

**SOZIALE UND AGONISTISCHE KONFRONTATIONEN  
ZWISCHEN MÄNNLICHEN DARK AGOUTI RATTEN:  
NEURONALE AKTIVIERUNG IN LIMBISCHEN HIRNGEBIETEN  
UND AUSWIRKUNGEN AUF DIE 5-HT<sub>1A</sub>-REZEPTORDICHTE**

---

Aus dem Institut für Hirnforschung I, Abteilung Verhaltensphysiologie und  
Entwicklungsneurobiologie

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich 2 (Biologie/Chemie) der Universität Bremen

von

**CAROLIN ARLT**

im Mai 2013

**Dissertationskolloquium 12.07.2013**

**1. Gutachter: Prof. Dr. Ursula Dicke**

**2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Koch**

*Für meine Eltern*

### **Erklärung**

Die Untersuchungen, auf denen die hier vorliegende Dissertation beruht, habe ich selbstständig geplant, durchgeführt und ausgewertet. Lediglich einige praktische Teile einzelner Studien wurden von Bachelorstudenten unter meiner Supervision im Rahmen meines Lehrauftrages in der Arbeitsgruppe ausgeführt. Die enthaltenden Manuskripte habe ich eigenständig verfasst und lediglich die endgültige Fassung mit meiner Betreuerin und Mitautorin, Frau Prof. Dr. Ursula Dicke, überarbeitet. Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen aus den angegebenen Quellen sind kenntlich gemacht.

(Carolin Arlt)

Bremen, 31.05.2013

## Liste der Manuskripte

Im Folgenden sind die Manuskripte auf denen die vorliegende Dissertation beruht aufgelistet. Artikel werden in internationalen neurowissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht.

### Artikel

**Arlt C**, Baeckermann S, Dicke U. Behavior in inter-male encounters is associated with increased c-Fos activation in the frontal cortex and the central and basolateral amygdaloid nuclei of Dark Agouti rats. Behav Brain Res. 2013. (Under revision).

**Arlt C**, Dicke U. Increased 5-HT<sub>1A</sub> receptor density in the neuronal network involved in regulation of stress responses in Dark Agouti rats after repeated territorial intrusion. (To be submitted).

**Arlt C**, Dicke U. Social instigation leads to extended aggressive behavior but not to escalated aggression and increases the Fos activation in neuronal networks of stress coping in Dark Agouti rats. (In preparation).

### Posterpräsentation

7<sup>th</sup> Forum of European Neuroscience, Amsterdam, The Netherlands:

**Arlt C**, Menken L, Baeckermann S, Dicke U. Highly aggressive behavior in rats of the Dark Agouti inbred strain.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Allgemeine Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Territoriales Verhalten .....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Resident-Intruder-Test .....	2
<b>1.2 Eskalierte Aggression.....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Soziale <i>Instigation</i> .....	4
<b>1.3 Hirngebiete.....</b>	<b>6</b>
1.3.1 Orbitofrontaler Kortex.....	6
1.3.2 Medialer präfrontaler Kortex.....	7
1.3.3 Lateraler präfrontaler Kortex.....	7
1.3.4 Septum.....	8
1.3.5 Nucleus accumbens .....	9
1.3.6 Amygdala .....	9
<b>1.4 Serotonin .....</b>	<b>11</b>
1.4.1 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor .....	12
<b>2. Zielsetzung und Zusammenfassung.....</b>	<b>14</b>
2.1 Studie 1 .....	14
2.2 Studie 2 .....	15
2.3 Studie 3 .....	16
<b>3. Behavior in inter-male encounters is associated with increased c-Fos activation in the frontal cortex and the central and basolateral amygdaloid nuclei of Dark Agouti rats .....</b>	<b>18</b>
3.1 Abstract .....	18
3.2 Introduction .....	18
3.3 Material and methods .....	20
3.3.1 Animals .....	20
3.3.2 Experimental design.....	21
3.3.3 Analysis of behavior.....	22
3.3.4 Histological processing of brains .....	23
3.3.5 Quantification of c-Fos-immunopositive nuclei .....	24

3.3.6 Statistical analysis .....	24
<b>3.4 Results .....</b>	<b>27</b>
3.4.1 Behavior in the resident-intruder test .....	27
3.4.2 Distribution of c-Fos labeling in limbic telencephalic centers.....	29
3.4.2.1 C-Fos labeling in limbic cortical areas.....	30
3.4.2.2 C-Fos labeling in the septum, nucleus accumbens, and amygdala .....	33
<b>3.5. Discussion .....</b>	<b>34</b>
3.5.1 Behavior in the resident-intruder test .....	35
3.5.2 Distribution of c-Fos labeling in limbic telencephalic centers.....	37
3.5.2.1 Contribution of test condition .....	37
3.5.2.2 Impact of social and agonistic encounters.....	38
3.5.2.2.1 Orbitofrontal cortex.....	38
3.5.2.2.2 Medial prefrontal cortex.....	39
3.5.2.2.3 Insular cortex.....	40
3.5.2.2.4 Amygdaloid region.....	41
<b>4. Increased 5-HT<sub>1A</sub> receptor density in the neuronal network involved in regulation of stress responses in Dark Agouti rats after repeated territorial intrusion.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Abstract .....</b>	<b>43</b>
<b>4.2 Introduction .....</b>	<b>43</b>
<b>4.3 Material and methods .....</b>	<b>46</b>
4.3.1 Animals .....	46
4.3.2 Experimental design.....	46
4.3.3. Analysis of behavior.....	47
4.3.4 Histological processing of brains .....	48
4.3.5 Quantification of 5-HT <sub>1A</sub> receptor protein staining .....	48
4.3.6 Statistical analysis .....	50
<b>4.4 Results .....</b>	<b>51</b>
4.4.1 Offensive behavior in the resident-intruder test.....	51
4.4.2 5-HT <sub>1A</sub> receptor density in limbic centers.....	53
<b>4.5 Discussion.....</b>	<b>56</b>
<b>5. Die soziale <i>Instigation</i> führt zu erhöhter Aggressivität ohne eskalierte Aggressionsmuster und steigert die Fos-Aktivierung im neuronalen Netzwerk der Stressbewältigung.....</b>	<b>63</b>

---

<b>5.1 Zusammenfassung</b> .....	63
<b>5.2 Einleitung</b> .....	64
<b>5.3 Material und Methoden</b> .....	66
5.3.1 Versuchstiere.....	66
5.3.2 Versuchsaufbau.....	67
5.3.3 Verhaltensanalyse.....	70
5.3.4 Histologische Aufarbeitung der Gehirne.....	70
5.3.5 Quantifikation der c-Fos-positiven Zellkerne.....	71
5.3.6 Statistische Analyse.....	72
<b>5.4 Ergebnisse</b> .....	73
5.4.1 Aggressives Verhalten der Provokations-Gruppe im <i>Resident-Intruder</i> -Test.....	73
5.4.1.1 Aggressives Verhalten innerhalb der drei Versuchswochen.....	73
5.4.1.2 Vergleich des aggressiven Verhaltens der Provokations-Gruppe zwischen den drei Versuchswochen.....	75
5.4.1.3 Vergleich des aggressiven Verhaltens der RI-Gruppe/Studie 1 und der Provokations-Gruppe im letzten RI-Test.....	76
5.4.2 Verteilung von c-Fos-positiven Zellkernen in limbischen telenzephalen Hirngebieten.....	77
<b>5.5 Diskussion</b> .....	80
5.5.1 Auswirkungen der Provokationsphase.....	81
5.5.2 Verteilung der c-Fos-positiven Zellkerne.....	83
5.5.2.1 Orbitofrontaler Kortex.....	83
5.5.2.2 Agranulärer insulärer Kortex.....	84
5.5.2.3 Septum.....	85
5.5.2.4 Mediale Amygdala.....	86
<b>6. Allgemeine Diskussion</b> .....	<b>88</b>
<b>6.1 Territoriales Verhalten männlicher Dark Agouti Ratten</b> .....	88
<b>6.2 C-Fos-Aktivierung und Änderungen der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptordichte in limbischen telenzephalen Hirnarealen</b> .....	90
<b>6.3 Schlussfolgerung und Ausblick</b> .....	94
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>96</b>
<b>8. Danksagung</b> .....	<b>107</b>



## 1. Allgemeine Einleitung

Das Zusammenleben von mehreren Individuen, sei es in einer Familie, Herde oder Kolonie, beruht auf sozialen speziesspezifischen Regeln. Auch das aggressive Verhalten wird von solchen Regeln bestimmt. Zur Sicherung von lebensnotwendigen Ressourcen wie Nahrung und Schlafplätzen, zum Schutz der Jungen oder des Territoriums ebenso wie zum Erlangen und Erhalten eines sozialen Status kommt es zur Ausübung von Aggressionen. Dabei handelt es sich laut Definition um jedes Verhalten, das darauf abzielt anderen Schaden zuzufügen um selbst einen Vorteil daraus zu ziehen (Benus et al., 1991; Bushman und Anderson, 2001). Die speziesspezifischen Regeln sorgen dafür, dass das Risiko von ernsthaften Verletzungen möglichst gering gehalten wird (Martinez et al., 2002); beim Menschen scheinen diese Regeln jedoch häufig fehlzuschlagen. Über eine Million Menschen sterben jährlich aufgrund von selbst beigebrachter, zwischenmenschlicher oder kollektiver Gewalt (Dahlberg und Krug, 2002). Dies und die Tatsache, dass aggressives Verhalten eng mit Psychopathologien wie Depressionen, Angststörungen und Substanzmissbrauch verbunden ist (Cerdá et al., 2012), haben dazu geführt, dass die Aggressionsforschung ein bedeutender wissenschaftlicher Bereich geworden ist.

Aggressives Verhalten teilt sich in zwei Klassen auf: die impulsive und die nicht-impulsive Aggressionsklasse. Während es sich bei nicht-impulsiver Aggression um geplante Taten handelt, die auch als ‚kaltblütig‘ bezeichnet werden, handelt es sich bei der impulsiven Aggression um ungeplante, spontane Taten, die sowohl provoziert als auch unprovoziert sein können (Barrat et al., 1999). Zur impulsiven Aggression zählt auch die territoriale Aggression, die in den meisten tierexperimentellen Studien untersucht wird.

## 1.1 Territoriales Verhalten

Im Tierreich verteidigen Männchen ihr Territorium gegen Konkurrenten, um Ressourcen zu sichern, die mögliche Sexualpartner anziehen. Es wird versucht den maximalen Gewinn bei möglichst geringem Einsatz zu erzielen. Um Verletzungen zu vermeiden, werden aggressive Aktionen meist durch weniger gefährliche ritualisierte Verhaltensweisen ersetzt. Des Weiteren werden die dabei ausgeführten aggressiven Drohungen und Handlungen immer wieder durch Pausen unterbrochen, um den Energieverlust zu verringern. Die territoriale Aggression ist somit ein biologisch adaptives Verhalten (Miczek et al., 2002; de Almeida, 2005; Haller und Kruk, 2006), das bedingt durch die soziale Struktur variieren kann. Dies ist auch bei Ratten und Mäusen, die hauptsächlich zur Erforschung aggressiven Verhaltens eingesetzt werden, der Fall. Während Mäuse dispersiv in Territorien leben, bilden Ratten geschlossene Kolonien. Das Zusammenleben in einer Kolonie beruht auf einer dominanten Hierarchie, welche die soziale Situation und Reproduktion einzelner Individuen festlegt. Im Zusammenhang mit der Rangordnung kommt es immer wieder zu aggressivem Verhalten innerhalb der Kolonie. Hierbei handelt es sich um ritualisierte Verhaltensweisen, die schon während der Adoleszenz beim so genannten ‚*Play fighting*‘ einstudiert werden (Miczek et al., 2003; Miczek et al., 2004; de Almeida, 2005). Bei Ratten spricht man daher häufig auch von dominanter Aggression. Allerdings verteidigen Ratten wie Mäuse ihr Territorium gegen Eindringlinge; sie zeigen also ebenfalls territoriale Aggression. Dies wird im Rahmen des Bewohner-Eindringling (*Resident-Intruder*; RI) -Test genutzt.

