie findet. Tatsächlich sind bei Schizophreniepatienten verschiedene Bereiche des Sozialverhaltens beeinträchtigt (Penn et al., 2008), einschließlich „*Theory of Mind*“ (Biedermann et al., 2012; Brüne, 2005), Emotionswahrnehmung (Irani et al., 2012; Schneider et al., 2006) und verbaler sowie nonverbaler Kommunikation (Couture et al., 2006; Lavelle et al., 2013). Laut DSM-5 (APA, 2013) zeigen Patienten eine schwere desorganisierte Sprechweise und/oder Sprachverarmung (Alogie), was die Kommunikation wesentlich erschwert. Zudem sind häufig eine verminderte emotionale Ausdrucksfähigkeit und eine Antriebsarmut, besonders in Bezug auf soziale Interaktionen (Asozialität), zu beobachten. Aufgrund der isolations-induzierten Beeinträchtigungen in allen drei Symptomgebieten (positiv, negativ, kognitiv), kann dem Tiermodell demnach eine hohe Augenscheinvalidität bescheinigt werden (Fone & Porkess, 2008; Hall, 1998; Lapiz et al., 2003).

Darüber hinaus ist auch eine prädiktive Validität gegeben. So konnten isolations-induzierte Defizite bei Ratten durch pharmakologische Behandlung behoben werden. Subchronische, aber nicht akute Verabreichung des Antipsychotikums Clozapin oder N-Acetylcystein, einem Modulator der glutamatergen Transmission, stellten soziale Interaktion sowie Gedächtnisleistungen und sensomotorische Filterleistungen wieder her (Möller et al., 2011; 2013). An dieser Stelle soll exemplarisch die Beteiligung des Opioidsystems ausführlicher beschrieben werden. So wirkt eine chronische Morphingabe der verringerten sozialen Aktivität beachtenswerterweise entgegen, begleitet von einer Umkehrung der hochregulierten Bindungsstellen des μ -Opioidrezeptors (Van den Berg et al., 1999c; 2000). Es wurde gezeigt, dass soziales Spielverhalten die Freisetzung von Opioiden in bestimmten Hirnregionen verursacht (Vanderschuren et al., 1997). Daher könnten Veränderungen des Sozialverhaltens, induziert durch das Vorenthalten des sozialen Spiels, das Ergebnis einer verringerten Opioidfreisetzung während dieser kritischen Entwicklungsphase sein. Eine Morphinbehandlung scheint diesen Mangel an Opioidfreisetzung kompensieren zu können. Dies wird durch weitere Befunde unterstützt. Durch das Ausschalten von μ -Opioidrezeptoren in sogenannten „*Knock-out*“-Mäusen konnte sowohl das Bindungs- und Kommunikationsverhalten (Moles et al., 2004) als auch das Annäherungsverhalten während

Playback von Weibchen-USV (Wöhr et al., 2011) beeinträchtigt werden. Bei Ratten wurde die soziale Annäherung in Reaktion auf 50-kHz USV durch Gabe von Morphin erhöht und durch Verabreichung des μ -Opioidrezeptor-Antagonisten Naloxon verringert (Wöhr & Schwarting, 2009). Der κ -Opioidrezeptor spielt hingegen eine wichtige Rolle bei der Regulation der 50-kHz USV Emission und der Verarbeitung positiver Emotionen (Hamed et al., 2015). Somit scheinen endogene Opiode nicht nur am Sozialverhalten beteiligt zu sein, sondern auch an der sozio-affektiven Informationsverarbeitung (Oddi et al., 2013).

Darüber hinaus werden die Verhaltensauffälligkeiten nach juveniler Isolation zudem von neuromorphologischen Veränderungen sowie Störungen in Neurotransmittersystemen, wie Dopamin, Glutamat und Serotonin begleitet, die im Zusammenhang mit der Schizophrenie stehen (Fone & Porkess, 2008; Hall, 1998; Lapid et al., 2003). Diese Befunde sprechen für eine hohe Konstruktvalidität dieses Tiermodells. Im Einklang damit konnte in einer Studie III begleitenden Untersuchung gezeigt werden, dass sich neben einer kognitiven Beeinträchtigung auch Veränderungen in Regulatoren neuronaler Entwicklung und synaptischer Plastizität induzieren ließen (Valluy et al., 2015). Nach sozialer Isolation konnte sowohl eine erhöhte Expression des Ubiquitinligase-Transkripts Ube3a1 als auch erhöhte Werte der microRNA miR-134 im Hippocampus nachgewiesen werden, welche mit Entwicklungsstörungen, wie dem Angelman-Syndrom und Autismus, assoziiert sind, die sich unter anderem durch soziale Auffälligkeiten und kognitiven Beeinträchtigungen auszeichnen. In zukünftigen Studien wäre es daher interessant, Veränderungen in der Neurotransmission sowie der synaptischen Plastizität zu erfassen, die spezifisch nach juveniler aber nicht post-adoleszenter Isolation auftreten. Außerdem gilt es zu prüfen, welche dieser Veränderungen durch die Resozialisierung aufgehoben werden können. Dieser Ansatz könnte zur Identifikation vielversprechender Ansatzpunkte für neue medikamentöse Behandlungen beitragen, deren Wirksamkeit wiederum in Tiermodellen mit defizitärem Sozialverhalten, wie der juvenilen sozialen Isolation, getestet werden könnte.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass 50-kHz USV sowohl für Männchen als auch für Weibchen eine kommunikative Funktion besitzen und vermutlich an der Regulation von Sexualverhalten beteiligt sind (Studie I: Willadsen et al., 2014), dass das Playback-Paradigma die Ultraschallkommunikation von Ratten auf reliable und hoch standardisierte Weise untersucht und sich deshalb in besonderem Maße für den Einsatz in Verbindung mit Tiermodellen mit defizitärem Sozialverhalten eignet (Studie II: Seffer et al., 2014) und schließlich, dass juvenile soziale Isolation zu einer Beeinträchtigung des Annäherungsverhaltens führte, welches durch Resozialisierung aufgehoben werden konnte und somit insgesamt ein valides Tiermodell zur Erforschung neuropsychiatrischer Erkrankungen darstellt (Studie III: Seffer et al., 2015).

LITERATUR

[A]

- Ahrens, A. M., Ma, S. T., Maier, E. Y., Duvauchelle, C. L., and Schallert, T. (2009). Repeated intravenous amphetamine exposure: rapid and persistent sensitization of 50-kHz ultrasonic trill calls in rats. *Behav. Brain Res.* 197, 205–209.
- Ahrens, A. M., Nobile, C. W., Page, L. E., Maier, E. Y., Duvauchelle, C. L., and Schallert, T. (2013). Individual differences in the conditioned and unconditioned rat 50-kHz ultrasonic vocalizations elicited by repeated amphetamine exposure. *Psychopharmacology* 229, 687–700.
- Allin, J. T., and Banks, E. M. (1972). Functional aspects of ultrasound production by infant albino rats (*Rattus norvegicus*). *Anim. Behav.* 20, 175–185.
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5th ed.). Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.

[B]

- Baarendse, P. J. J., Counotte, D. S., O'Donnell, P., and Vanderschuren, L. J. M. J. (2013). Early social experience is critical for the development of cognitive control and dopamine modulation of prefrontal cortex function. *Neuropsychopharmacology* 38, 1485–1494.
- Baenninger, L. P. (1966). The reliability of dominance orders in rats. *Anim. Behav.* 14, 367–371.
- Bang, S. J., Allen, T. A., Jones, L. K., Boguszewski, P., and Brown, T. H. (2008). Asymmetrical stimulusgeneralization following differential fear conditioning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 90, 200–216.
- Barfield, R. J., Auerbach, P., Geyer, L. A., and McIntosh, T. K. (1979). Ultrasonic vocalizations in rat sexual behavior. *Am. Zool.* 19, 469–480.
- Barfield, R. J., and Thomas, D. A. (1986). The role of ultrasonic vocalizations in the regulation of reproduction in rats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 474, 33–43.
- Barnett, S. A., and Spencer, M. M. (1951). Feeding, social behaviour and interspecific competition in wild rats. *Behaviour* 3, 229–242.
- Bassi, S. G., Nobre, N. J., Carvalho, M. C., and Brandão, M. L. (2007). Substance P injected into the dorsal periaqueductal gray causes anxiogenic effects similar to long-term isolation as assessed by ultrasound vocalizations measurements. *Behav. Brain Res.* 182, 301–307.
- Ben-Ami Bartal, I., Decety, J., and Mason, P. (2011). Empathy and pro-social behavior in rats. *Science* 334, 1427–1430.

- Bianchi, M., Fone, K. F. C., Azmi, N., Heidbreder, C. A., Hagan, J. J., and Marsden, C. A. (2006). Isolation rearing induces recognition memory deficits accompanied by cytoskeletal alterations in rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 24, 2894–2902.
- Biedermann, F., Frajo-Apor, B., and Hofer, A. (2012). Theory of mind and its relevance in schizophrenia. *Curr. Opin. Psychiatr.* 25, 71–75.
- Blanchard, R. J., Agullana, R., McGee, L., Weiss, S., and Blanchard, D. C. (1992). Sex differences in the incidence and sonographic characteristics of antipredator ultrasonic cries in the laboratory rat (*Rattus norvegicus*). *J. Comp. Psychol.* 106, 270–277.
- Blanchard, R. J., and Blanchard, D. C. (1977). Aggressive behavior in the rat. *Behav. Biol.* 21, 197–224.
- Blanchard, R. J., Blanchard, D. C., Agullana, R., and Weiss, S. M. (1991). Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. *Physiol. Behav.* 50, 967–72.
- Borta, A., Wöhr, M., and Schwarting, R. K. W. (2006). Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. *Behav. Brain Res.* 166, 271–280.
- Bos, K., Zeanah, C. H., Fox, N. A., Drury, S. S., McLaughlin, K. A., and Nelson, C. A. 3. (2011). Psychiatric outcomes in young children with a history of institutionalization. *Harvard Rev. Psychiat.* 19, 15–24.
- Bowie, C. R., and Harvey, P. D. (2006). Cognitive deficits and functional outcome in schizophrenia. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2, 531–536.
- Braff, D. L., Geyer, M. A., and Swerdlow, N. R. (2001). Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology* 156, 234–258.
- Braun, K., and Bock, J. (2011). The experience-dependent maturation of prefronto-limbic circuits and the origin of developmental psychopathology: implications for the pathogenesis and therapy of behavioural disorders. *Dev. Med. Child Neurol.* 53, 14–18.
- Brenes, J. C., Lackinger, M., Höglinger, G. U., Schratt, G., Schwarting, R. K. W., and Wöhr, M. (im Druck) Differential effects of social and physical environmental enrichment on brain plasticity, cognition, and ultrasonic communication in rats. *J. Comp. Neurol.*
- Brown, A. S. (2006). Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. *Schizophrenia Bull.* 32, 200–202.
- Brown, A. S., Schaefer, C. A., Wyatt, R. J., Begg, M. D., Goetz, R., Bresnahan, M. A., Harkavy-Friedman, J., Gorman, J. M., Malaspina, D., and Susser, E. S. (2002). Paternal age and risk of schizophrenia in adult offspring. *Am. J. Psychiatry* 159, 1528–1533.
- Brown, J., Cohen, P., Johnson, J. G., and Smailes, E. M. (1999). Childhood abuse and neglect: specificity of effects on adolescent and young adult depression and suicidality. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 38, 1490–1496.