### 1.1.1 Resident-Intruder-Test

Der Standard RI-Test wird zur Untersuchung des offensiven Verhaltens von Nagetieren durchgeführt. In diesem Test werden Männchen entweder isoliert oder gemeinsam mit einem sterilisierten Weibchen in einem so genannten Heimkäfig gehalten, um territoriales Verhalten auszulösen. Nach einer Zeitspanne von mindestens fünf Tagen wird das Weibchen aus dem

Käfig entnommen und der Bewohner in seinem Heimkäfig für 10 min mit einem unbekanntem männlichen Eindringling konfrontiert. Dieser Versuchsaufbau spiegelt die natürliche Situation wider, in welcher Ratten, Mäuse oder Hamster Territorien gründen und verteidigen. Während der 10minütigen Konfrontation mit dem Eindringling kann ein vollständiges Ethogramm des Bewohners erstellt werden. Hierfür werden sämtliche nicht-soziale, soziale und agonistische Verhaltensweisen aufgezeichnet (Koolhaas et al., 1980; Olivier et al., 1995; de Boer et al., 2003; de Boer und Koolhaas, 2005). Anhand der Aufzeichnungen klassifiziert man die Bewohner je nach Verhalten in die wenig, mäßig oder hoch aggressive Aggressionsgruppe. Zum einen kann die Einteilung aufgrund der Dauer des offensiven Verhaltens vorgenommen werden, zum anderen aufgrund des Verhältnisses von Beißattacken zu Drohungen (de Bruin, 1990; Haller et al., 2001; Halász et al., 2002a; de Boer et al., 2003). Des Weiteren kann zwischen der so genannten *state* und *trait* Aggression unterschieden werden. Die *state* Aggression beschreibt ausschließlich den momentanen Zustand, während die *trait* Aggression eine andauernde Charaktereigenschaft widerspiegelt (van der Vegt et al., 2001; van der Vegt et al., 2003a; van der Vegt et al., 2003b). Mit Hilfe des RI-Tests können neben der Untersuchung des natürlichen Verhaltens auch der Einfluss von pharmakologischer oder physiologischer Manipulation auf das soziale oder agonistische Verhalten sowie dessen neuronale Grundlagen erforscht werden. Allerdings weist der RI-Test Grenzen bei der Untersuchung von eskalierter Aggression auf.

## 1.2 Eskalierte Aggression

Verliert das aggressive Verhalten seinen adaptiven Charakter, spricht man von eskalierter oder ‚abnormaler‘ Aggression. Diese geht mit der Missachtung der speziesspezifischen Regeln einher. So kommt es zu Angriffen auf Jungtiere, Weibchen und anästhesierte Artgenossen und zu Beißattacken gegen verletzbare Körperteile wie Kopf, Kehle oder Bauch. Ferner ist die Latenz bis zur ersten Beißattacke stark verkürzt und die Beißattacken treten in einer gesteigerten Frequenz und Intensität auf. Bei der eskalierten Aggression ist die kommunikative Funktion und inhibitorische Kontrolle gestört. Als Folge kommt es zur Missachtung von unterwürfigen Verhaltensweisen und einer Fehlanpassung zwischen Provokation und Reaktion (Miczek et al., 2003; Miczek et al., 2004; Haller und Kruk, 2006). Diese Verhaltensmuster lassen sich bei den gängigen Laborstämmen im RI-Test nicht auslösen, daher wurden verschiedene Nagermodelle zur Untersuchung der eskalierten Aggression etabliert. Bei diesen handelt es sich entweder um spezielle Züchtungen oder um Langzeitmanipulationen des Verhaltens oder der Physiologie (Halász et al., 2002a; Haller et al., 2005; Haller et al., 2006; Halász et al., 2006; Tulogdi et al., 2010; Tóth et al., 2012; Beiderbeck et al., 2012). Des Weiteren kann eskaliertes aggressives Verhalten auch akut pharmakologisch und verhaltens- oder kontextbezogen provoziert werden (de Almeida, 2005). Eine Kombination aus verhaltensbezogener und umfeldbedingter Provokation stellt die soziale *Instigation* dar.

### 1.2.1 Soziale *Instigation*

Die auch als *Attack Priming* bezeichnete soziale *Instigation* ist eine Abwandlung des Standard RI-Tests. Vor der direkten RI-Konfrontation wird der Bewohner mit einem Kontrahenten konfrontiert. Dieser kann gesehen und gerochen, jedoch nicht angegriffen werden. Eine Variante ist die Trennung des Heimkäfigs des Bewohners in zwei unterschiedlich große Kompartimente mittels einer durchsichtigen, perforierten Trennwand. Die Trennwand wird so

eingeführt, dass der Bewohner sich im größeren Kompartiment befindet; der Eindringling wird dann in das kleinere Kompartiment gesetzt. Diese Provokationsphase dauert 5 min, dann wird die Trennwand entfernt und eine 5minütige direkte RI-Konfrontation wird durchgeführt (abgewandelt nach Potegal, 1991; Potegal, 1992; Fish et al., 1999). Die soziale *Instigation* löst bei den Bewohnern eine aggressive Erregtheit (im Englischen ‚*aggressive arousal*‘) aus. Die aggressive Erregtheit ist aggressionsspezifisch, das heißt andere Verhaltensweisen wie das lokomotorische Verhalten, das Fress- oder Sexualverhalten werden nicht beeinflusst (Potegal, 1991; Potegal, 1992; Miczek et al., 2002; Miczek et al., 2003; de Almeida 2005). Es führt sowohl bei Ratten als auch bei Hamstern und Mäusen verlässlich zu einer verkürzten Angriffslatenz, erhöhten Dauer des offensiven Verhaltens und gesteigerter Anzahl von Angriffen bzw. Drohungen. Dabei muss die direkte Konfrontation nicht im Heimkäfig stattfinden; eine Provokationsphase führt auch in unbekannter Umgebung zur Steigerung des aggressiven Verhaltens (Potegal, 1992; Fish et al., 1999). Während die aggressive Erregtheit bei Ratten und Hamstern jedoch nur zu einer Steigerung zu führen scheint, kann sie bei Mäusen Verhaltensmuster der eskalierten Aggression auslösen (Miczek et al., 2002; Miczek et al., 2003).

### 1.3 Hirngebiete

Das Verhalten während einer Konfrontation mit einem unbekanntem Konkurrenten setzt sich aus verschiedenen nicht-sozialen, sozialen und offensiven Verhaltensweisen zusammen, die ihrerseits eine Vielzahl verschiedener Prozesse wie die Verarbeitung von Reizen, die Risiko- und Belohnungsabschätzung und die Entscheidungsfindung beinhalten. Durch diese Komplexität sind verschiedene limbische Hirngebiete während der sozialen und/oder agonistischen Konfrontation aktiviert.

#### 1.3.1 Orbitofrontaler Kortex

Der orbitofrontale Kortex (OFC) setzt sich beim Nagetiergehirn aus dem medialen, ventralen und lateralen orbitalen Kortex zusammen. Er ist beteiligt an der Impulskontrolle sowie der Belohnungsabschätzung und ist zuständig für die emotionale und verhaltensbedingte Flexibilität. Dabei verarbeitet der OFC soziale Reize wie das Dominanzverhalten von Konkurrenten und passt Reaktionen der momentanen Situation an; somit ist er an der Entstehung und Modulation von sozialen Interaktionen beteiligt (Mobini et al., 2002; Blair, 2004; Kolb et al., 2004; Dalley et al., 2004; Cardinal, 2006; Rudebeck et al., 2006; Rempel-Clower, 2007; Roesch et al., 2007; Dalley et al., 2008; Perry et al., 2011; Stopper et al., 2012). Ferner ist der OFC über seine starken inter- und subkortikalen limbischen Verbindungen in die Regulierung von Stressreaktionen involviert (Stevenson und Gratton, 2003; Spencer et al., 2004; Spencer und Day, 2004; Tóth et al., 2010; Hoover und Vertes, 2011). Diese verschiedenen Funktionen sind Bestandteil des offensiven Verhaltens. Während der psychosozialen Konfrontation mit einem Kontrahenten zeigten Ratten und Mäuse eine erhöhte Aktivierung des OFC, die während der direkten agonistischen Konfrontation weiter anstieg (Halász et al., 2006; Haller et al., 2006; Beiderbeck et al., 2012). Läsionen des OFC wiederum führten zu einem gesteigerten aggressiven Verhalten bei Nagern (de Bruin et al.,

1983; Rudebeck et al., 2007). Somit scheint der OFC an der Aggressionsmodulation beteiligt zu sein.

### 1.3.2 Medialer präfrontaler Kortex

Der mediale präfrontale Kortex (mPFC) besteht aus dem prä- und infralimbischen Kortex sowie dem zingulären Kortex (Areal 1 und 2). Er ist an verschiedenen höheren Funktionen wie Lernen, Gedächtnis, selektive Aufmerksamkeit, Entscheidungsfindungen und zielgerichtetem Verhalten beteiligt. Des Weiteren moduliert er autonome und endokrine Stressreaktionen (Dalley et al., 2004; Vertes, 2006; Kim und Haller, 2007; Czéh et al., 2008; Perry et al., 2011). Somit überschneiden sich die Funktionen des OFC und mPFC; dies scheint auch das aggressive Verhalten betreffend der Fall zu sein. Wie beim OFC geht die steigende Aktivierung des mPFC mit gesteigertem aggressiven Verhalten einher; je höher die Aggression, desto höher seine Aktivierung (Halász et al., 2006; Haller et al., 2006; Beiderbeck et al., 2012). Allerdings führen Läsionen des mPFC nicht wie beim OFC zur gesteigerten Aggressivität (de Bruin et al., 1983), sondern zur Beeinträchtigung der Verhaltensanpassung im Rahmen der Konfliktlösung (de Wit et al., 2006; Oualian und Gisquet-Verrier, 2010).

### 1.3.3 Lateraler präfrontaler Kortex

Der dorsale und der ventrale agranuläre insuläre Kortex bilden den lateralen präfrontalen Kortex (lPFC). Auch dieser Teil des frontalen Kortex ist an Reaktionen auf Stress, der Verhaltensinhibition und an Entscheidungsfindungsprozessen beteiligt. Des Weiteren speichert er ängstliche Erinnerungen und steuert die Reaktionsfähigkeit auf aversive und emotionale Reize (Funk und Stewart, 1996; Bruijnzeel et al., 1999; Yokoyama und Sasaki, 1999; Brunzell und Kim, 2001; Dalley et al., 2004; Cardinal, 2006; Rempel-Clower, 2007;

Rodgers et al., 2008; Shin und Liberzon, 2010; Perry et al., 2011). Die Konfrontation mit einem Konkurrenten ist ein aversiver, emotionaler Reiz. Jedoch scheint der IPFC nicht direkt an der Entstehung oder Modulation des aggressiven Verhaltens, sondern eher an der Stressbewältigung, bedingt durch die psychosoziale Konfrontation, beteiligt zu sein (Heidbreder und Groenewegen, 2003; Gabbott et al., 2003; Halász et al., 2006; Beiderbeck et al., 2012).

#### 1.3.4 Septum

Das Septum wird in das mediale und laterale Septum unterteilt. Während das mediale Septum dichte Verbindungen mit dem Hippocampus aufweist, zeigt das laterale Septum stärkere Verbindungen mit limbischen Hirnarealen. Läsionen des Septums führen zu verschiedenen kognitiven Defiziten wie Störungen des Gedächtnisses oder der Aufmerksamkeit und zur Desynchronisation der elektrischen Aktivität des Hippocampus (Wenk, 1997; Leutgeb und Mizumori, 1999; Numann, 2000). Des Weiteren verstärken Läsionen des lateralen Septums das aggressive Verhalten (Annen et al., 1985; Albert et al., 1993; Sheehan et al., 2004). Dies könnte auf die starken Projektionen des lateralen Septums zum hypothalamischen Angriffsareal, welches maßgeblich an der Entstehung von Angriffen beteiligt ist, zurückzuführen sein (Tóth et al., 2010). Nagetiere mit gesteigertem aggressivem Verhalten zeigten eine verringerte Aktivierung des lateralen Septums im Vergleich zu wenig aggressiven Nagetieren (Haller et al., 2006; Beiderbeck et al., 2007), während mäßig aggressive Ratten eine erhöhte Aktivierung des medialen und lateralen Septums zeigten (Halász et al., 2002a). Dies deutet auf einen regulierenden Einfluss des Septums auf das aggressive Verhalten hin.



### 1.3.5 Nucleus accumbens

Der Nucleus accumbens reguliert die Nahrungsaufnahme sowie das motivationale und lokomotorische Verhalten. Er ist an der Modulation des impulsiven Verhaltens und der Belohnungsbewertung beteiligt, indem er emotionale, kontextabhängige, motivationale und kognitive Signale integriert. Der Nucleus accumbens besteht aus zwei Subregionen, dem Kern und der Schale, die sich in Zyto- und Chemoarchitektur sowie Funktionen unterscheiden (Basar et al., 2010). So geht die Aktivierung der Kernregion mit einem gesteigerten Risikoverhalten einher und Läsionen der Kernregion führen zu gesteigertem impulsivem Verhalten; Läsionen der Schalenregion nicht (Cardinal et al., 2001; Pothuizen et al., 2005). Allerdings lassen Manipulationen des noradrenergen Systems darauf schließen, dass die Schalenregion ebenfalls einen Einfluss auf das impulsive Verhalten hat (Robinson et al., 2008). Die Subregionen scheinen somit verschiedene Aspekte derselben Prozesse zu modulieren (Corbit und Balleine, 2011). Belohnung und Motivation sind bedeutende Elemente des impulsiven Verhaltens, welches wiederum mit aggressivem Verhalten im Zusammenhang steht. Die Bezeichnung impulsive Aggression spiegelt diesen Zusammenhang wider. Während des aggressiven Verhaltens wurde eine erhöhte Aktivierung des Nucleus accumbens und eine gesteigerte Dopaminausschüttung beobachtet. Ferner führte die Verabreichung von Dopaminrezeptor-Antagonisten zu einer Verringerung des aggressiven Verhaltens (Miczek et al., 1994; van Erp und Miczek, 2000; Ferrari et al., 2003; Couppis und Kennedy, 2008; Beiderbeck et al., 2012).