- Brown, R. E. (1991). Effects of rearing condition, gender, and sexual experience on odor preferences and urine marking in Long-Evans rats. *Anim. Learn. Behav.* 19, 18–28.
- Brudzynski, S. M. (2013). Ethotransmission: communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 310–317.
- Brudzynski, S. M., and Pniak, A. (2002). Social contacts and production of 50-kHz short ultrasonic calls in adult rats. *J. Comp. Psychol.* 116, 73–82.
- Brüne, M. (2005). "Theory of mind" in schizophrenia: A review of the literature. *Schizophrenia Bull.* 31, 21–42.
- Burgdorf, J., Knutson, B., Panksepp, J., and Ikemoto, S. (2001). Nucleus accumbens amphetamine microinjections unconditionally elicit 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Behav. Neurosci.* 115, 940–944.
- Burgdorf, J., Kroes, R. A., Moskal, J. R., Pfau, J. G., Brudzynski, S. M., and Panksepp, J. (2008). Ultrasonic vocalizations of rats during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. *J. Comp. Psychol.* 122, 357–367.
- Burgdorf, J., and Panksepp, J. (2001). Tickling induces reward in adolescent rats. *Physiol. Behav.* 72, 167–173.
- Burgdorf, J., and Panksepp, J. (2006). The neurobiology of positive emotions. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30, 173–187.
- Burgdorf, J., Panksepp, J., and Moskal, J. R. (2011). Frequency-modulated 50 kHz ultrasonic vocalizations: a tool for uncovering the molecular substrates of positive affect. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 1831–1836.
- Burman, O. H. P., Ilyat, A., Jones, G., and Mendl, M. (2007). Ultrasonic vocalizations as indicators of welfare for laboratory rats (*Rattus norvegicus*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 104, 116–129.

[C]

- Cantor-Graae, E., and Selten, J.-P. (2005). Schizophrenia and migration: a meta-analysis and review. *Am. J. Psychiatry* 162, 12–24.
- Cardno, A. G., and Gottesman, I. I. (2000). Twin studies of schizophrenia: from bow-and-arrow concordances to star wars Mx and functional genomics. *Am. J. Med. Genet.* 97, 12–17.
- Caspi, A., and Moffitt, T. E. (2006). Gene-environment interactions in psychiatry: joining forces with neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 583–590.
- Choi, J. S., and Brown, T. H. (2003). Central amygdala lesions block ultrasonic vocalization and freezing as conditional but not unconditional responses. *J. Neurosci.* 23, 8713–8721.
- Chubb, J. E., Bradshaw, N. J., Soares, D. C., Porteous, D. J., and Millar, J. K. (2008). The *DISC* locus in psychiatric illness. *Mol. Psychiatry* 13, 36–64.

- Cicchetti, D., and Toth, S. L. (1995). A developmental psychopathology perspective on child abuse and neglect. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 34, 541–565.
- Cilia, J., Reavill, C., Hagan, J. J., and Jones, D. N. C. (2001). Long-term evaluation of isolation rearing induced prepulse inhibition deficits in rats. *Psychopharmacology* 156, 327–337.
- Cloutier, S., Baker, C., Wahl, K., Panksepp, J., and Newberry, R.C. (2013). Playful handling as social enrichment for individually- and group-housed laboratory rats. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 143, 85–95.
- Constantini, F., and D’Amato, F. R. (2006). Ultrasonic vocalizations in mice and rats: Social contexts and functions. *Acta Zool. Sinica* 52, 619–633.
- Couture, S. M., Penn, D. L., and Roberts, D. L. (2006). The functional significance of social cognition in schizophrenia: A review. *Schizophrenia Bull.* 32(Suppl.1), S44–63.
- Crick, N. R., and Dodge, K. A. (1994). A review and reformulation of social information-processing mechanisms in children’s social adjustment. *Psychol. Bull.* 115, 74–101.

[D]

- da Silva, N. L., Ferreira, V. M. M., Carobrez A. P., and Morato, G. S. (1996). Individual housing from rearing modifies the performance of young rats on the elevated plus-maze apparatus. *Physiol. Behav.* 60, 1391–1396.
- Davis, K. L., Kahn, R. S., Ko, G., and Davidson, M. (1991). Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am. J. Psychiatry* 148, 1474–1486.
- Del Arco, A., Zhu, S. W., Terasmaa, A., Mohammed, A. H., and Fuxe, K. (2004). Hyperactivity to novelty induced by social isolation is not correlated with changes in D2 receptor function and binding in striatum. *Psychopharmacology* 171, 148–155.
- DeLisi, L. E., Hoff, A. L., Schwartz, J. E., Shields, G. W., Halthore, S. N., Gupta, S. M., Henn, F. A., and Anand, A. K. (1991). Brainmorphology in first-episode schizophrenic-like psychotic patients: a quantitativemagnetic resonance imaging study. *Biol. Psychiatry* 29, 159–175.
- DeRosse, P., Nitzburg, G. C., Kompancaril, B., and Malhotra, A. K. (2014). The relation between childhood maltreatment and psychosis in patients with schizophrenia and non-psychiatric controls. *Schizophr. Res.* 155, 66–71.
- Dodge, K. A., Bates, J. E., and Pettit, G. S. (1990). Mechanisms in the cycle of violence. *Science* 250, 1678–1683.
- Dodge, K. A., Pettit, G. S., McClaskey, C. L., and Brown, M. M. (1986). Social competence in children. With Commentary by John M. Gottman. *Monogr. Soc. Res. Child Dev.* 51(2, Serial No. 213).
- Douglas, L. A., Varlinskaya, E. I., and Spear, L. P. (2004). Rewarding properties of social interactions in adolescent and adult male and female rats: impact of social vs. isolate housing of subjects and partners. *Develop. Psychobiol.* 45, 153–162.

[E]

- Einon, D. F., and Morgan, M. J. (1977). A critical period for social isolation in the rat. *Dev. Psychobiol.* 10, 123–132.
- Einon, D., and Potegal, M. (1991). Enhanced defense in adult rats deprived of playfighting experience as juveniles. *Aggr. Behav.* 17, 27–40.
- Einon, D. F., and Sahakian, B. J. (1979). Environmentally induced differences in susceptibility of rats to CNS stimulants and CNS depressants: evidence against a unitary explanation. *Psychopharmacology* 61, 299–307.
- Ellenbroek, B. A., and Cools, A. R. (2000). Animal models for the negative symptoms of schizophrenia. *Behav. Pharmacol.* 11, 223–233.
- Endres, T., Widmann, K., and Fendt, M. (2007). Are rats predisposed to learn 22 kHz calls as danger-predicting signals? *Behav. Brain Res.* 185, 69–75.

[F]

- Fendt, M. (1998). Different regions of the periaqueductal grey are involved differently in the expression and conditioned inhibition of fearpotentiated startle. *Eur. J. Neurosci.* 10, 3876–3884.
- Fendt, M., and Koch, M. (2013). Translational value of startle modulations. *Cell Tissue Res.* 354, 287–295.
- Fendt, M., Lex, A., Falkai, P., Henn, F. A., and Schmitt, A. (2008). Behavioural alterations in rats following neonatal hypoxia and effects of clozapine: implications for schizophrenia. *Pharmacopsychiatry* 41, 138–145.
- Fendt, M., and Fanselow, M. S. (1999). The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 743–760.
- Ferdman, N., Murmu, R. P., Bock, J., Braun, K., and Leshem, M. (2007). Weaning age, social isolation, and gender, interact to determine adult explorative and social behavior, and dendritic and spine morphology in prefrontal cortex of rats. *Behav. Brain Res.* 180, 174–182.
- File, S. E., and Seth, P. (2003). A review of 25 years of the social interaction test. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 35–53.
- Fleischhacker, W. W., and Hinterhuber, H. (2012). *Lehrbuch Psychiatrie*. Wien, Österreich: Springer-Verlag.
- Fone, K. C. F., and Porkess, M. V. (2008). Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents—Relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 1087–1102.
- Fone, K. C., Shalders, K., Fox, Z. D., Arthur, R., and Marsden, C. A. (1996). Increased 5-HT_{2C} receptor responsiveness occurs on rearing rats in social isolation. *Psychopharmacology* 123, 346–352.
- Frank, D. A., Klass, P. E., Earls, F., and Eisenberg, L. (1996). Infants and young children in orphanages: one view from pediatrics and child psychiatry. *Pediatrics* 97, 569–578.

[G]

- Gallinat, J., and Gudlowski, Y. (2008). Die Glutamathypothese der Schizophrenie. *Nervenheilkunde* 27, 317–325.
- Gaskin, P. L. R., Alexander, S. P. H., and Fone, K. C. F. (2014). Neonatal phencyclidine administration and post-weaning social isolation as a dual-hit model of ‘schizophrenia-like’ behaviour in the rat. *Psychopharmacology* 231, 2533–2545.
- Gentsch, C., Lichtsteiner, M., Frischknecht, H. R., Feer, H., and Siegfried, B. (1988). Isolation-induced locomotor hyperactivity and hypoalgesia in rats are prevented by handling and reversed by resocialization. *Physiol. Behav.* 43, 13–16.
- Geyer, M. A., and Ellenbroeck, B. (2003). Animal behavior models of the mechanisms underlying antipsychotic atypicality. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27, 1071–1079.
- Geyer, M. A., Krebs-Thomson, K., Braff, D. L., and Swerdlow, N. R. (2001). Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology* 156, 117–154.
- Geyer, L. A., McIntosh, T. K., and Barfield, R. J. (1978). Effects of ultrasonic vocalizations and male’s urine on female rat readiness to mate. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 92, 457–462.
- Geyer, M. A., Wilkinson, L. S., Humby, T., and Robbins, T. W. (1993). Isolation rearing of rats produces a deficit in prepulse inhibition of acoustic startle similar to that in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 34, 361–372.
- Gilbert, R., Widom, C. S., Browne, K., Fergusson, D., Webb, E., and Janson, S. (2009). Burden and consequences of child maltreatment in high-income countries. *Lancet* 373, 68–81.
- Gottesman, I. I. (1991). Schizophrenia genesis: the origins of madness. New York: Freeman.
- Gottesman, I. I., and Gould, T. D. (2003). The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am. J. Psychiatry* 160, 636–645.
- Gould, T. D., and Gottesman, I. I. (2006). Psychiatric endophenotypes and the development of valid animal models. *Genes Brain Behav.* 5, 113–119.
- Grotewold, S. K., Wall, V. L., Goodell, D. J., Hayter, C., and Bland, S. T. (2014). Effects of cocaine combined with a social cue on conditioned place preference and nucleus accumbens monoamines after isolation rearing in rats. *Psychopharmacology* 231, 3041–3053.

[H]

- Hall, F. S. (1998). Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. *Crit. Rev. Neurobiol.* 12, 129–162.
- Hamed, A., Szyndler, J., Taracha, E., Turzyńska, D., Sobolewska, A., Lehner, M., Krząścik P., and Daszczuk, P. (2015). κ -opioid receptor as a key mediator in the regulation of appetitive 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Psychopharmacology* 232, 1941–1955.

- Hammerschmidt, K., Radyushkin, K., Ehrenreich, H., and Fischer, J. (2009). Female mice respond to male ultrasonic ‘songs’ with approach behaviour. *Biol. Letters* 5, 589–592.
- Han, X., Wang, W., Shao, F., and Li, N. (2011). Isolation rearing alters social behaviors and monoamine neurotransmission in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of adult rats. *Brain Res.* 1385, 175–181.
- Harrison, P. J., and Weinberger, D. R. (2005). Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol. Psychiatry* 10, 40–68.
- Hellemans, K. G., Benge, L. C., and Olmstead, M. C. (2004). Adolescent enrichment partially reverses the social isolation syndrome. *Brain Res.* 150, 103–115.
- Hernandez-Lallement, J., van Wingerden, M., Marx, C., Srejic, M., and Kalenscher, T. (2015). Rats prefer mutual rewards in a prosocial choice task. *Front. Neurosci.* 8:443.
- Himmler, B. T., Himmler, S. M., Stryjek, R., Modlińska, K., Pisula, W., and Pellis, S. M. (2015). The development of juvenile-typical patterns of play fighting in juvenile rats does not depend on peer-peer play experience in the peri-weaning period. *International Journal of Comparative Psychology* 28.
- Himmler, B. T., Kisko, T. M., Euston, D. R., Kolb, B., and Pellis, S. M. (2014). Are 50-kHz calls used as play signals in the playful interactions of rats? I. Evidence from the timing and context of their use. *Behav. Processes* 106, 60–66.
- Hoffmann, L. C., Schütte, S. R., Koch, M., and Schwabe, K. (2009). Effect of “enriched environment” during development on adult rat behavior and response to the dopamine receptor agonist apomorphine. *Neuroscience* 158, 1589–1598.
- Hoffman, R. E. (2007). A social deafferentation hypothesis for induction of active schizophrenia. *Schizophrenia Bull.* 33, 1066–1070.
- Hol, T., Van den Berg, C. L., van Ree, J. M., and Spruijt, B. M. (1999). Isolation during the play period in infancy decreases adult social interactions in rats. *Behav. Brain Res.* 100, 91–97.
- Hole, G. (1991). The effects of social deprivation on levels of social play in the laboratory rat *Rattus norvegicus*. *Behav. Process.* 25, 41–53.
- Holloway, K. S., and Suter, R. B. (2004). Play deprivation without social isolation: Housing controls. *Dev. Psychobiol.* 44, 58–67.
- Hori, M., Shimoju, R., Tokunaga, R., Ohkubo, M., Miyabe, S., Ohnishi, J., Murakami, K., and Kurosawa, M. (2013). Tickling increases dopamine release in the nucleus accumbens and 50 kHz ultrasonic vocalizations in adolescent rats. *Neuroreport* 24, 241–245.

[I]

- Ikemoto, S., and Panksepp, J. (1992). The effects of early social isolation on the motivation of social play in juvenile rats. *Dev. Psychobiol.* 25, 261–274.

- Ikemoto, S., and Panksepp, J. (1999). The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain Res. Rev.* 31, 6–41.
- Inagaki, H., Kuwahara, M., Kikusui, T., and Tsubone, H. (2005). The influence of social environmental condition on the production of stress-induced 22 kHz calls in adult male Wistar rats. *Physiol. Behav.* 84, 17–22.
- Inagaki, H., Kuwahara, M., and Tsubone, H. (2013a). Effects of post-weaning individual housing on autonomic responses in male rats to sexually receptive female rats. *Exp. Anim.* 62, 229–235.
- Inagaki, H., Kuwahara, M., Tsubone, H., and Mori, Y. (2013b). The effect of post-weaning individual housing on 50-kHz calls emitted from male rats to sexually receptive female rats. *Physiol. Behav.* 110-111, 30–33.
- Inagaki, H., and Mori, Y. (2013). The critical point at which post-weaning individual housing conditions affect the emission of 22-kHz calls in male rats. *J. Vet. Med. Sci.* 75, 527–529.
- Irani, F., Seligman, S., Kamath, V., Kohler, C., and Gur, R. C. (2012). A meta-analysis of emotion perception and functional outcomes in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 137, 203–211.

[J]

- Jelen, P., Soltysik, S., and Zagrodzka, J. (2003). 22-kHz ultrasonic vocalization in rats as an index of anxiety but not fear: Behavioral and pharmacological modulation of affective state. *Behav. Brain Res.* 141, 63–72.
- Jones, C. A., Watson, D. J. G., and Fone, K. C. F. (2011). Animal models of schizophrenia. *Br. J. Pharmacol.* 164, 1162–1194.
- Jones, G. H., Marsden, C. A., and Robbins, T. W. (1990). Increased sensitivity to amphetamine and reward-related stimuli following social isolation in rats: possible disruption of dopamine-dependent mechanisms of the nucleus accumbens. *Psychopharmacology* 102, 364–372.

[K]

- Kim, E. J., Kim, E. S., Covey, E., and Kim, J. J. (2010). Social transmission of fear in rats: the role of 22-kHz ultrasonic distress vocalizations. *PLoS One* 5, e15077.
- Kisko, T. M., Euston, D. R., and Pellis, S. M. (2015a). Are 50-kHz calls used as play signals in the playful interactions of rats? III. The effects of devocalization on play with unfamiliar partners as juveniles and as adults. *Behav. Processes* 113, 113–121.
- Kisko, T. M., Himmler, B. T., Himmler, S. M., Euston, D. R., and Pellis, S. M. (2015b). Are 50-kHz calls used as play signals in the playful interactions of rats? II. Evidence from the effects of devocalization. *Behav. Processes* 111, 25–33.

- Knutson, B., Burgdorf, J., and Panksepp, J. (1998). Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. *J. Comp. Psychol.* 112, 65–73.
- Koch, M. (2006). „Animal models of schizophrenia,“ in *Animal models of neuropsychiatric diseases*, ed. M. Koch (London: Imperial College Press), 337–402.
- Koch, M. (2012). Clinical relevance of animal models of schizophrenia. *Suppl. Clin. Neurophysiol.* 62, 113–120.
- Kokare, D. M., Dandekar, M. P., Singru, P. S., Gupta, G. L., and Subhedar, N. K. (2010). Involvement of α -MSH in the social isolation induced anxiety- and depression-like behaviors in rat. *Neuropharmacology* 58, 1009–1018.
- Kwapil, T. R. (1998). Social anhedonia as a predictor of the development of schizophrenia-spectrum disorders. *J. Abnorm. Psychol.* 107, 558–565.

[L]

- Lansford, J. E., Dodge, K. A., Pettit, G. S., Bates, J. E., Crozier, J., and Kaplow, J. (2002). A 12-year prospective study of the long-term effects of early child physical maltreatment on psychological, behavioral, and academic problems in adolescence. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 156, 824–830.
- Lapiz, M. D. S., Fulford, A., Muchimapura, S., Mason, R., Parker, T., and Marsden, C. A. (2003). Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission. *Neurosci. Behav. Physiol.* 33, 13–29.
- Lavelle, M., Healey, P. G. T., and McCabe, R. (2013). Is nonverbal communication disrupted in interactions involving patients with schizophrenia? *Schizophrenia Bull.* 39, 1150–1158.
- Leucht, S., Fritze, J., Lanczik, M. H., Vauth, R., and Olbrich, H. M. (2012). „Schizophrenien und andere psychotische Störungen,“ in *Psychische Erkrankungen. Klinik und Therapie*, ed. M. Berger (München: Elsevier Urban & Fischer), 347–419.
- Lieberman, J. A., Kane, J. M., and Alvir, J. (1987). Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia. *Psychopharmacology* 91, 415–433.
- Litvin, Y., Blanchard, D. C., and Blanchard, R. J. (2007). Rat 22 kHz ultrasonic vocalizations as alarm cries. *Behav. Brain Res.* 182, 166–172
- Lohaus, A. and Vierhaus, M. (2013). *Entwicklungspsychologie*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Łopuch, S., and Popik, P. (2011). Cooperative behavior of laboratory rats (*Rattus norvegicus*) in an instrumental task. *J. Comp. Psychol.* 125, 250–253.
- Lore, R., and Flannelly, K. (1977). Rat societies. *Sci. Am.* 236, 106–116.
- Lukas, M. and Wöhr, M. (2015). Endogenous vasopressin, innate anxiety, and the emission of pro-social 50-kHz ultrasonic vocalizations during social play behavior in juvenile rats. *Psychoneuroendocrinology* 56, 35–44.