### 1.3.6 Amygdala

Die Amygdala setzt sich aus vier Kerngruppen zusammen; der zentralen (autonomes System), medialen (akzessorisch olfaktorisches System), kortikalen und basomedialen (olfaktorisches System) und der lateralen und basolateralen Kerngruppe (frontotemporales kortikales

System). Insgesamt beinhaltet die Amygdala mehr als 10 Kerne mit unterschiedlicher Konnektivität sowie Zyto- und Chemoarchitektur. Die verschiedenen Kerngebiete sind in zahlreiche unterschiedliche, teils überschneidende Funktionen wie Stressreaktionen, das Paarungsverhalten und die Impulskontrolle involviert (Pitkänen, 2000; Barton et al., 2003). Im Zusammenhang mit dem aggressiven Verhalten werden meist die zentrale und mediale Amygdala genannt. Die zentrale Amygdala scheint hauptsächlich bei eskalierendem aggressivem Verhalten von Bedeutung zu sein. Im Vergleich zu wenig aggressiven Tieren wurde bei Mäusen und Ratten eine gesteigerte Aktivierung der zentralen Amygdala nach abnormalen Attacken gefunden (Halász et al., 2002a; Haller et al., 2006; Veenema und Neumann, 2007; Neumann et al., 2010; Marquez et al., 2013). Die mediale Amygdala hingegen scheint eher an der Modulation der ‚normalen‘ Aggression beteiligt zu sein. Sie weist starke Verbindungen mit dem hypothalamischen Angriffsareal auf und zeigt eine erhöhte Aktivierung bei Aggressionen ohne Verhaltensmuster der eskalierten Aggression (Siegel et al., 1999; Halász et al., 2002b; Haller et al., 2006; Veenema und Neumann, 2007; Tóth et al., 2010).

Welche Hirngebiete während des territorialen Verhaltens aktiv sind, lässt sich mittels immunhistochemischem Nachweis des *Immediate Early Genes* c-Fos analysieren. C-Fos ist ein anerkannter Marker zur Untersuchung von neuronalen Aktivierungsmustern, die durch verschiedene Erlebnisse wie Stress, Sexualverhalten oder auch aggressives Verhalten ausgelöst werden (Sagar et al., 1988; Hughes und Dragunow, 1995; Halász et al., 2002a; Salomé et al., 2004; Halász et al., 2006; Haller et al., 2006; Halász et al., 2008; Ball und Balthazart, 2010; Tulogdi et al., 2010; Miczek et al., 2011).

## 1.4 Serotonin

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) wird mit nahezu jeder physiologischen und verhaltensbezogenen Funktion in Zusammenhang gebracht und Störungen des serotonergen Systems führen zu einer Vielzahl von psychiatrischen Erkrankungen wie Depressionen, Angststörungen und Schizophrenie (Aghajanian und Sanders-Bush, 2002; Sari, 2004). Auch in der Neurobiologie des aggressiven Verhaltens spielt 5-HT eine bedeutende Rolle. Es scheint sowohl in die offensive und defensive als auch in die räuberische Aggression involviert zu sein (Olivier et al., 1995; Miczek et al., 2007). Das Indolamin 5-HT gehört neben Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin zur Gruppe der Monoamine. Es wird durch das Enzym Tryptophan-Hydroxylase aus der Aminosäure L-Tryptophan synthetisiert und primär zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) abgebaut (Saxena, 1995). Die Synthese von 5-HT findet in den Zellen des dorsalen und medialen Raphekerns im Hirnstamm statt. Von hier aus projizieren die aufsteigenden serotonergen Neurone zu an motorischen Funktionen beteiligte Regionen wie die Substantia nigra, die Basalganglien und das Zerebellum, zu dem limbischen System und fast den gesamten Kortex. Der kaudale Raphekern hingegen sendet absteigende Projektionen zum Rückenmark (Tork, 1990; Hensler, 2006). Im Zusammenhang mit aggressivem Verhalten ist die so genannte Serotonin-Defizit-Hypothese entstanden. Diese besagt, dass das aggressive *trait* Verhalten mit einer verringerten 5-HT-Neurotransmission verbunden ist (Berman et al., 1997; de Boer und Koolhaas, 2005). Solch verminderte 5-HT-Aktivierung wurde zum Beispiel im präfrontalen Kortex, Septum, Nucleus accumbens und der Amygdala gefunden (Blanchard et al., 1991; Blanchard et al., 1993; de Almeida und Lucion, 1997; van Erp und Miczek, 2000; de Boer et al., 2003; Ferrari et al., 2003; Caramaschi et al., 2007; Takahashi et al., 2011). Allerdings wurden auch gegenteilige Beobachtungen gemacht. So zeigten serotonerge Rapheneurone eine erhöhte Aktivierung während des aggressiven Verhaltens (van der Vegt et al., 2003a). Diese komplexe Wirkung von 5-HT könnte durch die mindestens 17 verschiedenen Rezeptorsubtypen entstehen. Die 5-

HT-Rezeptoren werden aufgrund ihrer strukturellen, biochemischen und pharmakologischen Eigenschaften in sieben verschiedene Gruppen eingeteilt (5-HT<sub>1</sub> – 5-HT<sub>7</sub>), die wiederum meist mehrere Subtypen haben (Barnes und Sharp, 1999).

#### 1.4.1 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor

Ein Subtyp der 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptorgruppe ist der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor. Dieser kommt sowohl als präsynaptischer Autorezeptor auf serotonergen Neuronen in den Raphekernen vor als auch in telencephalen serotonergen Projektionsarealen als postsynaptischer Heterorezeptor. Die Aktivierung des Autorezeptors durch 5-HT oder 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten führt zur direkten Inhibition der serotonergen Neurone (de Vry, 1995). Die Aktivierung der postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren führt hingegen zur Hyperpolarisation des postsynaptischen Neurons und somit zu einer verringerten Feuerrate dieser Zelle; der letztendliche Effekt hängt von der Zielzelle ab (Hamon et al., 1990). Neben der kurzen negativen Feedbackschleife der Autorezeptoren scheinen die postsynaptischen Heterorezeptoren eine lange negative Feedbackschleife zu bilden (Hamon et al., 1990; de Vry, 1995; Hajos et al., 1999; Pineyro und Blier, 1999). So wurde der inhibitorische Effekt einer 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoragonist-Administration in den dorsalen Raphekern durch die Entfernung des mPFC abgeschwächt (Hajos et al., 1999). Ferner führte die Applikation von 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten in den mPFC zu einer verringerten Feuerrate von serotonergen Neuronen und einem sinkenden extrazellulären 5-HT-Level im dorsalen Raphekern (Pineyro und Blier, 1999). Demzufolge scheint die Aktivierung beider Rezeptoren zu einer verringerten 5-HT-Neurotransmission zu führen. Bezogen auf das aggressive Verhalten haben sowohl spezifische prä- und postsynaptische als auch unspezifische 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoragonisten einen aggressionsmildernden Effekt (Olivier et al., 1995; Miczek et al., 1998; de Boer et al., 1999; de Boer und Koolhaas, 2005), wobei sie häufig auch andere Verhaltensweisen wie die soziale und nicht-soziale Exploration beeinflussen (Olivier, 2004). Auch die Sensitivität und Dichte der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren ebenso

wie die mRNA-Expression scheinen Auswirkungen auf das aggressive Verhalten zu haben. Speziell gezüchtete hoch aggressive Mäuse haben im Vergleich zu wenig aggressiven Mäusen eine höhere 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorfunktion (Korte et al., 1996; Veenema et al., 2005; Caramaschi et al., 2007). Des Weiteren zeigen aggressive nicht speziell gezüchtete Ratten und Mäuse mit einer durch Alkohol gesteigerten Aggression eine höhere Sensitivität des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors im Vergleich zu wenig aggressiven Ratten und Mäusen (van der Vegt et al., 2001; Chiavegatto et al., 2010).

## 2. Zielsetzung und Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem territorialen Verhalten männlicher Ratten des Dark Agouti Stammes. In Studie 1 sollte untersucht werden, ob die nicht selektierten Ratten dieses Stammes individuelle Unterschiede im aggressiven Verhalten, inklusive gesteigerter Aggression, zeigen und ob diese Unterschiede konstant sind oder über die Zeit variieren. Des Weiteren sollte analysiert werden, welche neuronalen Netzwerke während sozialer und/oder agonistischer Konfrontationen aktiviert sind und ob sich die individuellen Unterschiede im territorialen Verhalten in der c-Fos-Anfärbung widerspiegeln. Studie 2 behandelt die Dichte des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors in limbischen telenzephalen Hirngebieten und dem dorsalen Raphekern in Gehirnen von männlichen Dark Agouti Ratten. Es sollte geklärt werden, ob die Erfahrung von sozialen und/oder agonistischen Konfrontationen zu Änderungen in der Dichte der Rezeptoren führen und ob diese Änderungen auf die Konfrontation selbst oder die offensiven Reaktionen zurückzuführen sind. In Studie 3 sollte untersucht werden, ob die soziale *Instigation* bei einem Rattenstamm mit hoch aggressiven Individuen zu Aggressionsmustern der eskalierten Aggression führt. Des Weiteren sollte der Einfluss der sozialen *Instigation* auf die neuronale Aktivierung von limbischen telenzephalen Hirngebieten analysiert werden.

### 2.1 Studie 1

*“Behavior in inter-male encounters is associated with increased c-Fos activation in the frontal cortex and the central and basolateral amygdaloid nuclei of Dark Agouti rats”*

untersucht das territoriale Verhalten männlicher Dark Agouti Ratten. Hierfür wurden die Bewohner eines Territoriums an vier aufeinander folgenden Tagen in einem Bewohner-Eindringling-Test mit einem unbekanntem Eindringling konfrontiert. Des Weiteren wurde der Einfluss des momentanen Verhaltens im letzten RI-Test auf die c-Fos-Expression in limbischen Hirngebieten untersucht.

Der Vergleich zwischen den Bewohnern zeigte Unterschiede in der Intensität und Dauer des offensiven Verhaltens. Beruhend auf der Dauer des aggressiven Verhaltens wurden die Bewohner drei verschiedenen Aggressionsklassen zugeordnet; der wenig aggressiven (< 15% der Zeit aggressiv), der mäßig aggressiven (15-55% der Zeit) und der hoch aggressiven Klasse (> 55% der Zeit). Neben den individuellen Unterschieden zeigten die Bewohner auch intraindividuelle Unterschiede; nur ein Bewohner konnte an allen vier Versuchstagen der gleichen Aggressionsklasse zugeordnet werden. Die Analyse der c-Fos-Anfärbung zeigte eine signifikant gesteigerte c-Fos-Expression im orbitofrontalen, medialen präfrontalen und insulären Kortex sowie der zentralen und basolateralen Amygdala der Bewohner im Vergleich zu Kontrollratten ohne vorherige Konfrontation. Der Vergleich aggressiver und nicht-aggressiver Bewohner ergab keinen signifikanten Unterschied der c-Fos-Aktivierung.

Abschließend lässt sich sagen, dass sich die individuell variierende territoriale Aggression der Bewohner nicht in der c-Fos-Expression widerspiegelt. Das erhöhte c-Fos-Signal der Bewohner ist somit am ehesten auf die Konfrontation selbst und nicht auf die offensiven oder passiven Reaktionen des Bewohners auf den Eindringling zurückzuführen.

## **2.2 Studie 2**

*“Increased 5-HT<sub>1A</sub> receptor density in the neuronal network involved in regulation of stress responses in Dark Agouti rats after repeated territorial intrusion”* untersucht den Einfluss von vier RI-Tests an aufeinander folgenden Tagen auf die Dichte des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors. Es sollte gezeigt werden, ob es durch das wiederholte Eindringen in das Territorium zu Änderungen in der Rezeptordichte in Gehirnen der Bewohner im Vergleich zu nicht manipulierten Kontrolltieren kommt. Des Weiteren wurde untersucht, ob sich die Rezeptordichte in Gehirnen von wenig aggressiven und aggressiven Bewohnern unterscheidet.