Lukkes, J. L., Mokin, M. V., Scholl, J. L., and Forster, G. L. (2009). Adult rats exposed to early-life social isolation exhibit increased anxiety and conditioned fear behavior, and altered hormonal stress responses. *Horm. Behav.* 55, 248–256.

[M]

Mällo, T., Matrov, D., Herm, L., Kõiv, K., Eller, M., Rinken, A., and Harro, J. (2007). Tickling-induced 50-kHz ultrasonic vocalization is individually stable and predicts behaviour in tests of anxiety and depression in rats. *Behav. Brain Res.* 184, 57–71.

Malaspina, D., Harlap, S., Fennig, S., Heiman, D., Nahon, D., Feldman, D., and Susser, E. S. (2001). Advancing paternal age and the risk of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 58, 361–367.

Markram, K., and Markram, H. (2010). The intense world theory - a unifying theory of the neurobiology of autism. *Front. Hum. Neurosci.* 4:224.

McClure, M. M., Romero, M. J., Bowie, C. R., Reichenberg, A., Harvey, P. D., and Siever, L. J. (2007). Visual-spatial learning and memory in schizotypal personality disorder: continued evidence for the importance of working memory in the schizophrenia spectrum. *Arch. Clin. Neuropsychol.* 22, 109–116.

McGonigle, P. (2014). Animal models of CNS disorders. *Biochem. Pharmacol.* 87, 140–149.

McIntosh, T. K., Barfield, R. J., and Geyer, L. A. (1978). Ultrasonic vocalisations facilitate sexual behaviour in female rats. *Nature* 272, 163–164.

Meaney, M. J., and Stewart, J. (1979). Environmental factors influencing the affiliative behavior of male and female rats (*Rattus norvegicus*). *Anim. Learn. Behav.* 7, 397–405.

Meaney, M. J., and Stewart, J. (1981). A descriptive study of social development in the rat (*Rattus norvegicus*). *Anim. Behav.* 29, 34–45.

Meltzer, H. Y. (1999). The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology* 21, 106–15.

Meng, Q., Li, N., Han, X., Shao, F., and Wang, W. (2010). Peri-adolescence isolation rearing alters social behavior and nociception in rats. *Neurosci. Lett.* 480, 25–29.

Messias, E., and Kirkpatrick, B. (2001). Summer birth and deficit schizophrenia in the epidemiological catchment area study. *J. Nerv. Ment. Dis.* 189, 608–612.

Meyer, J. S., and Quenzer, L. F. (2013). *Psychopharmacology: drugs, the brain, and behavior*. Sunderland: Sinauer Associates.

Meyer, U., and Feldon, J. (2012). To poly(I:C) or not to poly(I:C): advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. *Neuropharmacology* 62, 1308–1321.

Miczek, K. A., and de Boer, S. F. (2005). „Aggressive, defensive, and submissive behavior,“ in *The behavior of the laboratory rat: A handbook with tests*, eds. I. Q. Whishaw, and B. Kolb (New York: Oxford University Press), 344–352.

- Miyoshi, K., and Morimura, Y. (2010). „Clinical manifestations of neuropsychiatric disorders,“ in *Neuropsychiatric disorders*, eds. K. Miyoshi, Y. Morimura, and K. Maeda (Tokyo, Japan: Springer-Verlag), 3–15.
- Miyoshi, K., Morimura, Y., and Maeda, K. (2010). *Neuropsychiatric disorders*. Tokyo, Japan: Springer-Verlag.
- Möller, M., Du Preez, J. L., Emsley, R., and Harvey, B. H. (2011). Isolation rearing-induced deficits in sensorimotor gating and social interaction in rats are related to corticostriatal oxidative stress, and reversed by sub-chronic clozapine administration. *Eur. Neuropsychopharm.* 21, 471–483.
- Möller, M., Du Preez, J. L., Viljoen, F. P., Berk, M., Emsley, R., and Harvey, B. H. (2013). Social isolation rearing induces mitochondrial, immunological, neurochemical and behavioural deficits in rats, and is reversed by clozapine or N-acetyl cysteine. *Brain Behav. Immun.* 30, 156–167.
- Moles, A., Kieffer, B. L., and D’Amato, F. R. (2004). Deficit in attachment behavior in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Science* 304, 1983–1986.
- Morley-Fletcher, S., Rea, M., Maccari, S., and Laviola, G. (2003). Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. *Eur. J. Neurosci.* 18, 3367–3374.

[N]

- Nadler, J. J., Moy, S. S., Dold, G., Simmons, N., Perez, A., Young, N. B., Barbaro, R. P., Piven, J., Magnuson, T. R., and Crawley, J. N. (2004). Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice. *Genes Brain Behav.* 3, 303–314.
- Natusch, C., and Schwarting, R. K. W. (2010). Using bedding in a test environment critically affects 50-kHz ultrasonic vocalizations in laboratory rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 96, 251–259.
- Nelson, C. A. 3., Zeanah, C. H., Fox, N. A., Marshall, P. J., Smyke, A. T., and Guthrie, D. (2007). Cognitive recovery in socially deprived young children: The Bucharest Early Intervention Project. *Science* 318, 1937–1940.
- Newcomer, J. W., Farber, N. B., Jevtovic-Todorovic, V., Selke, G., Melson, A. K., Hershey, T., Craft, S., and Olney, J. W. (1999). Ketamine-induced NMDA receptor hypofunction as a model of memory impairment and psychosis. *Neuropsychopharmacology* 20, 106–118.
- Niesink, R. J. M., and van Ree, J. M. (1989). Involvement of opiod and dopaminergic systems in isolation-induced pinning and social grooming of young rats. *Neuropharmacology* 28, 411–418.
- Noirot, E. (1968). Ultrasounds in young rodents. II. Changes with age in albino rats. *Anim. Behav.* 16, 129–134.
- Nuechterlein, K. H., Barch, D. M., Gold, J. M., Goldberg, T. E., Green, M. F., and Heaton, R. K. (2004). Identification of separable cognitive factors in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 72, 29–39.

Nunes Mamede Rosa, M. L., Nobre, M. J., Riberio Oliveira, A., and Brandão, M. L. (2005). Isolation-induced changes in ultrasonic vocalization, fear-potentiated startle and prepulse inhibition in rats. *Neuropsychobiology* 51, 248–255.

[O]

- O'Donovan, M. C., Craddock, N., Norton, N., Williams, H., Peirce, T., Moskvina, V., Nikolov, I., Hamshere, M., Carroll, L., Georgieva, L., Dwyer, S., Holmans, P., Marchini, J. L., Spencer, Chris C A, Howie, B., Leung, H.-T., Hartmann, A. M., Möller, H.-J., Morris, D. W., Shi, Y., Feng, G., Hoffmann, P., Propping, P., Vasilescu, C., Maier, W., Rietschel, M., Zammit, S., Schumacher, J., Quinn, E. M., Schulze, T. G., Williams, N. M., Giegling, I., Iwata, N., Ikeda, M., Darvasi, A., Shifman, S., He, L., Duan, J., Sanders, A. R., Levinson, D. F., Gejman, P. V., Cichon, S., Nöthen, M. M., Gill, M., Corvin, A., Rujescu, D., Kirov, G., Owen, M. J., Buccola, N. G., Mowry, B. J., Freedman, R., Amin, F., Black, D. W., Silverman, J. M., Byerley, W. F., and Cloninger, C. R. (2008). Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up. *Nat. Genet.* 40, 1053–1055.
- Oddi, D., Crusio, W. E., D'Amato, F. R., and Pietropaolo, S. (2013). Monogenic mouse models of social dysfunction: Implications for autism. *Behav. Brain Res.* 251, 75–84.
- Olds, J., and Milner, P. (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal areas and other brain regions of rat brain. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 47, 419–427.
- Owen, M. J. (2000). Molecular genetic studies of schizophrenia. *Brain Res. Rev.* 31, 179–186.

[P]

- Panksepp, J. (1981). The ontogeny of play in rats. *Dev. Psychobiol.* 14, 327–332.
- Panksepp, J. (1998). *Affective neuroscience: the foundations of human and animal emotions*. New York: Oxford University Press.
- Panksepp, J. (2005). Beyond a joke: from animal laughter to human joy? *Science* 308, 62–63.
- Panksepp, J. (2007). Neuroevolutionary sources of laughter and social joy: Modeling primal human laughter in laboratory rats. *Behav. Brain Res.* 182, 231–244.
- Panksepp, J., and Burgdorf, J. (2000). 50-kHz chirping (laughter?) in response to conditioned and unconditioned tickle-induced reward in rats: effects of social housing and genetic variables. *Behav. Brain Res.* 115, 25–38.
- Panksepp, J., and Burgdorf, J. (2003). “Laughing” rats and the evolutionary antecedents of human joy? *Physiol. Behav.* 79, 533–547.
- Panksepp, J., Gordon, N., and Burgdorf, J. (2002). Empathy and the action-perception resonances of basic socio-emotional systems of the brain. *Behav. Brain Sci.* 25, 43–44.
- Papp, M., Willner, P., and Muscat, R. (1991). An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology* 104, 255–259.