Die wiederholte Konfrontation im RI-Test führte zu einem signifikanten Anstieg der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptordichte in kortikalen Bereichen wenig aggressiver und aggressiver Bewohner. Die Rezeptordichte im ventralen und lateralen orbitalen Kortex war bei allen Bewohnern signifikant höher als bei Kontrolltieren; die immunhistochemische Anfärbung im medialen orbitalen und granulären insulären Kortex wies eine zusätzliche Erhöhung der Rezeptordichte bei aggressiven Bewohnern im Vergleich zu Kontrolltieren auf. Erstaunlicherweise wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den wenig aggressiven und aggressiven Bewohnern gefunden. Aus diesem Grund wurden diese Gruppen zur RI-Gruppe zusammengefasst und mit den Kontrolltieren verglichen. Dieser Vergleich zeigte einen signifikanten Anstieg der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptordichte im orbitofrontalen, prälimbischen und agriculären insulären Kortex sowie der subkortikalen zentralen Amygdala und dem dorsalen Raphekern der RI-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass schon wenige Wiederholungen einer territorialen Konfrontation zu Änderungen in der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptordichte führen können. Diese Änderungen scheinen jedoch am ehesten mit dem durch die Konfrontation entstandenen sozialen Stress und nicht mit dem aggressiven Verhalten in Zusammenhang zu stehen.

### **2.3 Studie 3**

*„Die soziale Instigation führt zu erhöhter Aggressivität ohne eskalierte Aggressionsmuster und steigert die Fos-Aktivierung im neuronalen Netzwerk der Stressbewältigung“* untersucht den Einfluss einer Provokationsphase vor einem RI-Test auf das offensive Verhalten von Dark Agouti Ratten und die c-Fos-Expression in limbischen Hirngebieten während des letzten Provokations-RI-Tests. Während der Provokationsphase wurde dem Bewohner ein unbekannter Kontrahent dargeboten, der gesehen und gerochen, aber nicht angegriffen werden konnte.



Die als soziale *Instigation* bezeichnete Provokationsphase zeigte bei naiven Bewohnern keinen Effekt. Bei Bewohnern mit vorheriger Kampferfahrung führte sie zu einer signifikant verkürzten Angriffslatenz und signifikant verlängertem aggressivem Verhalten; dieser Effekt flachte jedoch im Laufe von drei Versuchstagen ab. Verhaltensmuster des eskalierten aggressiven Verhaltens wurden durch die Provokationsphase nicht ausgelöst. Das aggressive Verhalten der Bewohner der Vergleichsgruppe, ohne vorherige Provokationsphase, und das Verhalten der Provokations-Tiere wiesen keine signifikanten Unterschiede auf; die Fos-Aktivierung reflektierte somit den Einfluss der Provokationsphase. Der mediale und laterale orbitale, der agranuläre insuläre sowie das laterale Septum und die mediale Amygdala zeigten eine signifikant erhöhte c-Fos-Anfärbung in Gehirnen der Provokations-Gruppe.

Die gesteigerte Fos-Aktivierung bei Bewohnern der Provokations-Gruppe lässt sich nicht auf das aggressive Verhalten zurückführen, sondern scheint mit dem Stress, bedingt durch die Verhaltenseinschränkung während der Provokationsphase, einherzugehen.

### **3. Behavior in inter-male encounters is associated with increased c-Fos activation in the frontal cortex and the central and basolateral amygdaloid nuclei of Dark Agouti rats**

Carolin Arlt, Sarina Baeckermann, Ursula Dicke

#### **3.1 Abstract**

In the present study, we investigated the behavior in male Dark Agouti rats by means of the resident-intruder test, which was performed on four consecutive days. In these rats with fighting experiences, we found individually varying levels and duration of inter-male aggression including extended aggressive performance. The impact of the momentary behavioral state on c-Fos expression of limbic brain centers was studied. In rats of the resident-intruder group, c-Fos labeling of the orbital, medial prefrontal and insular cortex as well as of the central and basolateral amygdala was significantly increased compared to controls. C-Fos labeling did not differ significantly between aggressive and non-aggressive residents. Therefore, the individually varying aggressive behavior was not reflected by c-Fos labeling. The increase in the c-Fos signal of resident rats is most likely attributed to the encounter and/or to the social stress caused by territorial intrusion of opponents. Aggressive behavior in Dark-Agouti rats appears to be regulated by different mechanisms within or distinct pathways of brain areas that are associated with emotional assessment and stress responses.

#### **3.2 Introduction**

Aggression comprises every behavior that is focused on inflicting damage on another individual in order to gain some advantages like vital resources, social status, or territory (Benus et al., 1991; Bushman and Anderson, 2001). Most species have established rules to

minimize injuries (Martinez et al., 2002); although in humans these rules seem to fail quite often (Dahlberg and Krug, 2002). Besides abnormal violent behavior, a large spectrum of styles and levels of aggressive behavior occurs in humans, while animal studies on aggressive behavior performed across time or in different context are lacking. The behavior and underlying neuronal basis of aggressive behavior was studied in mice and rats selected for abnormal violent behavior (for an overview see Neumann et al., 2010), albeit the diversity of forms of aggression and neurobiological mechanisms are not yet precisely understood. Non-selected laboratory rats show a bimodal distribution of aggression phenotypes without naturally occurring highly aggressive individuals (de Bruin, 1990; Haller et al., 2001; Halász et al., 2002a; de Boer et al., 2003). One exception is the Wild-type Groningen rat, which is a strain based on four pairs of wild-trapped animals and outbred under conventional conditions. Wild-type Groningen rats show a trimodal distribution of aggression phenotypes (de Boer et al., 2003). Rats of the Dark Agouti (DA) inbred strain likewise reveal a distribution with low, intermediate, and highly aggressive individuals (Radant, 2009). The first objective of the present study is to test whether non-selected rats of the DA strain exhibit constancy or variability in their aggressive behavior over time. Another goal of the study is to determine the telencephalic limbic brain regions activated in the behavior of DA rats after encounters in the RI-test by using c-Fos immunocytochemistry as a neuronal marker for activation (Sagar et al., 1988; Hughes and Dragunow, 1995). C-Fos is an approved marker to determine activation pattern in the brain induced by experience such as stress, sexual behavior, and aggressive or violent behavior (Halász et al., 2002a; Salomé et al., 2004; Halász et al., 2006; Haller et al., 2006; Halász et al., 2008; Ball and Balthazart, 2010; Tulogdi et al., 2010; Miczek et al., 2011). To date, the limbic centers involved in regulation of aggressive behavior were mostly studied in manipulated or selected violent rodents (de Bruin et al., 1983; Annen and Fujita, 1985; Albert et al., 1993; Miczek et al., 1994; Siegel et al., 1999; van Erp and Miczek, 2000; Ferrari et al., 2003; Halász et al., 2006; Haller et al., 2006; Rudebeck et al., 2006; Beiderbeck

et al., 2007; Rudebeck et al., 2007; Veenema and Neumann, 2007; Beiderbeck et al., 2012). In the present study, we focus on the investigation of cortical and subcortical limbic brain areas in non-selected rats of the laboratory strain DA. Regions were chosen according to data on manipulated rodents or rodents selected for violent behavior (Salomé et al., 2004; Halász et al., 2006; Haller et al., 2006, Beiderbeck et al., 2007; Beiderbeck et al., 2012). The following areas were investigated: the medial orbital (MO), ventral orbital (VO), lateral orbital (LO), prelimbic (PrL), and infralimbic cortex (IL), cingulate cortex 1 (Cg1), cingulate cortex 2 (Cg2), agranular insular (AI), granular insular (GI), and dysgranular insular cortex (DI), lateral septal nucleus dorsal part (LSD), lateral septal nucleus intermediate part (LSI), lateral septal nucleus ventral part (LSV), medial septal nucleus (MS), accumbens nucleus core (AcbC), accumbens nucleus shell (AcbSh), central amygdaloid nucleus (CeA), basolateral amygdaloid nucleus (BLA), basomedial amygdaloid nucleus (BMA), lateral amygdaloid nucleus (La), medial amygdaloid nucleus anterior part (MeA), and medial amygdaloid nucleus posterior part (MeP). The present study aims at determining the baseline, co-factors and variability of aggressive behavior and the respective activation of limbic brain centers in rats of the DA strain. For this purpose we examined rats of (i) a control group to identify the basic c-Fos expression, (ii) a cage-transfer control group that experienced cage transfer to the test room without confrontation to an intruder, and (iii) a RI group that likewise underwent cage transfer to the test room and a RI-test on four consecutive days.

### **3.3 Material and methods**

#### **3.3.1 Animals**

The subjects investigated were 23 male DA rats bred in our institute (stock of the University of Bremen). Eighteen female DA rats that underwent ligation of the oviduct were utilized as mates. Twenty-four male Wistar rats (Harlan-Winkelmann, Borcheln, Germany) were used as opponents in the RI-test. Rats of the Wistar strain were chosen, because DA rats respond to

intruders of a different strain with enhanced aggressive behavior compared to DA intruder rats (Radant, 2009). The DA and Wistar rats were maintained under the same conditions in separate rooms. Prior to the experiments, rats were housed in same-sex groups of five to six individuals in macrolon standard cages (54 x 36 x 21 cm). Rats were kept in a controlled environment at a temperature of 21°C ( $\pm$  2°C) and a humidity of 55% ( $\pm$  5%). They were maintained at a 12:12 h day-night schedule, with lights on at 07:00 h. During the day a radio was turned on to habituate rats to background noise. Food (10 H 10 standard food, Nohrlin GmbH, Bad Salzuflen, Germany) and water were available *ad libitum* except for the Wistar rats, which were kept on a diet ( $12 \pm 2$  g/rat/day) to match the body weight of resident and intruder. At the time of the experiment, rats were 16-24 weeks old and weighted 270-350 g. The experiments were performed in accordance with the National Institutes of Health ethical guidelines for the care and use of laboratory animals for experiments.

### 3.3.2 Experimental design

Three groups of male rats were exposed to different conditions. (i) Rats of the control group (n=5; DA 1-5) were left undisturbed in their cage in the climatized room without experimental exposure. (ii) Each rat of the cage-transfer control group (n=5; DA 6-10) was kept together with a female rat in a cage, henceforth called home cage (54 x 36 x 21 cm), for five days prior to and during four days of cage transfer to the test room. On days of cage transfer, the female rat was removed and the DA rat was kept singly in its home cage for 60 min. Afterwards the home cage was transferred to the test room, in which a habituation phase of 10 min was allowed. The rat was then transferred back to the climatized room and was kept again together with its female except for the fourth day of cage transfer, after which the rat was left undisturbed for 60 min in the home cage before sacrificing. (iii) Each rat of the RI group (n=13; DA 11-23) was also housed together with a female rat in a home cage for five days prior to and during the test phase. On the day of the behavioral experiment, the female was

removed and the DA rat was kept singly in its home cage for 60 min. The home cage was then transferred to the test room. A test room was chosen in order to prevent DA rats in the climatized room to become accustomed to rats of the Wistar strain, i.e., to the smell, vocal communication or view of the opponents. Only the home cage was present in the room; the cage of the Wistar rat used as opponent was placed in an anteroom of the test room. The temperature in the test room was 23°C, the luminance intensity was 120 lx, and a radio was turned on. The RI-tests took place in a random order during day time (09:00-13:00). Each DA rat (resident) performed the RI-test four times on consecutive days; each resident was confronted only once with the same Wistar rat (intruder). An intruder was utilized in two (n=20) to three (n=4) RI-tests to prevent habituation to the test situation. The RI-test started with the placement of the intruder into the home cage of the resident. The duration of encounters was 10 min. The behavior shown in the RI-test was recorded by a video camera (DCR-TRV900E, Sony Corporation, Tokyo, Japan) through the transparent walls of the home cage. After removal of the intruder, the resident was kept again together with its female in the climatized room except for the fourth RI-test, after which the resident was left undisturbed for 60 min in the home cage before sacrificing. Rats of the three groups were decapitated using a small animal guillotine (Kent Scientific Corporation, Torrington, USA); the brains were quickly removed and processed as described below.

### 3.3.3 Analysis of behavior

Two well-trained observers watched the videotapes of the RI-tests and scored the behavior of residents. The inter-rater reliability ranged from 0.98 to 0.99 (Cronbach's  $\alpha$ ) for the behavioral parameters analyzed in agonistic behavior, social exploration, nonsocial exploration, self grooming, and time of inactivity. The duration of the offensive behavior, the latency of the first bite attack, and the ratio of the number of bites relative to the number of offensive threats (bite attack/threat ratio) were determined. The duration of offensive behavior

included bite attacks, lateral threats, chases, keep downs, and offensive uprights. Social exploration included the duration of anogenital sniffing, social grooming, and crawl over. The duration of nonsocial exploration included walking through the cage and sniffing directed toward the environment. Grooming and scratching itself was regarded as self grooming, and no obvious activity like resting was considered inactivity. Rats were classified into three different groups: (i) low aggressive, when <15% of time was spent in offensive behavior; (ii) intermediate aggressive, with 15–55% of time; (iii) highly aggressive, >55% of time (de Boer et al., 2003).