- Parsana, A. J., Li, N., and Brown, T. H. (2012a). Positive and negative ultrasonic social signals elicit opposing firing patterns in rat amygdala. *Behav. Brain Res.* 226, 77–86.
- Parsana, A. J., Moran, E. E., and Brown, T. H. (2012b). Rats learn to freeze to 22-kHz ultrasonic vocalizations through autoconditioning. *Behav. Brain Res.* 232, 395–399.
- Pedersen, C. B., and Mortensen, P. B. (2001). Evidence of a dose-response relationship between urbanicity during upbringing and schizophrenia risk. *Arch. Gen. Psychiatry* 58, 1039–1046.
- Pellis, S. M. (2002). „Keeping in touch: Play fighting and social knowledge,“ in *The cognitive animal. Empirical and theoretical perspectives on animal cognition*, eds. M. Bekoff, C. Allen, and G. M. Burghardt (Cambridge, MA: MIT Press), 421–427.
- Pellis, S. M., and Pellis, V. C. (1987). Play-fighting differs from serious fighting in both target of attack and tactics of fighting in the laboratory rat *Rattus norvegicus*. *Aggr. Behav.* 13, 227–242.
- Pellis, S. M., and Pellis, V. C. (2007). Rough-and-tumble play and the development of the social brain. *Curr. Dir. Psychol. Sci.* 16, 95–98.
- Pellis, S. M., Pellis, V. C., and Bell, H. C. (2010). The function of play in the development of the social brain. *Am. J. Play* 2, 278–296.
- Pellis, S. M., Pellis, V. C., and Foroud, A. (2005). „Play fighting: Aggression, affiliation, and the development of nuanced social skills,“ in *Developmental origins of aggression*, eds. R. E. Tremblay, W. W. Hartup, and J. Archer (New York: Guilford Press), 47–62.
- Penn, D. L., Sanna, L. J., and Roberts, D. L. (2008). Social cognition in schizophrenia: An overview. *Schizophrenia Bull.* 34, 408–411.
- Pereira, M., Andreatini, R., Schwarting, R. K. W., and Brenes, J. C. (2014). Amphetamine-induced appetitive 50-kHz calls in rats: a marker of affect in mania? *Psychopharmacology* 231, 2567–2577.
- Picardi, A., Viroli, C., Tarsitani, L., Miglio, R., de Girolamo, G., Dell'Acqua, G., and Biondi, M. (2012). Heterogeneity and symptom structure of schizophrenia. *Psychiatry Res.* 198, 386–394.
- Pletnikov, M. V., Ayhan, Y., Nikolskaia, O., Xu, Y., Ovanesov, M. V., Huang, H., Mori, S., Moran, T. H., and Ross, C. A. (2008). Inducible expression of mutant human DISC1 in mice is associated with brain and behavioral abnormalities reminiscent of schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 13, 173–186.
- Pohorecky, L. A. (2008). Psychosocial stress and chronic ethanol ingestion in male rats: Effects on elevated plus maze behavior and ultrasonic vocalizations. *Physiol. Behav.* 94, 432–447.
- Popik, P., Potasiewicz, A., Pluta, H., and Zieniewicz, A. (2012). High-frequency ultrasonic vocalizations in rats in response to tickling: The effects of restraint stress. *Behav. Brain Res.* 234, 223–227.
- Portfors, C. V. (2007). Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 46, 28–34.

- Potegal, M., and Einon, D. (1989). Aggressive behaviors in adult rats deprived of playfighting experience as juveniles. *Dev. Psychobiol.* 22, 159–172.
- Preti, A., Cardascia, L., Zen, T., Marchetti, M., Favaretto, G., and Miotto, P. (2000). Risk for obstetric complications and schizophrenia. *Psychiatry Res.* 96, 127–139.

[Q]

- Quan, M. N., Tian, Y. T., Xu, K. H., Zhang, T., and Yang, Z. (2010). Post weaning social isolation influences spatial cognition, prefrontal cortical synaptic plasticity and hippocampal potassium ion channels in wistar rats. *Neuroscience* 169, 214–222.

[R]

- Read, J., Os, J., Morrison, A. P., and Ross, C. A. (2005). Childhood trauma, psychosis and schizophrenia: a literature review with theoretical and clinical implications. *Acta Psychiatr. Scand.* 112, 330–350.
- Rey, E.-R. (2011). „Psychotische Störungen und Schizophrenie,” in *Klinische Psychologie & Psychotherapie*, eds. H.-U. Wittchen, and J. Hoyer (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), 797–856.
- Rippberger, H., van Gaalen, M. M., Schwarting, R. K. W., and Wöhr, M. (2015). Environmental and pharmacological modulation of amphetamine-induced 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Curr. Neuropharmacol.* 13, 220–232.
- Rutte, C., and Taborsky, M. (2007). Generalized reciprocity in rats. *PLoS Biol.* 5, e196.
- Rutte, C., and Taborsky, M. (2008). The influence of social experience on cooperative behaviour of rats (*Rattus norvegicus*): direct vs generalised reciprocity. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 62, 499–505.
- Rygula, R., Pluta, H., and Popik, P. (2012). Laughing rats are optimistic. *PLoS One* 7, e51959.

[S]

- Sadananda, M., Wöhr, M., and Schwarting, R. K. W. (2008). Playback of 22-kHz and 50-kHz ultrasonic vocalizations induces differential c-fos expression in rat brain. *Neurosci. Lett.* 435, 17–23.
- Sahakian, B. J., Robbins, T. W., and Iversen, S. D. (1977). Effects of isolation rearing on exploration in rat. *Anim. Learn. Behav.* 5, 193–198.
- Salchner, P., Lubec, G., and Singewald, N. (2004). Decreased social interaction in aged rats may not reflect changes in anxiety-related behaviour. *Behav. Brain Res.* 151, 1–8.
- Sales, G. D. (1972a). Ultrasound and aggressive behaviour in rats and other small mammals. *Anim. Behav.* 20, 88–100.
- Sales, G. D. (1972b). Ultrasound and mating behaviour in rodents with some observations on other behavioural situations. *J. Zool.* 168, 149–164.

- Sartory, G. (2007). *Schizophrenie. Empirische Befunde und Behandlungsansätze*. Heidelberg: Elsevier Spektrum Akad. Verl.
- Schenkel, L. S., Spaulding, W. D., DiLillo, D., and Silverstein, S. M. (2005). Histories of childhood maltreatment in schizophrenia: Relationships with premorbid functioning, symptomatology, and cognitive deficits. *Schizophr. Res.* 76, 273–286.
- Schloesser, R. J., Lehmann, M., Martinowich, K., Manji, H. K., and Herkenham, M. (2010). Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. *Mol. Psychiatry* 15, 1152–1163.
- Schneider, F., Gur, R. C., Koch, K., Backes, V., Amunts, K., Shah, N. J., Bilker, W., Gur, R. E., and Habel, U. (2006). Impairment in the specificity of emotion processing in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 163, 442–447.
- Schuster, R. (2001). An animal model of cooperating dyads: methodological and theoretical issues. *Mexican Journal of Behavior Analysis* 27, 165–200.
- Schuster, R. (2002). Cooperative coordination as a social behavior. *Hum. Nature* 12, 47–83.
- Schwarting, R. K. W., and Wöhr, M. (2012). On the relationships between ultrasonic calling and anxiety-related behavior in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 45, 337–348.
- Schwarting, R. K. W., Jegan, N., and Wöhr, M. (2007). Situational factors, conditions and individual variables which can determine ultrasonic vocalizations in male adult Wistar rats. *Behav. Brain Res.* 182, 208–222.
- Scott, J. P. (1962). Critical periods in behavioral development. *Science* 138, 949–958.
- Seffer, D., Rippberger, H., Schwarting, R. K. W., and Wöhr, M. (2015). Pro-social 50-kHz ultrasonic communication in rats: Post-weaning but not post-adolescent social isolation leads to social impairments – phenotypic rescue by re-socialization. *Front. Behav. Neurosci.* 9:102.
- Seffer, D., Schwarting, R. K. W., and Wöhr, M. (2014). Pro-social ultrasonic communication in rats: Insights from playback studies. *J. Neurosci. Methods* 234, 73–81.
- Semple, D. M. (2005). Book Review: Cannabis as a risk factor for psychosis: systematic review. *J. Psychopharmacol.* 19, 187–194.
- Shackman, J. E., and Pollak, S. D. (2014). Impact of physical maltreatment on the regulation of negative affect and aggression. *Dev. Psychopathol.* 26, 1021–1033.
- Siegel, M. A., and Jensen, R. A. (1986). The effects of naloxone and cage size on social play and activity in isolated young rats. *Behav. Neural Biol.* 45, 155–168.
- Silberberg, A., Allouch, C., Sandfort, S., Kearns, D., Karpel, H., and Slotnick, B. (2014). Desire for social contact, not empathy, may explain "rescue" behavior in rats. *Anim. Cogn.* 17, 609–618.
- Snoeren, E. M., and Ågmo, A. (2013). Female ultrasonic vocalizations have no incentive value for male rats. *Behav. Neurosci.* 127, 439–450.
- Snoeren, E. M., and Ågmo, A. (2014). The incentive value of males' 50-kHz ultrasonic vocalizations for female rats (*Rattus norvegicus*). *J. Comp. Psychol.* 128, 40–55.

- Spinhoven, P., Elzinga, B. M., Hovens, J. G. F. M., Roelofs, K., Zitman, F. G., van Oppen, P., and Phenninx, B. W. J. H. (2010). The specificity of childhood adversities and negative life events across the life span to anxiety and depressive disorders. *J. Affect. Disorders* 126, 103–112.
- Spinka, M., Newberry, R. C., and Bekoff, M. (2001). Mammalian play: Training for the unexpected. *Q. Rev. Biol.* 76, 141–168.
- Stenseng, F., Belsky, J., Skalicka, V., and Wichstrom, L. (2014). "Preschool social exclusion, aggression, and cooperation: A longitudinal evaluation of the need-to-belong and the social-reconnection hypotheses. *Pers. Soc. Psychol. B.* 40, 1637–1647.
- Swerdlow, N. R. (2013). Update: studies of prepulse inhibition of startle, with particular relevance to the pathophysiology of Tourette syndrome. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37, 1150–1156.