#### 3.3.4 Histological processing of brains

Brains were removed, fixed for four hours in 5% acrolein (acrylic aldehyde, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), and then cryoprotected in 30% sucrose in PB. Each brain was cut on a cryostat (CM 1850, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) into five series of 40  $\mu$ m sections, of which one series was used for detection of c-Fos. Sections were initially blocked in phosphate buffer (PB) containing 1.5% normal goat serum and 0.3% Triton-X-100 for 60 min, and then incubated in rabbit anti-c-Fos antibody (1:2,000; K-25, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) for 2 days at 4°C. Thereafter, sections were washed in PB, and incubated in biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (1:400; Vector Laboratories, Burlingame, USA) for 60 min at room temperature. After washing sections again in PB, they were exposed to an avidin-biotin complex (Vector Laboratories, Burlingame, USA) for 60 min and subsequently washed in PB. Staining was continued by incubation in PB containing diaminobenzidine (0.2 mg/ml; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), 0.003% cobalt chloride, 0.003% nickel sulfate and 0.03% hydrogen peroxide. Stained sections were mounted, dehydrated, and coverslipped.

### 3.3.5 Quantification of c-Fos-immunopositive nuclei

Each brain region investigated (Fig. 1) was identified by the use of standard brain landmarks (Paxinos and Watson, 1998). Microscopic images were digitized by a digital camera connected with a microscope (1300 x 1030 pixel; Axiocam, Zeiss, Göttingen, Germany). The region of interest was marked by a frame in the image using a computer program (Corel Photo-Paint X3, 2005, Corel Corporation, Munich, Germany). The size of the frame was 355  $\mu\text{m}$  x 280  $\mu\text{m}$ ; it was adapted to the smaller size of the LSD (293  $\mu\text{m}$  x 250  $\mu\text{m}$ ), of the MS (177  $\mu\text{m}$  x 280  $\mu\text{m}$ ), of the CeA and the MeP (274  $\mu\text{m}$  x 274  $\mu\text{m}$ ), and of the BMA (274  $\mu\text{m}$  x 220  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 1). A defined threshold (25% darker than the background) was applied for identifying labeled nuclei inside the frame of the image; the minimum size of positive nuclei was set at 5 pixels (Image J, Wayne Rasband, Institutes of Health, Bethesda, USA). Labeled nuclei were manually counted by two observers who were blind to the test conditions. The inter-rater reliability ranged from 0.87 to 0.99 (Cronbach's  $\alpha$ ) for the different brain areas.

### 3.3.6 Statistical analysis

Statistical analysis was performed by SPSS software (PASW Version 18, SPSS Inc., Chicago, USA). Data were analyzed for normality using the Shapiro-Wilk test. To ensure normality, non-normally distributed data were transformed using the natural logarithm or square root. Data of each behavioral category and of the first attack latency as well as of the bite attack/threat ratio displayed in the RI-tests on four consecutive days were analyzed by a generalized linear model for repeated measures. The Student's t-test was applied when data of RI 4 of non-aggressive and aggressive RI rats were compared. Percentage number of c-Fos-labeled cell nuclei in brains of control group, cage-transfer control group, non-aggressive RI group, and aggressive RI group (intermediate and highly aggressive rats) were compared by analysis of variance (ANOVA). When homogeneity of variance was given, the F-test was used; in case of heterogeneity of variance the Brown-Forsythe (BF) -test was applied. Post



hoc analysis of inter-group differences was undertaken by the Gabriel (homogeneity of variance) or by Tamhane-T2 (heterogeneity of variance) test. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ , and highly significant at  $p < 0.001$ . Data are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

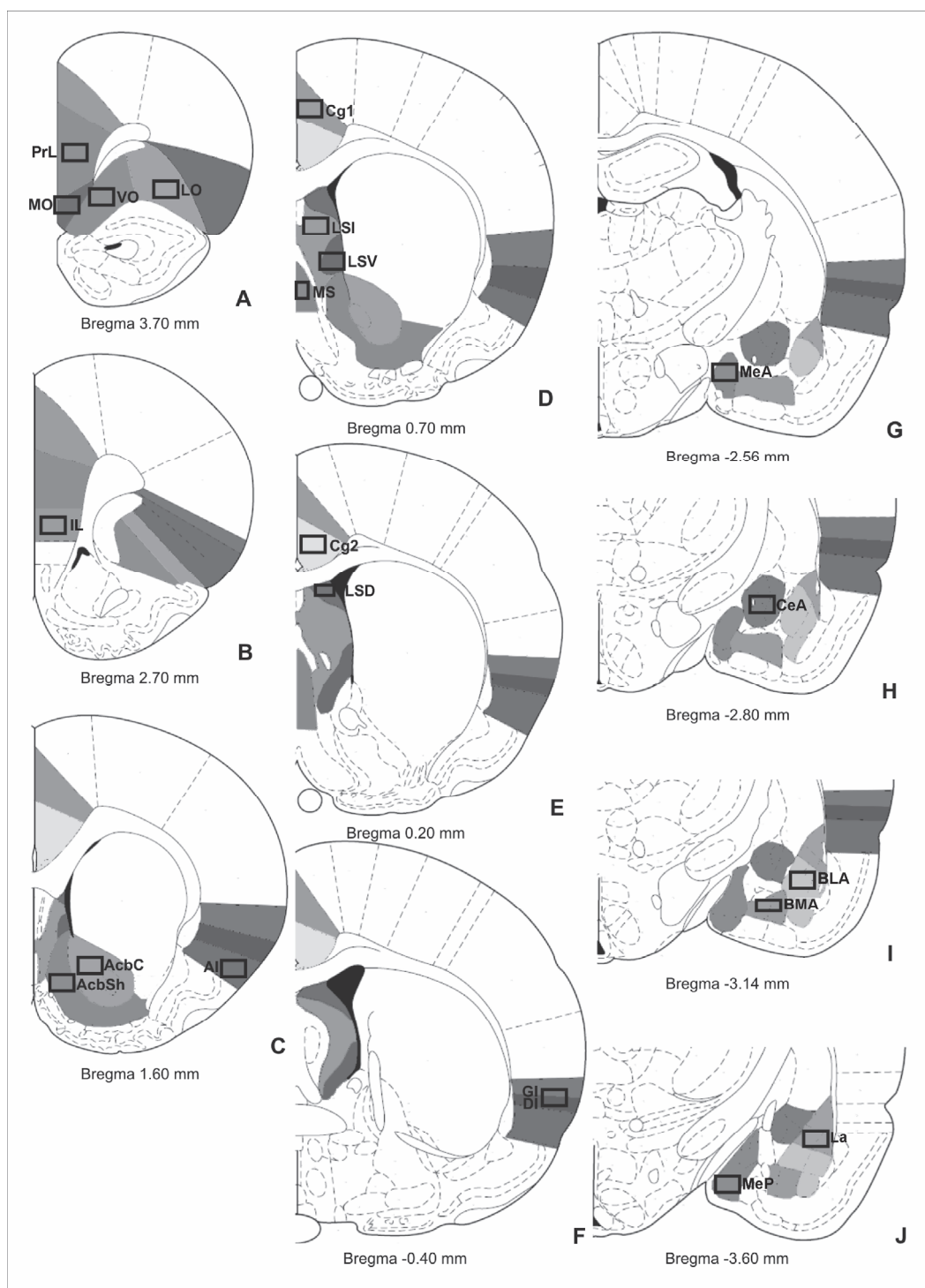


Figure 1. Schematic representation of brain areas analyzed (modified after Paxinos and Watson, 1998). Frames inside the gray areas highlight the regions of interest. MO, medial orbital cortex; VO, ventral orbital cortex; LO, lateral orbital cortex; PrL, prelimbic cortex; IL, infralimbic cortex; Cg1, cingulate cortex area 1; Cg2, cingulate cortex area 2; AI, agranular insular cortex; GI, granular insular cortex; DI, dysgranular insular cortex; LSD, lateral septal nucleus dorsal part; LSI, lateral septal nucleus intermediate part; LSV, lateral septal nucleus ventral part; MS, medial septal nucleus; AcbC, accumbens nucleus core; AcbSh, accumbens nucleus shell; CeA, central amygdaloid nucleus; BLA, basolateral amygdaloid nucleus; BMA, basomedial amygdaloid nucleus; La, lateral amygdaloid nucleus; MeA, medial amygdaloid nucleus anterior part; MeP, medial amygdaloid nucleus posterior part.

### 3.4 Results

#### 3.4.1 Behavior in the resident-intruder test

The intrusion of an unfamiliar male rat into the home cage of the territorial male rat resulted in a typical pattern of offensive behavior of the resident. In most cases, the sequence started with an approach toward the intruder followed by anogenital sniffing and by a series of aggressive postures and attacks consisting of lateral threat, clinching, biting or chasing, and forcing the intruder into submission. The duration and pattern of aggressive behavior of rats of the RI group varied substantially among individuals. Fights including bite attacks consistently ended in defeat of the intruders, which adopted defensive or submissive postures. Offensive attacks of the residents alternated with non-agonistic interactions. Bite attacks towards vulnerable body parts like throat, head, or belly were not observed. In RI-test 1-4, the first attack latency, bite attack/threat ratio, offensive behavior, social exploration, self grooming, and inactivity did not significantly differ on consecutive days. The first attack latency was on average  $293.54 \pm 29.58$  s in RI 1-4 and ranged between 14-520 s. The bite attack/threat ratio ranged between 0-0.5 and was on average  $0.05 \pm 0.01$ . During the 10 min of RI 1-4, residents spent on average  $34.87 \pm 2.79\%$  of time in offensive behavior,  $20.09 \pm 1.07\%$  in social exploration,  $2.86 \pm 0.56\%$  in self grooming, and  $4.13 \pm 0.70\%$  in resting. The time of social exploration, self grooming, and inactivity/resting were rather robust across RI 1 to RI 4. The time of offensive behavior and nonsocial exploration varied across the test days; however, only the time of nonsocial exploration differed significantly ( $p < 0.05$ ) between RI 1 ( $23.99 \pm 3.58\%$ ) and 2 ( $39.91 \pm 3.46$ ), and RI 1 ( $23.99 \pm 3.58\%$ ) and 3 ( $46.13 \pm 3.80\%$ ) (Fig. 2). Intraindividual differences were found across the four RI-tests (RI 1-4). Only one resident was assigned to the same group (DA 14, intermediate group) in RI 1-4; in the remaining residents, the duration of aggressive behavior and, thus, the assignment to a group differed over the successive RI-tests. Taken together, highly aggressive state behavior is found in the inbred strain DA, and in individual cases the duration of aggressive behavior is rather variable

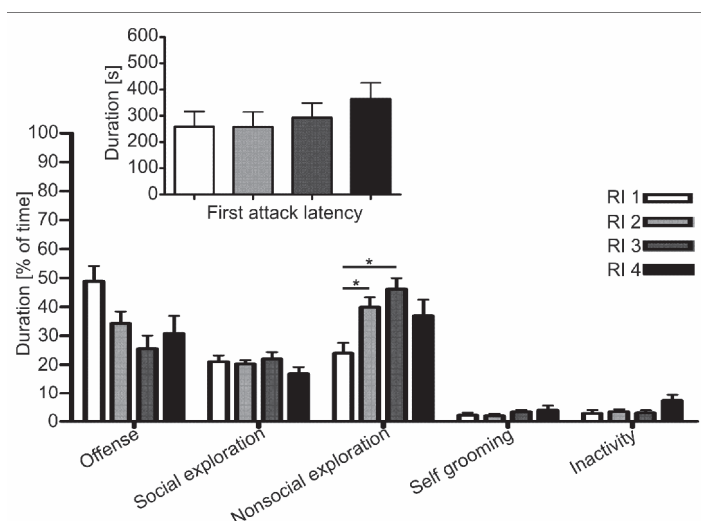


Figure 2. Latency of first bite attack (upper graph) and duration of time spent in different types of behavior on consecutive resident-intruder tests (RI 1-4). \*  $p < 0.05$  significant difference between RI 1 and RI 2, and RI 1 and RI 3.

over the course of several tests (Fig. 3). The c-Fos expression increases to its maximum 60-90 min after neuronal activation and was therefore only induced by the behavior in RI 4. In this last test, three residents were classified as highly aggressive, five as intermediate aggressive and five as non-aggressive. Intermediate and highly aggressive rats were summarized as aggressive rats,

because none of the aggressive rats constantly showed highly aggressive behavior in the four RI-tests and as already mentioned above did not reveal pathological aggressive behavior. In RI 4, aggressive RI group rats exhibited  $45.00 \pm 5.39\%$  of time offensive behavior,  $14.42 \pm 3.12\%$  social exploration,  $25.65 \pm 5.67\%$  nonsocial exploration,  $2.94 \pm 1.05\%$  self grooming, and were inactive  $5.31 \pm 1.41\%$  of time; the bite attack/threat ratio was  $0.05 \pm 0.02$ . Non-