[T]

- Takahashi, L. K., and Lore, R. K. (1983). Play fighting and the development of agonistic behavior in male and female rats. *Aggr. Behav.* 9, 217–227.
- Tan, H. Y., and Ang, Y. G. (2001). First-episode psychosis in the military: a comparative study of prodromal symptoms. *Aust. N. Z. J. Psychiatry* 35, 512–519.
- Tanaś, L., Ostaszewski, P., and Iwan, A. (2015). Effects of post-weaning social isolation and environmental enrichment on exploratory behavior and anxiety in Wistar rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 75, 72–79.
- Teicher, M. H., Andersen, S. L., Polcari, A., Anderson, C. M., Navalta, C. P., and Kim, D. M. (2003). The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 33–44.
- Thomas, D. A., Howard, S. B., and Barfield, R. J. (1982). Male produced ultrasonic vocalizations and mating patterns in female rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 96, 807–815.
- Thomas, D. A., Talalas, L., and Barfield, R. J. (1981). Effects of devocalization of the male on mating behavior in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 95, 630–637.
- Thor, D. H., and Holloway, W. R., JR. (1984). Developmental analyses of social play behavior in juvenile rats. *Bull. Psychon. Soc.* 22, 587-590.
- Tomazini, F. M., Reimer, A., Albrecht-Souza, L., and Brandão, M. L. (2006). Opposite effects of short- and long-duration isolation on ultrasonic vocalization, startle and prepulse inhibition in rats. *J. Neurosci. Methods* 153, 114-120.
- Tóth, M., Halász, J., Mikics, É., Barsy, B., and Haller, J. (2008). Early social deprivation induces disturbed social communication and violent aggression in adulthood. *Behav. Neurosci.* 122, 849–854.
- Tsuang, M. (2000). Schizophrenia: genes and environment. *Biol. Psychiatry* 47, 210-220.

Tulogdi, Á., Tóth, M., Barsvári, B., Biró, L., Mikics, É., and Haller, J. (2014). Effects of resocialization on post-weaning social isolation-induced abnormal aggression and social deficits in rats. *Dev. Psychobiol.* 56, 49–57.

[U]

Ulas, J., and Cotman, C. W. (1993). Excitatory amino acid receptors in schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 19, 105–117.

[V]

Vale, A. L., and Montgomery, A. M. (1997). Social interaction: responses to chlordiazepoxide and the loss of isolation-reared effects with paired-housing. *Psychopharmacology* 133, 127–132.

Valluy, J., Bicker, S., Aksoy-Aksel, A., Lackinger, M., Sumer, S., Fiore, R., Wüst, T., Seffer, D., Metge, F., Dieterich, C., Wöhr, M., Schwarting, R., and Schratz, G. (2015). A coding-independent function of an alternative Ube3a transcript during neuronal development. *Nat. Neurosci.* 18, 666–673.

Van den Berg, C. L., Hol, T., van Ree, J. M., Spruijt, B. M., Everts, H., and Koolhaas, J. M. (1999a). Play is indispensable for an adequate development of coping with social challenges in the rat. *Dev. Psychobiol.* 34, 129–138.

Van den Berg, C. L., Pijlman, F. T. A., Koning, H. A. M., Diergaarde, L., van Ree, J. M., and Spruijt, B. M. (1999b). Isolation changes the incentive value of sucrose and social behaviour in juvenile and adult rats. *Behav. Brain Res.* 106, 133–142.

Van den Berg, C. L., van Ree, J. M., Spruijt, B. M., and Kitchen, I. (1999c). Effects of juvenile isolation and morphine treatment on social interactions and opioid receptors in adult rats: behavioural and autoradiographic studies. *Eur. J. Neurosci.* 11, 3023–3032.

Van den Berg, C. L., van Ree, J. M., and Spruijt, B. M. (1999d). Sequential analysis of juvenile isolation-induced decreased social behavior in the adult rat. *Physiol. Behav.* 67, 483–488.

Van den Berg, C. L., van Ree, J. M., and Spruijt, B. M. (2000). Morphine attenuates the effects of juvenile isolation in rats. *Neuropharmacology* 39, 969–976.

Van der Staay, F. J., Arndt, S. S., and Nordquist, R. E. (2009). Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behav. Brain Funct.* 5:11.

van Os, J., Kenis, G., and Rutten, B. P. F. (2010). The environment and schizophrenia. *Nature* 468, 203–212.

Vanderschuren, L. J. M. J., Niesink, R. J. M., Spruijt, B. M., and van Ree, J. M. (1995a). Influence of environmental factors on social play behavior of juvenile rats. *Physiol. Behav.* 58, 119–123.

- Vanderschuren, L. J. M. J., Niesink, R. J. M., Spruijt, B. M., and van Ree, J. M. (1995b). Effects of morphine on different aspects of social play in juvenile rats. *Psychopharmacology* 117, 225–231.
- Vanderschuren, L. J. M. J., Niesink, R. J. M., Spruijt, B. M., and van Ree, J. M. (1995c). μ - and κ -opioid receptor-mediated opioid effects on social play in juvenile rats. *Eur. J. Pharmacol.* 276, 257–266.
- Vanderschuren, L. J. M. J., Niesink, R. J. M., and van Ree, J. M. (1997). The neurobiology of social play behavior in rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 309–326.
- Varese, F., Smeets, F., Drukker, M., Lieverse, R., Lataster, T., Viechtbauer, W., Read, J., van Os, J., and Bentall, R. P. (2012). Childhood adversities increase the risk of psychosis: A meta-analysis of patient-control, prospective- and cross-sectional cohort studies. *Schizophrenia Bull.* 38, 661–671.
- Varlinskaya, E. I., and Spear, L. P. (2008). Social interactions in adolescent and adult Sprague–Dawley rats: Impact of social deprivation and test context familiarity. *Behav. Brain Res.* 188, 398–405.
- Varlinskaya, E. I., Spear, L. P., and Spear, N. E. (1999). Social behavior and social motivation in adolescent rats: Role of housing conditions and partner's activity. *Physiol. Behav.* 67, 475–482.
- Veenema, A. H. (2009). Early life stress, the development of aggression and neuroendocrine and neurobiological correlates: What can we learn from animal models? *Front. Neuroendocrin.* 30, 497–518.
- von Frijtag, J. C., Schot, M., van den Bos, R., and Spruijt, B. M. (2002). Individual housing during the play period results in changed responses to and consequences of a psychosocial stress situation in rats. *Dev. Psychobiol.* 41, 58–69.

[W]

- Wall, V. L., Fischer, E. K., and Bland, S. T. (2012). Isolation rearing attenuates social interaction-induced expression of immediate early gene protein products in the medial prefrontal cortex of male and female rats. *Physiol. Behav.* 107, 440–450.
- Weiss, I. C., Pryce, C. R., Jongen-Relo, A. L., Nanz-Bahr, N. I., and Feldon, J. (2004). Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behav. Brain Res.* 152, 279–295.
- Wen, F., and Xu, L. (2010). Effects of isolation after sexual experience on anxiety-like, depressive-like behaviors and affective states in male rats. *Chin. Sci. Bull.* 55, 4136–4142.
- Whishaw, I. Q., and Kolb, B. (2005). *The behavior of the laboratory rat: A handbook with tests*. New York: Oxford University Press.
- White, N. R., and Barfield, R. J. (1987). Role of the ultrasonic vocalization of the female rat (*Rattus norvegicus*) in sexual behavior. *J. Comp. Psychol.* 101, 73–81.
- White, N. R., and Barfield, R. J. (1989). Playback of female rat ultrasonic vocalizations during sexual behavior. *Physiol. Behav.* 45, 229–233.

- White, N. R., and Barfield, R. J. (1990). Effects of male pre-ejaculatory vocalizations on female receptive behavior in the rat (*Rattus norvegicus*). *J. Comp. Psychol.* 104, 140–146.
- White, N. R., Cagiano, R., Moises, A. U., and Barfield, R. J. (1990). Changes in mating vocalizations over the ejaculatory series in rats (*Rattus norvegicus*). *J. Comp. Psychol.* 104, 255–262.
- White, N. R., Colona, L. C., and Barfield, R. J. (1991). Sensory cues that elicit ultrasonic vocalizations in female rats (*Rattus norvegicus*). *Behav. Neural Biol.* 55, 154–165.
- White, N. R., Gonzales, R. N., and Barfield, R. J. (1993). Do vocalizations of the male rat elicit calling from the female? *Behav. Neural Biol.* 59, 76–78.
- Wilkinson, L. S., Killcross, S. S., Humby, T., Hall, F. S., Geyer, M. A., and Robbins, T. W. (1994). Social-isolation in the rat produces developmentally specific deficits in prepulse inhibition of the acoustic startle response without disrupting latent inhibition. *Neuropsychopharmacology* 10, 61–72.
- Willadsen, M., Seffer, D., Schwarting, R. K. W., and Wöhr, M. (2014). Rodent ultrasonic communication: Male pro-social 50-kHz ultrasonic vocalizations elicit social approach behavior in female rats (*Rattus norvegicus*). *J. Comp. Psychol.* 128, 56–64.
- Willey A. R., and Spear L. P. (2013). The effects of pre-test social deprivation on a natural reward incentive test and concomitant 50 kHz ultrasonic vocalization production in adolescent and adult male Sprague-Dawley rats. *Behav. Brain Res.* 245, 107–112.
- Willner, P., Sampson, D., Phillips, G., Fichera, R., Foxlow, P., and Muscat, R. (1989). Effects of isolated housing and chronic antidepressant treatment on cooperative social behaviour in rats. *Behav. Pharmacol.* 1, 85–90.
- Willuhn, I., Tose, A., Wanat, M. J., Hart, A. S., Hollon, N. G., Phillips, P. E. M., Schwarting, R. K. W., and Wöhr, M. (2014). Phasic dopamine release in the nucleus accumbens in response to pro-social 50 kHz ultrasonic vocalizations in rats. *J. Neurosci.* 34, 10616–10623.
- Winterer, G., and Weinberger, D. R. (2004). Genes, dopamine and cortical signal-to-noise ratio in schizophrenia. *Trends. Neurosci.* 27, 683–690.
- Wöhr, M., Borta, A., and Schwarting, R. K. W. (2005). Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: A dose–response study in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 84, 228–240.
- Wöhr, M., Houx, B., Schwarting, R. K. W., and Spruijt, B. (2008). Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. *Physiol. Behav.* 93, 766–776.
- Wöhr, M., Kehl, M., Borta, A., Schänzer, A., Schwarting, R. K. W., and Höglinger, G. U. (2009). New insights into the relationship of neurogenesis and affect: Tickling induces hippocampal cell proliferation in rats emitting appetitive 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Neuroscience* 163, 1024–1030.
- Wöhr, M., Moles, A., Schwarting, R. K. W., and D'Amato, F. R. (2011). Lack of social exploratory activation in male μ -opioid receptor KO mice in response to playback of female ultrasonic vocalizations. *Soc. Neurosci.* 6, 76–87.