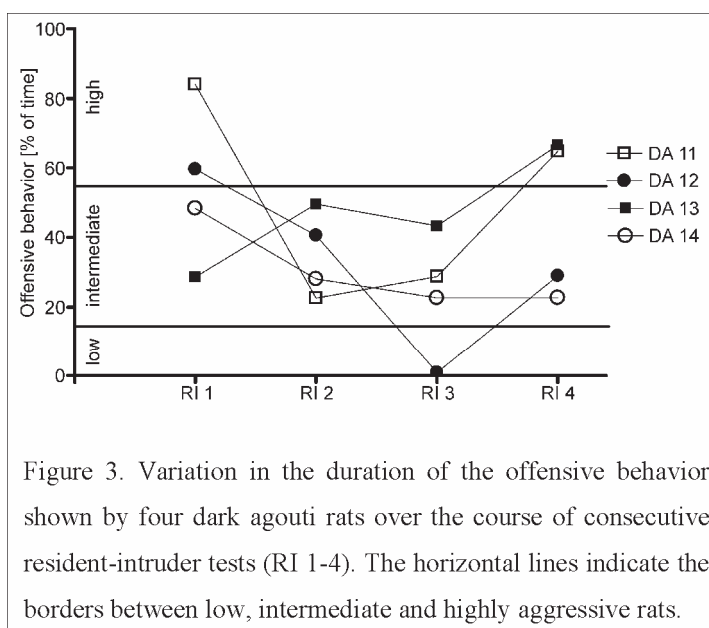


Figure 3. Variation in the duration of the offensive behavior shown by four dark agouti rats over the course of consecutive resident-intruder tests (RI 1-4). The horizontal lines indicate the borders between low, intermediate and highly aggressive rats.

aggressive rats spent  $8.10 \pm 2.13\%$  of time in offensive behavior,  $20.99 \pm 2.35\%$  in social exploration,  $54.89 \pm 4.91\%$  in nonsocial exploration,  $5.54 \pm 3.57\%$  in self grooming, and were inactive  $10.48 \pm 4.39\%$  of time; they did not exhibit bite attacks. Percentage duration of offensive behavior was significantly

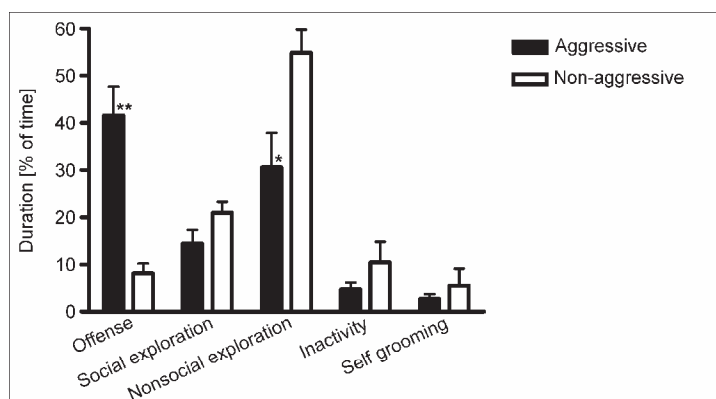


Figure 4. Duration of time spent in different types of behavior of aggressive and non-aggressive rats in RI 4. \*  $p < 0.05$  significant difference between aggressive and non-aggressive rats in nonsocial exploration; \*\*  $p < 0.001$  significant difference between aggressive and non-aggressive rats in offensive behavior.

longer in aggressive RI group rats compared to non-aggressive ones ( $p < 0.001$ ); nonsocial exploration was significantly longer in non-aggressive RI group rats ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4).

### 3.4.2 Distribution of c-Fos labeling in limbic telencephalic centers

In the following, statistical differences of c-Fos-positive cell nuclei are given among controls (n=5), cage-transfer controls (n=5), non-aggressive rats (n=5), and aggressive rats of the RI group (n=8). We analyzed the impact of momentary behavioral states in RI 4 on c-Fos expression, because aggressiveness of rats was not consistent over time. Some of the telencephalic areas studied did not reveal significant differences in the number of c-Fos-labeled cell nuclei among the different groups of rats. These were PrL, Cg1, and Cg2 in the cortex, and the lateral and medial septum, the accumbens nucleus, and the basomedial, lateral, and medial amygdaloid nuclei in subcortical limbic centers. The number of c-Fos-labeled cell nuclei ranged between 5 and 30% of total cell number in these areas.

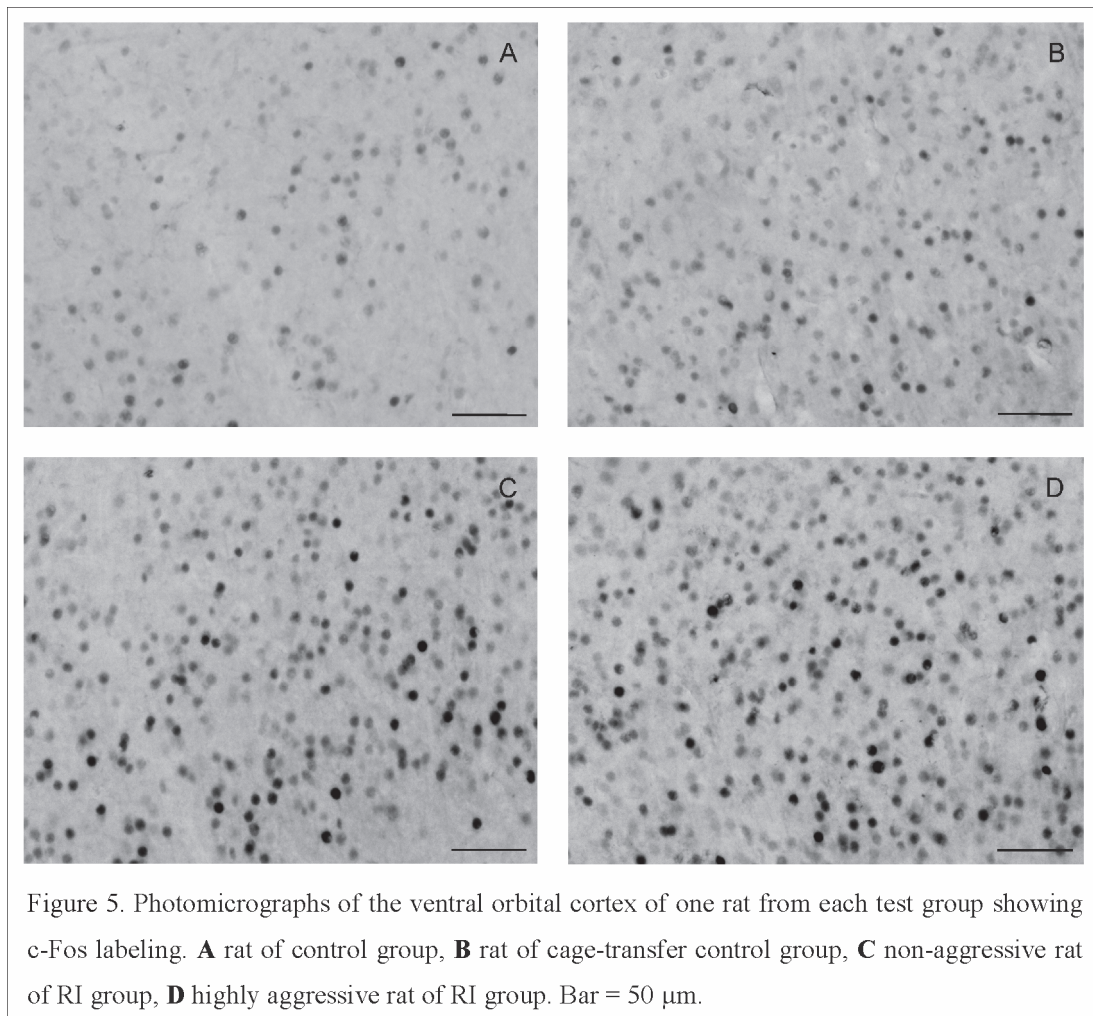
**Table 1** Percentage of c-Fos labeled nuclei in limbic centers of the telencephalon.

Brain region		Control (n=5)	CT-control <sup>a</sup> (n=5)	Non-aggr <sup>b</sup> (n=5)	Aggr <sup>c</sup> (n=8)
MO	Control	10.16 (± 3.44)	↑ <sup>d</sup> * <sup>e</sup>	↑	↑
	CT-control		19.05 (± 2.57)	↑	↑
	Non-aggr			17.41 (± 2.62)	↑
	Aggr				14.49 (± 1.59)
VO	Control	6.47 (± 0.83)	↑ *	↑ ** <sup>f</sup>	↑ **
	CT-control		24.86 (± 3.17)	↑	↑ *
	Non-aggr			31.75 (± 3.90)	↑
	Aggr				40.51 (± 2.96)
LO	Control	4.47 (± 1.49)	= <sup>g</sup>	↑ *	↑ **
	CT-control		4.49 (± 1.26)	↑ *	↑ **
	Non-aggr			14.90 (± 1.83)	↑
	Aggr				18.46 (± 1.62)
IL	Control	5.00 (± 1.62)	↑	↑ *	↑ **
	CT-control		12.79 (± 2.33)	↑	↑ *
	Non-aggr			17.95 (± 1.83)	↑
	Aggr				28.55 (± 3.52)
AI	Control	6.54 (± 1.54)	=	↑	↑
	CT-control		5.94 (± 2.26)	↑ *	↑ *
	Non-aggr			20.08 (± 5.23)	↓ <sup>h</sup>
	Aggr				15.71 (± 2.82)
GI	Control	1.79 (± 0.28)	=	↑	↑
	CT-control		1.88 (± 1.47)	↑	↑ *
	Non-aggr			8.17 (± 2.35)	=
	Aggr				7.80 (± 2.34)
DI	Control	3.67 (± 0.84)	=	↑ *	↑ *
	CT-control		3.39 (± 1.76)	↑	↑
	Non-aggr			17.97 (± 1.81)	=
	Aggr				15.28 (± 3.48)
CeA	Control	5.99 (± 1.75)	=	↑ *	↑ *
	CT-control		5.62 (± 2.36)	↑ *	↑ *
	Non-aggr			21.13 (± 3.17)	=
	Aggr				18.07 (± 2.44)
BLA	Control	5.63 (± 1.37)	=	↑ *	↑ *
	CT-control		4.06 (± 1.33)	↑ *	↑ *
	Non-aggr			17.61 (± 1.81)	↑
	Aggr				25.86 (± 2.82)

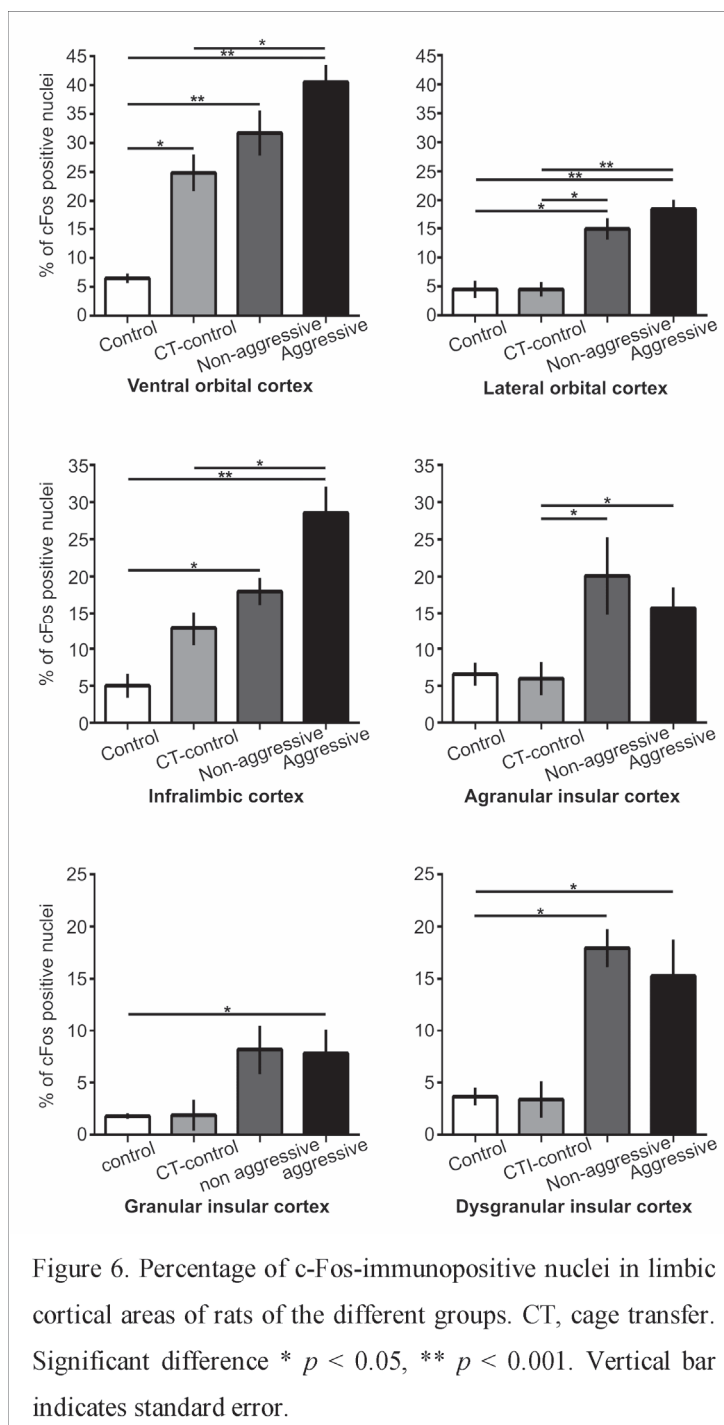
<sup>a</sup> cage-transfer control group; <sup>b</sup> non-aggressive rats of the RI group; <sup>c</sup> aggressive rats of the RI group; <sup>d</sup> increase of percentage; <sup>e</sup>  $p < 0.05$ ; <sup>f</sup>  $p < 0.001$ ; <sup>g</sup> equal to; <sup>h</sup> decrease of percentage

### 3.4.2.1 C-Fos labeling in limbic cortical areas

ANOVA revealed significant differences ( $p < 0.05$ ) in the number of c-Fos-positive cell nuclei in MO ( $F=3.357$ ), VO ( $F=21.506$ ), LO ( $F=19.468$ ), IL ( $F=12.582$ ), AI ( $F=4.810$ ), GI ( $F=4.299$ ), and DI ( $F=12.042$ ). Weak c-Fos activation, i.e., below 10% labeled cell nuclei,

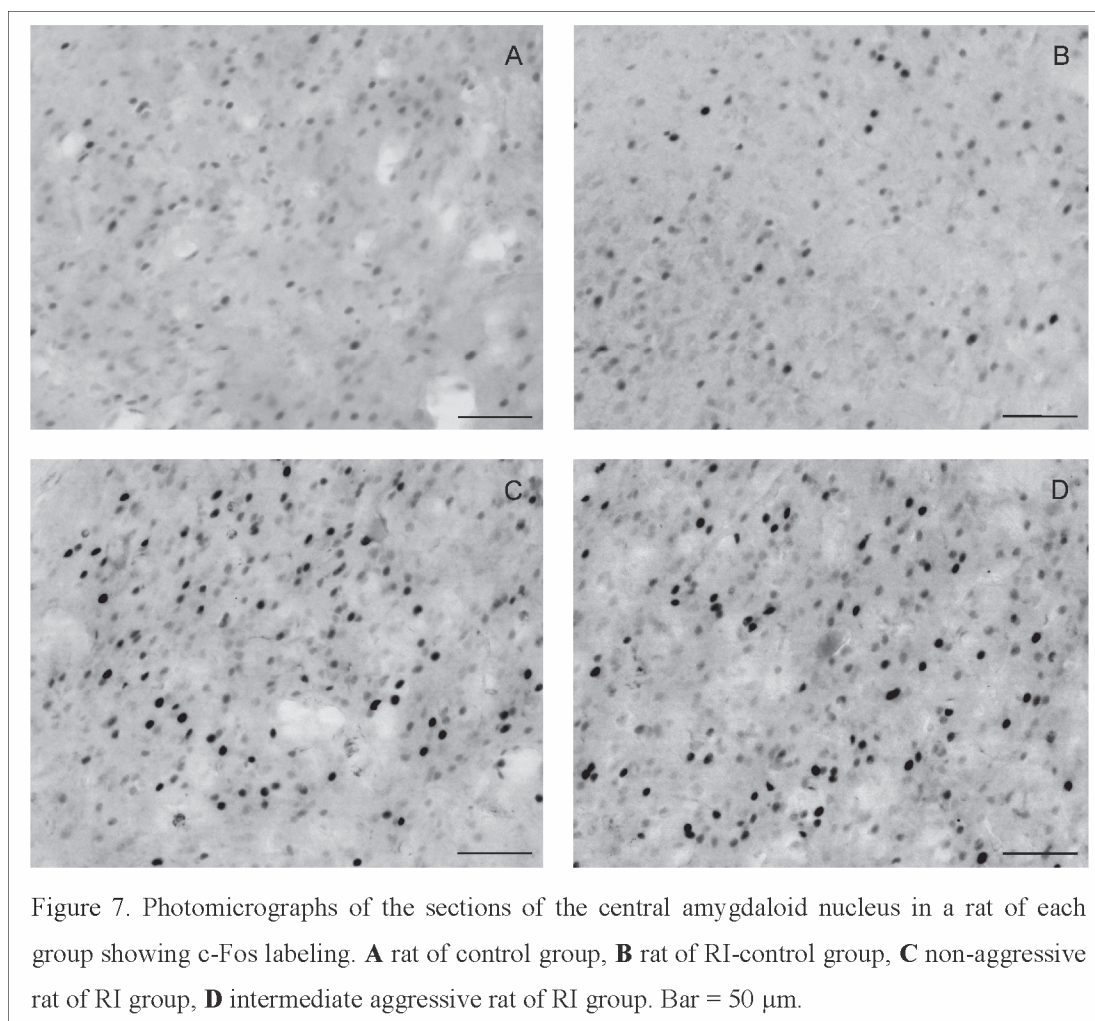


was found in all cortices of controls studied. Also, the LO and the insular cortices of cage-transfer controls as well as the GI in rats of the RI group revealed numbers ranging from 2-9% labeled cell nuclei. In rats of the cage-transfer control group, post hoc analysis revealed significantly higher number of c-Fos-positive cell nuclei in MO and VO (both  $p < 0.05$ ) compared to control group rats. They contained 19-25% stained cell nuclei in the respective areas. In rats of the RI group, the larger number of cortical areas studied exhibited moderate to strong c-Fos expression; 15-40% of cell nuclei were c-Fos labeled in cortical areas except GI. In non-aggressive RI rats, the number of labeled cell nuclei in the VO ( $p < 0.001$ ), LO, IL, and DI (all  $p < 0.05$ ) was significantly higher compared to that of the control group according to post hoc analysis. Compared to cage-transfer control group rats, c-Fos labeling in non-aggressive RI rats was significantly higher in LO and AI (both  $p < 0.05$ ). In aggressive RI rats, c-Fos labeling in areas VO (Fig. 5), LO, IL (all  $p < 0.001$ ) and DI ( $p < 0.05$ ) was also



significantly higher compared to controls. Furthermore, number of c-Fos-labeled cell nuclei was significantly higher in aggressive RI rats compared to cage-transfer control rats in VO, IL, and AI ( $p < 0.05$ ) as well as in LO ( $p < 0.001$ ). Post hoc analysis revealed no significant differences between non-aggressive and aggressive rats of the RI group (Tab.1; Fig. 6).





#### 3.4.2.2 C-Fos labeling in the septum, nucleus accumbens, and amygdala

In all groups investigated, moderate c-Fos labeling (9-24%) was found in the LSV, while the LSD, LSI, and the MS revealed weak c-Fos labeling (max. 3%). In the nucleus accumbens, a moderate c-Fos signal was present in the shell of the accumbens nucleus in all groups; the percentage of labeled cell nuclei ranged from 8-14%. In the core of the accumbens nucleus, roughly 30% of cell nuclei were labeled in aggressive rats of the RI group. In the amygdala, the CeA, the BLA, and the MeP revealed a low number of labeled cell nuclei (2-6%) in both control groups, while a moderate number (9-25%) was found in non-aggressive and aggressive rats of the RI group. In only two subcortical regions, ANOVA yielded a significant difference between groups in the CeA ( $F=8.803$ ) and BLA ( $F=12.315$ ). In non-aggressive and aggressive RI rats, post hoc analysis revealed significantly higher c-Fos labeling in CeA (Fig.

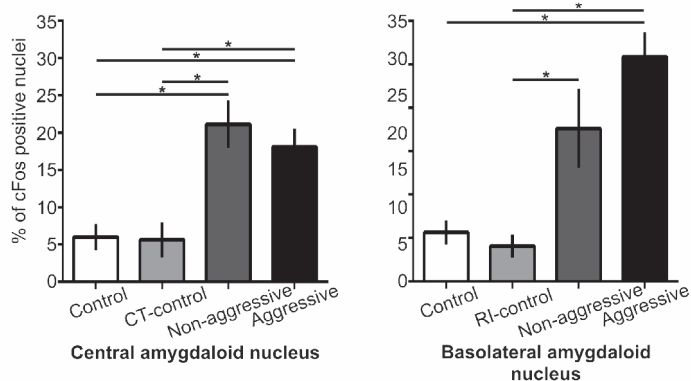


Figure 8. Percentage of c-Fos-immunopositive nuclei in the central and basolateral amygdala of rats of the different groups. CT, cage transfer. Significant difference \*  $p < 0.05$ . Vertical bar indicates standard error.

7) and BLA (both  $p < 0.05$ ) compared to control group rats; same significances were found when compared to cage-transfer controls. Differences between low-aggressive and aggressive RI rats were not significant (Tab. 1; Fig. 8)

### 3.5. Discussion

The present study quantified the behavioral pattern of DA rats displayed in RI-tests that were performed on four consecutive days. The confrontation with an intruder rat of the Wistar strain led to territorial aggressive behavior in the resident rats of the DA strain. The DA residents were assigned to a low, intermediate, and highly aggressive group according to the duration of their offensive behavior. However, individuals displayed variable times of aggressive behavior across consecutive RI-tests and therefore, state but not trait aggression was considered. After the fourth RI-test, limbic centers of the telencephalon were investigated by c-Fos immunohistochemistry. A weak basic c-Fos expression was found in controls. In rats of the cage-transfer control group, in which co-factors of the RI-test condition were controlled, c-Fos signaling was significantly higher in the medial and ventral orbital cortex compared to controls. Non-aggressive as well as aggressive rats of the RI group revealed an increase in the number of c-Fos-labeled cells in the ventral and lateral orbital, infralimbic and dysgranular insular cortex, and in the central and basolateral amygdala compared to rats of the control group. In the lateral orbital and agranular insular cortex and in the central and basolateral amygdala of rats of the RI group, a significant increase was found compared to

rats of the cage-transfer controls. Aggressive rats displayed further a significant increase of c-Fos expression in the ventral orbital, infralimbic and granular insular cortex compared to cage-transfer controls. The increased activation in the same OFC areas of non-aggressive and aggressive residents may rather be related to a modulatory function in processing social encounters, because the behavioral pattern in the RI-test differed between these two groups of residents. The increased activation of the mPFC and parts of the amygdaloid complex most likely concerns the coping with stress caused by the social encounter.

### 3.5.1 Behavior in the resident-intruder test

DA rats of the present study exhibited the same behavioral pattern in the RI-test like rats of other strains with the exception that the intensity of offensive behavior differed individually in the DA strain. Based on the duration of aggressive behavior shown in the RI-test, DA rats were classified into three groups of aggression, a low, intermediate, and highly aggressive one. So far, the Wild-type Groningen strain is the only one, in which a trimodal distribution of aggressive behavior was identified. However, Wild-type Groningen rats display highly increased aggressive trait behavior, whereas in DA rats state but not trait aggression was highly increased. Other laboratory strains like Long Evans or Wistar reveal a bimodal distribution of low and intermediate aggressive individuals according to the duration of offensive behavior (de Bruin, 1990; de Boer et al., 2003). In the present study, a trimodal distribution was found using the duration of offensive behavior and a bimodal distribution based on the bite attack/threat ratio, while other studies refer to the bite attack/threat ratio for classification of highly aggressive behavior (Haller et al., 2001; Halász et al., 2002a). When aggressive behavior is enhanced by frustration or instigation, rats tend to show ‘abnormal’ aggression, i.e., bite attacks into the head, throat, or belly (Kruk et al., 1990; de Almeida and Miczek, 2002; Miczek et al., 2003; Miczek et al., 2004). Selective breeding of rodent strains results in low and high aggressive lines, which display stable performance although selection

appears to be necessary during breeding (Korte et al., 1996; Veenema et al., 2005; Popova et al., 2005; Caramaschi et al., 2008). Despite non-selective inbreeding over generations, rats of the DA strain seem to have conserved individual profiles of aggressive behavior including prolonged aggressive behavior. A study on the behavioral profiles of DA rats in our laboratory not only revealed interindividual differences in aggressive behavior but also in anxiety (Radant, 2009). Other studies on the behavior of DA rats reported a higher anxiety compared to other strains, which was reduced by handling (Mechan et al., 2002; Roy and Chapillon, 2004). The highly aggressive behavior displayed by DA residents in the present study does not appear to be 'abnormal', because DA residents showed only few bite attacks and did not bite into the intruder's head, throat, or belly but attacked the back, neck, or flank of intruders. They also responded to submissive behavior with interruption of their offensive attack. Therefore, the sustained aggressive behavior of DA rats rather reflects 'normal' albeit partly intense territorial behavior (de Boer et al., 2003). The intraindividual differences in the aggressive behavior of the DA rats of the present study over the four test days appear to contradict the theory of a rewarding effect, which postulates an increasing aggressive behavior of a resident over time that is triggered by the submissive behavior of an intruder and the resulting winning experience (Benus et al., 1991; de Boer et al., 2003). DA residents did not know the opponents presented to them. Such an unpredictable situation may evoke social assessment of the opponent and in turn contributes to the decision to fight or not to fight (Martinez et al., 2002).