- Wöhr, M., Oddi, D., and D'Amato, F. R. (2010). "Effects of altricial pup ultrasonic vocalization on maternal behavior," in *Handbook of mammalian vocalization. An integrative neuroscience approach*, ed. S. M. Brudzynski (Amsterdam, The Netherlands: Elsevier - Academic Press), 159–166.
- Wöhr, M., Rippberger, H., Schwarting, R. K. W., and van Gaalen, M. M. (2015). Critical involvement of 5-HT_{2C} receptor function in amphetamine-induced 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Psychopharmacology* 232, 1817–1829.
- Wöhr, M., and Schwarting, R. K. W. (2007). Ultrasonic communication in rats: Can playback of 50-kHz calls induce approach behavior? *PLoS One* 2, e1365.
- Wöhr, M., and Schwarting, R. K. W. (2008a) Maternal care, isolation-induced infant ultrasonic calling, and their relations to adult anxiety-related behavior in the rat. *Behav. Neurosci.* 122, 310–330.
- Wöhr, M., and Schwarting, R. K. W. (2008b) Ultrasonic calling during fear conditioning in the rat: noevidence for an audience effect. *Anim. Behav.* 76, 749–760.
- Wöhr, M., and Schwarting, R. K. W. (2009). Ultrasonic communication in rats: Effects of morphine and naloxone on vocal and behavioral responses to playback of 50-kHz vocalizations. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 94, 285–295.
- Wöhr, M., and Schwarting, R. K. W. (2010). „Activation of limbic system structures by replay of ultrasonic vocalization in rats,“ in *Handbook of mammalian vocalization. An integrative neuroscience approach*, ed. S. M. Brudzynski (Amsterdam, The Netherlands: Elsevier - Academic Press), 113–124.
- Wöhr, M., and Schwarting, R. K. W. (2012). Testing social acoustic memory in rats: Effects of stimulus configuration and long-term memory on the induction of social approach behavior by appetitive 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Neurobiol. Learn. Mem.* 98, 154–164.
- Wöhr, M., and Schwarting, R. K. W. (2013). Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. *Cell Tissue Res.* 354, 81–97.
- Wongwitdecha, N., and Marsden, C. A. (1996). Social isolation increases aggressive behaviour and alters the effects of diazepam in the rat social interaction test. *Behav. Brain Res.* 75, 27–32.
- Wright, I. C., Rabe-Hesketh, S., Woodruff, P. W., David, A. S., Murray, R. M., and Bullmore, E. T. (2000). Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 157, 16–25.
- Wright, I. K., Upton, N., and Marsden, C. A. (1991). Resocialisation of isolation-reared rats does not alter their anxiogenic profile on the elevated X-maze model of anxiety. *Physiol. Behav.* 50, 1129–1132.

[X]

[Y]

- Yang, M., Perry, K., Weber, M. D., Katz, A. M., and Crawley, J. N. (2011). Social peers rescue autism-relevant sociability deficits in adolescent mice. *Autism Res.* 4, 17–27.
- Yates, J. R., Beckmann, J. S., Meyer, A. C., and Bardo, M.T. (2013). Concurrent choice for social interaction and amphetamine using conditioned place preference in rats: Effects of age and housing condition. *Drug Alcohol Depend.* 129, 240–246.
- Yee, N., Schwarting, R. K. W., Fuchs, E., and Wöhr, M. (2012a). Juvenile stress potentiates aversive 22-kHz ultrasonic vocalizations and freezing during auditory fear conditioning in adult male rats. *Stress* 15, 533–544.
- Yee, N., Schwarting, R. K. W., Fuchs, E., and Wöhr, M. (2012b). Increased affective ultrasonic communication during fear learning in adult male rats exposed to maternal immune activation. *J. Psychiatr. Res.* 46, 1199–1205.
- Young, J. W., Powell, S. B., Risbrough, V., Marston, H. M., and Geyer, M. A. (2009). Using the MATRICS to guide development of a preclinical cognitive test battery for research in schizophrenia. *Pharmacol. Ther.* 122, 150–202.

[Z]

- Ziegler, M., and Lincoln, T. M. (2012). „Schizophrenie,” in *Klinische Psychologie und Psychotherapie für Bachelor*, Bd. 1, eds. M. Berking, and W. Rief (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), 153–162.

DANKSAGUNG

Wenn ein derart großes und langes Projekt abgeschlossen wird und man die Zeit noch einmal Revue passieren lässt, stellt man fest, dass es viele Menschen gibt, denen man zu Dank verpflichtet ist. Natürlich ist eine Dissertation nie das Werk einer einzelnen Person, weshalb ich an dieser Stelle allen Menschen danken möchte, die mich unterstützend auf meinem Weg zu diesem Ziel begleitet haben.

Ich bedanke mich besonders herzlich bei Dr. Markus Wöhr für die Einführung in die Welt der Ultraschallkommunikation bei Ratten und die große Möglichkeit, eines Deiner Projekte zu übernehmen. Deine ausgezeichnete Betreuung, Deine wertvollen Ratschläge und unsere Diskussionen haben meinen wissenschaftlichen Werdegang maßgeblich geprägt.

Im selben Atemzug möchte ich mich auch sehr herzlich bei Prof. Dr. Rainer Schwarting bedanken. Danke, dass Du es mir ermöglicht hast, ein Teil Deiner Arbeitsgruppe zu sein. Von Deiner Erfahrung und großen Unterstützung, sei es durch Projektbesprechungen, persönliche Ratschläge oder das Fördern zahlreicher Teilnahmen an wissenschaftlichen Tagungen, habe ich enorm profitiert.

Ein großer Dank für die Übernahme des Zweitgutachtens geht an Prof. Dr. Markus Fendt, der bereits während meiner Studienzeit mein Interesse an der Verhaltensforschung verstärkte.

Ebenfalls besonders herzlich möchte ich mich bei Henrike Rippberger bedanken, die in meinen Projekten als HiWine begann und als Diplom-Psychologin endete und somit eine sehr wichtige Stütze bei den Versuchen gewesen ist.

An dieser Stelle sei nun der gesamten AG Verhaltensneurowissenschaft für die schöne Zeit, wohltuende Ablenkung, Unterstützung und interessante Diskussionen sowie allen weiteren Personen gedankt, die auf irgendeine Art und Weise an meinen Projekten beteiligt waren: Alex, Andrea, Britta, Christian, Christoph, Clara, Claudia, Jakob, Janine, Juan Carlos, Jochen, Jörg, Julius, Katharina, Kati, Kerstin, Laura, Liana, Luan, Maria, Marine, Martin, Martina, Moria, Natalie, Özge, Peter, Rui, Sebastian, Thede, Theresa, Tobias, Tobias und Verena.

Zu guter Letzt gilt ein riesiger Dank meiner Familie für ihre ausnahmslose Unterstützung und unerschöpfliche Geduld. Besonders meinen Eltern, meiner Frau Sabine und meinen Kindern Loreen und Ariane.

CURRICULUM VITAE

Diplom-Biologe Dominik Seffer

CURRICULUM VITAE

Die Seite 111 enthält persönliche Daten und ist deshalb nicht Teil der elektronischen Publikation.

Die Seite 112 enthält persönliche Daten und ist deshalb nicht Teil der elektronischen Publikation.

Die Seite 113 enthält persönliche Daten und ist deshalb nicht Teil der elektronischen Publikation.

Publikationen in Fachzeitschriften

- [1] Willadsen M, Seffer D, Schwarting RKW & Wöhr M. (2014). Rodent ultrasonic communication: Male pro-social 50-kHz ultrasonic vocalizations elicit social approach behavior in female rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of Comparative Psychology**, 128, 56-64.

- [2] Seffer D, Schwarting RKW, Wöhr M. (2014). Pro-social ultrasonic communication in rats: Insights from playback studies. **Journal of Neuroscience Methods**, 234, 73-81.
- [3] Valluy J, Bicker S, Aksoy-Aksel A, Lackinger M, Sumer S, Fiore R, Wüst T, Seffer D, Metge F, Dieterich C, Wöhr M, Schwarting RWW & Schratt G. (2015). A coding-independent function of an alternative Ube3a transcript during neuronal development. **Nature Neuroscience**, 9:102.
- [4] Seffer D, Rippberger, H, Schwarting RKW & Wöhr M (2015). Pro-social 50-kHz ultrasonic communication in rats: Post-weaning but not post-adolescent social isolation leads to social impairments - phenotypic rescue by re-socialization. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 18, 666-673.

Posterpräsentationen

- [1] Ehbauer, N., Seffer, D., Wiener, J.M. & Mallot, H.A. (2006). Path planning and optimization in the traveling salesman problem. *Neunte Tübinger Wahrnehmungskonferenz (TWK)*, Tübingen, Deutschland
- [2] Seffer, D., Ehbauer, N., Wiener, J.M. & Mallot, H.A. (2008). Path planning and optimization in the traveling salesman problem. *Interdisziplinäres Kolleg (IK)*, Günne, Deutschland
- [3] Seffer, D., Thiele, J., Wiener, J.M. & Mallot, H.A. (2009). Place learning vs. route learning in rodents - An operational approach. *Interdisziplinäres Kolleg (IK)*, Günne, Deutschland
- [4] Seffer, D., Thiele, J., Wiener, J.M. & Mallot, H.A. (2009). Place learning vs. route learning in rodents - An operational approach. *8th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society (NWG)*, Göttingen, Deutschland
- [5] Seffer, D., Renninger, C., Schwarting, R.K.W. & Wöhr, M. (2010). Ultrasonic communication in rats: No induction of social approach behavior by playback of 50-kHz calls in rats exposed to post-weaning social isolation. *EMBO|EMBL Symposium: Structure and Function of Neuronal Circuits*, Heidelberg, Deutschland
- [6] Seffer, D., Renninger, C., Schwarting, R.K.W. & Wöhr, M. (2011). Ultrasonic communication in rats: Effects of post-weaning social isolation on social approach behavior and brain activity in response to playback of 50-kHz calls in the rat. *9th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society (NWG)*, Göttingen, Deutschland
- [7] Seffer, D., Renninger, C., Schwarting, R.K.W. & Wöhr, M. (2011). Ultrasonic communication in rats: Effects of post-weaning social isolation on social approach behavior and brain activity in response to playback of 50-kHz calls in the rat. *Interdisziplinäres Kolleg (IK)*, Günne, Deutschland
- [8] Wöhr, M., Seffer, D., Renninger, C. & Schwarting, R.K.W. (2011). Ultrasonic communication in rats: Effects of post-weaning social isolation on social approach behavior and brain activity in response to playback of appetitive calls. *Annual Meeting of the Society for Neuroscience (SfN)*, Washington, DC, USA
- [9] Seffer, D., Renninger, C., Schwarting, R.K.W. & Wöhr, M. (2012). Ultrasonic communication in rats: Effects of post-weaning social isolation on social approach behavior and brain activity in response to playback of appetitive calls. *Tag der Wissenschaft des Graduiertenzentrums für Lebens- und Naturwissenschaften*, Marburg, Deutschland
- [10] Rippberger, H., Engelhardt, K.-A., Schwarting, R.K.W., Wöhr, M. & Seffer, D. (2012). Ultrasonic communication in rats: Post-weaning but not post-adolescence social isolation leads

to social impairments - phenotypic rescue by re-socialization. *Social Neuroscience in Rodents: Behavior and Communication from Pups to Adults – NWG Workshop*, Marburg, Deutschland

- [11] Seffer, D., Rippberger, H., Schwarting, R.K.W. & Wöhr, M. (2012). Ultrasonic communication in rats: Post-weaning but not post-adolescence social isolation leads to social impairments - phenotypic rescue by re-socialization. *Annual Meeting of the Society for Neuroscience (SfN)*, New Orleans, USA
- [12] Seffer, D., Rippberger, H., Kircher, T., Krug, A., Schwarting, R.K.W. & Wöhr, M. (2013). Oldie but Goldie? Advanced paternal age increases the offspring's risk of developing neuropsychiatric phenotypes. *Tag der Wissenschaft des Graduiertenzentrums für Lebens- und Naturwissenschaften*, Marburg, Deutschland
- [13] Seffer, D., Rippberger, H., Schwarting, R.K.W. & Wöhr, M. (2013). Impact of social experience on rat social approach behavior induced by 50-kHz ultrasonic vocalizations serving a pro-social communicative function. *10th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society (NWG)*, Göttingen, Deutschland
- [14] Seffer, D., Rippberger, H., Schwarting, R.K.W. & Wöhr, M. (2013). Pro-social ultrasonic communication in rats: Social-communication deficits after post-weaning but not post-adolescence social isolation - phenotypic rescue by re-socialization. *22nd Meeting of the International Behavioral Neuroscience Society (IBNS)*, Dublin, Irland
- [15] Rippberger, H., Seffer, D., Kircher, T., Krug, A., Schwarting, R.K.W. & Wöhr, M. (2013). Oldie but Goldie? Advanced paternal age increases the offspring's risk of developing neuropsychiatric phenotypes. *22nd Meeting of the International Behavioral Neuroscience Society (IBNS)*, Dublin, Irland
- [16] Krug, A., Seffer, D., Rippberger, H., Backes, H., Dietsche, B., Schwarting, R.K.W., Kircher, T. & Wöhr, M. (2013). Hohes väterliches Alter als Risikofaktor für Autismus und Schizophrenie: Verhaltenseffekte und neurale Korrelate bei Ratte und Mensch. *DGPPN Kongress*, Berlin, Deutschland
- [17] Krug, A., Seffer, D., Rippberger, H., Dietsche, B., Backes, H., Schneider-Haßloff, H., Schwarting, R.K.W., Kircher, T. & Wöhr, M. (2014). Advanced paternal age as a risk factor for schizophrenia: A translational study in humans and rats. *4th Biennial Schizophrenia International Research Conference*, Florenz, Italien
- [18] Seffer, D., Krug, A., Rippberger, H., Dietsche, B., Backes, H., Schwarting, R.K.W., Kircher, T. & Wöhr, M. (2014). Advanced paternal age as a risk factor for social deficits: From rats to humans. *EMBO conference: Brain development and disorders*, La Ciotat, Frankreich
- [19] Eggebrecht, J.C., Seffer, D., Krug, A., Schwarting, R.K.W., Kircher, T. & Wöhr, M. (2014). Advanced paternal age as a risk factor for autism: Effects on brain morphology. *Social Neuroscience in Rodents: Behavior and Communication from Pups to Adults – NWG Workshop*, Marburg, Deutschland
- [20] Seffer, D., Krug, A., Rippberger, H., Schwarting, R.K.W., Kircher, T. & Wöhr, M. (2014). Advanced paternal age as a risk factor for autism: Comprehensive behavioral characterization of a newly developed rat model. *Social Neuroscience in Rodents: Behavior and Communication from Pups to Adults – NWG Workshop*, Marburg, Deutschland
- [21] Seffer, D., Krug, A., Rippberger, H., Dietsche, B., Backes, H., Schwarting, R.K.W., Kircher, T. & Wöhr, M. (2014). Advanced paternal age as a risk factor for social deficits: From rats to humans. *27th ECNP Congress*, Berlin, Deutschland

- [22] Rippberger, H., Krug, A., Seffer, D., Dietsche, B., Backes, H., Schwarting, R.K.W., Kircher, T. & Wöhr, M. (2014). Oldie but Goldie? Advanced paternal age as a risk factor for social deficits: From rats to humans. *von-Behring-Röntgen-Symposium*, Marburg, Deutschland
- [23] Seffer, D., Krug, A., Eggebrecht, J.C., Rippberger, H., Dietsche, B., Backes, H., Schwarting, R.K.W., Kircher, T. & Wöhr, M. (2015). Advanced paternal age as a risk factor for autism: Effects on behavior and brain morphology in rats and humans. *11th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society (NWG)*, Göttingen, Deutschland
- [24] Seffer, D., Krug, A., Eggebrecht, J.C., Rippberger, H., Dietsche, B., Backes, H., Schwarting, R.K.W., Kircher, T. & Wöhr, M. (accepted). Advanced paternal age as a risk factor for autism: Behavioral and morphological alterations in rats and humans. *Annual Meeting of the Society for Neuroscience (SfN)*, Chicago, USA

Veröffentlichte Abstracts

- [1] Wöhr, M., Seffer, D., Renninger, C. & Schwarting, R.K.W. Ultrasonic communication in rats: Effects of post-weaning social isolation on social approach behavior and brain activity in response to playback of appetitive calls. Program No. 941.05. **2011 Neuroscience Meeting Planner**. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2011. Online.
- [2] Seffer, D., Rippberger, H., Schwarting, R.K.W. & Wöhr, M. Ultrasonic communication in rats: Post-weaning but not post-adolescence social isolation leads to social impairments – phenotypic rescue by re-socialization. Program No. 861.22. **2012 Neuroscience Meeting Planner**. New Orleans, LA: Society for Neuroscience, 2012. Online.
- [3] Krug, A., Seffer, D., Rippberger, H., Dietsche, B., Backes, H., Schneider-Haßloff, H., Schwarting, R.K.W., Kircher, T. & Wöhr, M. (2014). Advanced paternal age as a risk factor for schizophrenia: A translational study in humans and rats. **Schizophrenia Research** **153**, Supplement 1, S94, #S18
- [4] Seffer, D., Krug, A., Rippberger, H., Dietsche, B., Backes, H., Schwarting, R.K.W., Kircher, T. & Wöhr, M. Advanced paternal age as a risk factor for social deficits: From rats to humans. **European Neuropsychopharmacology**, Volume 24, Supplement 2, Page S284-S285 (October 2014), Abstracts of the 27th ECNP Congress, Berlin, Deutschland

Buchkapitel

- [1] Seffer, D., Schwarting, R.K.W. & Wöhr, M. (2012). Ultrasonic communication in rats: Insights from playback studies. In: *Proceedings of Measuring Behavior 2012*. Spink, A., Grieco, F., Krips, O., Loijens, L., Noldus, L. & Zimmerman, P. (Eds.). Noldus, 143-148.

Vorträge

- [1] Seffer, D., Schwarting, R.K.W. & Wöhr, M. (2011). Ultrasonic communication in rats: Effects of social isolation on social approach behavior and neuronal activity. *Universidade Federal do Parana, Department of Pharmacology*, Curitiba, Brasilien
- [2] Seffer, D., Schwarting, R.K.W. & Wöhr, M. (2012). Ultrasonic communication in rats: Insights from playback studies. *Measuring Behavior 2012*, Utrecht, Niederlande
- [3] Schwarting, R.K.W., Seffer, D., & Wöhr, M. (2013). Analyse funktionaler Defizite bei Tiermodellen psychiatrischer Erkrankungen. *Vortrag im Rahmen des Psychiatrisch-Psychotherapeutischen Kolloquiums, Zentrum für Psychische Gesundheit, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie*, Marburg, Deutschland

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**„Ultraschallkommunikation bei Ratten:
Soziale Isolation als Risikofaktor für neuropsychiatrische
Erkrankungen mit defizitärem Sozialverhalten im Tiermodell“**

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Ort, Datum

Unterschrift