In conclusion, non-selected DA rats respond to territorial violation at individually variable levels of aggressive behavior including extended aggressive encounters. Given the fact that humans display a rather large spectrum of aggressive styles and levels, a model of a strain of rats exerting a variable pattern of aggression appears to be useful for investigating the

underlying neuronal basis of aggression. The individual variability of DA rats suggests a continuum of aggressive behavior that might be reflected in the neuronal activation pattern.

### 3.5.2 Distribution of c-Fos labeling in limbic telencephalic centers

#### 3.5.2.1 Contribution of test condition

In cage-transfer control rats, the test condition included the pair-wise keeping of a male and a female rat and the transportation and habituation of the male rat to the test room. Hence, the increased c-Fos labeling in VO and MO, parts of the OFC, might have been induced by mating and/or social behavior as well as the transportation and unfamiliar environment situation. The social contact with the female was already over for two hours before the time of decapitation on the fourth day of cage transfer, and the c-Fos expression reaches its maximum 60-90 min after activation. Therefore, it is less likely that the c-Fos signaling was induced by interactions with the female rat. In addition, an increase in c-Fos immunoreactivity in the OFC, as found in the present study, was not reported in studies on mating behavior. Therefore, the transportation and unfamiliar environment situation presumably led to increased c-Fos labeling in this cortical region. The DA rats were born and raised in a climatized room at the University of Bremen, and were not transported to other rooms prior to the experiments. New situations and new surroundings may cause anxiety and/or stress. In anxiety or stress models using the elevated plus maze or the shuttle box, increase of Fos immunoreactivity in the orbital cortex was interpreted as a result of stress-related responses (Duncan et al., 1996; Senba and Ueyama, 1997). The OFC, especially the MO, reveals strong inter-cortical and subcortical connections with limbic regions, and target, e.g., the mPFC which plays an important role in the modulation of responses to stress (Stevenson and Gratton, 2003; Spencer et al., 2004; Spencer and Day, 2004; Tóth et al., 2010; Hoover and Vertes, 2011). In rats of the cage-transfer control group, activation of the orbital cortices and especially of the MO, appears to result from transportation and changes in environment and

potentially induced stress. C-Fos activation of the VO was enhanced in cage-transfer control rats and beyond that further enhanced in rats of the RI group; this finding indicates that the control networks serving social assessment, aggression and stress are likely to comprise shared brain structures.

### 3.5.2.2 Impact of social and agonistic encounters

#### 3.5.2.2.1 Orbitofrontal cortex

Rats of the RI group revealed an increase of Fos activation in VO and LO compared to control groups. Beside involvement of the OFC in modulation of stress responses, c-Fos increase may be associated with the modulatory control of emotional and impulsive behavior and the processing of social emotional cues and dominance behavior of others (Blair, 2004). Halász and colleagues (2006) studied the influence of psychosocial and agonistic encounters in sham-operated and adrenalectomized rats and found that psychosocial encounters led to increased c-Fos labeling in the OFC of sham and adrenalectomized rats; agonistic encounters led to a further increase in both groups (Halász et al., 2006; in mice: Haller et al., 2006). Also, Beiderbeck and colleagues (2012) reported increased c-Fos labeling in the OFC of non-selected low aggressive rats and additional increase in selected low anxiety/high aggression rats. These data suggest that the OFC takes part in the initiation of aggressive behavior, but OFC lesions yielded an increase in aggressive behavior thereafter and not a decrease or loss of aggressive actions (de Bruin et al., 1983; Rudebeck et al., 2007). Hence, the OFC seems to modulate aggressive behavior and most likely contributes to an increase of it. In the present study, the increased labeling of the orbital cortices of non-aggressive residents would then be a result of repression of aggressive behavior, and the still higher c-Fos signal in aggressive residents would reflect its activating function. This would imply that GABAergic and pyramidal glutamatergic neurons in the orbital cortex are activated to different degrees as reported in the study of Halász et al. (2006). Pyramidal neurons of the OFC project to

aggression-related areas, e.g., amygdala and mediobasal hypothalamus (Rempel-Clower, 2007; Tóth et al., 2010; Hoover and Vertes, 2011). Another function of the OFC concerns reward-risk assessment that is integrated in decision-making and execution of actions. Impulsive and/or reactive aggression occurs as a consequence of failure of this assessment and prediction (Blair, 2004; Cardinal, 2006). Lesions of the OFC led to increasing impulsivity and decreasing acceptance of reward delay (Mobini et al., 2002; Rudebeck et al., 2006; Dalley et al., 2007; Basar et al., 2010). Failures in assessment and prediction might apply for residents acting aggressively in the RI-test, while non-aggressive residents make use of these assessments to invest into alternative behavior. The strong c-Fos labeling of the orbital cortices in residents of the present study thus could result from the reward assessment and decision-making processes during encounters as well, and further underlines the modulatory function of the OFC in aggressive behavior.

#### 3.5.2.2.2 Medial prefrontal cortex

In the present study, the area IL in the mPFC of rats of the RI group revealed significantly increased c-Fos labeling compared to controls. Differences between non-aggressive and aggressive residents were not significant; only aggressive residents revealed a significant increase compared to cage-transfer controls. The highest c-Fos labeling in the mPFC of rats was exclusively found after agonistic behavior (the stronger the aggression, the higher the signal), while in mice psychosocial encounters led to an increase as well (Halász et al., 2006; Haller et al., 2006; Beiderbeck et al., 2012). In contrast to the OFC, lesions of the mPFC did not induce behavioral differences in aggression (de Bruin et al., 1983), although the IL is strongly connected to the hypothalamic attack area. Lesions of the IL resulted in impairment of strategy switching and of behavioral adaptation (Oualian and Gisquet-Verrier, 2010), and the IL is involved in conflict resolution by suppressing inappropriate responses (de Wit et al., 2006). It is unclear, which of the functions are involved in the RI-test, but risk and conflict

management is needed in situations when intrusion into the territory stresses a resident. The modulation of responses to stress is also an important function of the mPFC (Stevenson and Gratton, 2003; Spencer et al., 2004; Spencer and Day, 2004). It is further undecided which of the functional aspects are relevant for the even higher, but not significant, activation of the IL in aggressive residents. The mPFC plays an important role in the network of aggression, because it receives information from internal and external stimuli and transmits the integrated information to hypothalamic centers (Tóth et al., 2010).

#### 3.5.2.2.3 Insular cortex

The c-Fos signal was enhanced in the insular cortices AI, GI and DI in residents of the RI groups. The insular cortices process general as well as specific viscer- and somatosensory information and integrate multi-modal sensory information and limbic information from the amygdala. Functions of the insular cortex are storage of fear memory, and responsiveness to aversive and emotional stimuli or stimuli that predict threat or loss (Brunzell and Kim, 2001; Cardinal, 2006; Rodgers et al., 2008; Shin and Liberzon, 2010). The perception of aversive stimuli, i.e., in the present case the odor, physical contact and/or vocal communication of a foreign intruder rat, induces an emotional evaluation process and memory formation. This recall over the course of the tests may have contributed to the activation of the insular cortex and subsequent increase in c-Fos labeling. At the same time, processing of fear or recall of fear memory is accompanied by stress reactions, and stress coping as well contributes to the increase of activation in AI (Funk and Stewart, 1996; Bruijnzeel et al., 1999; Yokoyama and Sasaki, 1999). This assumption is further substantiated by the fact that the AI is strongly connected with the mPFC, which is also involved in stress modulation (Heidbreder and Groenewegen, 2003; Gabbott et al., 2003). The dorsal and the ventral AI form the lateral prefrontal cortex and seem to directly influence behavior not related to aggression but to psychosocial encounters (Halász et al., 2006; Beiderbeck et al., 2012). The AI sparsely



projects to the hypothalamic attack area (Tóth et al., 2010), and the activation of AI mainly seems to depend on social contact rather than on aggressive behavior. This function might explain the absence of significant differences in activation of the AI between aggressive and non-aggressive residents of the present study.

#### 3.5.2.2.4 Amygdaloid region

In the present study, the increase of c-Fos activation in CeA and BLA was found in both non-aggressive and aggressive residents. A number of studies highlight the importance of the amygdala, especially of the CeA in highly aggressive violent attack (Halász et al., 2002a; Haller et al., 2006; Veenema and Neumann, 2007; Neumann et al., 2010). The finding of the present study that highly aggressive residents did not display violent attacks may explain the lack of increased c-Fos labeling in the CeA. Enhanced activation in CeA and BLA rather seem to result from activation of the stress axis caused by social encounter with an intruder rat. The most frequently used paradigm for social stress is social defeat, in which an intruder defending itself, and not the resident, is analyzed. This kind of social stress may be comparable with the stress of a resident, whose territory is endangered by an intruder. Social defeat led to increased Fos immunoreactivity in CeA and BLA after a single defeat as well as after repeated defeat (Martinez et al., 1998; Nikulina et al., 2008; Fekete et al., 2009). These results fit well with those of the present study, in which increased activation of amygdaloid nuclei was found after encounters in the RI-test. Besides modulation of social stress, BLA is also part of the impulse-control circuit (Chambers and Potenza, 2003; Winstanley et al., 2004; Winstanley, 2011), which is involved in regulation of aggressive behavior as well. However, the BLA was activated in both non-aggressive and aggressive rats, which makes it unlikely that the strength of activation in the BLA is purely linked to aggression.

In summary, the increased Fos activation in the OFC of non-aggressive and aggressive residents is most likely induced by its function in aggression and social risk assessment, and the occurrence of different behavioral patterns may depend on the activation of GABAergic or glutamatergic neurons. The increased activation of the mPFC is attributed to its role in the organization of behavioral adaptations and strategies. Its function in stress-related and aggressive behavior includes integration of external and internal stimuli and emotional memory formation used in conflict and/or stress management. The increased Fos activation in the CeA and BLA complies with findings from other studies suggesting social stress caused by encounters as a main factor, while non-social stress induced by cage transfer increased Fos activation in the orbital cortex as a result of environmental changes. Surprisingly, significant differences were not found in the activation patterns of limbic telencephalic areas between non-aggressive and aggressive rats. The individual intensity in the aggressive behavior of DA rats is either due to differential c-Fos activation of brain areas not investigated here or by differential activation of types of neurons, of transmitters and/or receptors inside the activated area, and not related to the simple number of activated cell nuclei.

---

## **4. Increased 5-HT<sub>1A</sub> receptor density in the neuronal network involved in regulation of stress responses in Dark Agouti rats after repeated territorial intrusion**

Carolin Arlt & Ursula Dicke

### **4.1 Abstract**

In the present study, the density of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor protein was studied by immunohistochemistry in brains of Dark Agouti rats after exposure to encounters in consecutive resident-intruder tests. The 5-HT<sub>1A</sub> receptor is assumed to be involved in control of stress responses, anxiety, impulsivity, and/or aggression. The density of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor protein was significantly higher in the orbitofrontal, prelimbic, and agranular insular cortex of low-aggressive and aggressive resident rats compared to controls. In subcortical areas, the central amygdala and the dorsal raphe nucleus displayed a significantly higher percentage in residents in addition. In all brain areas investigated, differences in densities were not significant between low-aggressive and aggressive residents, and this result suggests that in the majority of cases changes in receptor densities were not induced by the aggressive behavior displayed in the resident-intruder test. The findings indicate that brief exposure to encounters already leads to changes in the serotonergic system. Increases in the serotonergic receptor system of Dark Agouti rats are most likely due to mild social stress caused by territorial intrusion and might be considered as part of the neuronal mechanisms of stress-coping responses.

### **4.2 Introduction**

Serotonin (5-HT) plays a decisive role in the neurobiology of aggression. It seems to be involved in offensive, defensive, and predatory aggression more than any other molecule in

the brain (Olivier et al., 1995; Miczek et al., 2007). The 5-HT-deficiency hypothesis postulates that high trait aggression is associated with low 5-HT neurotransmission (Berman et al., 1997; de Boer and Koolhaas, 2005). Such a lowered 5-HT activity was found in the prefrontal cortex, septum, nucleus accumbens, and medial amygdala of dominant resident rats in aggressive confrontations (Blanchard et al., 1991; Blanchard et al., 1993; de Almeida and Lucion, 1997; van Erp and Miczek, 2000; de Boer et al., 2003; Ferrari et al., 2003; Caramaschi et al., 2007; Takahashi et al., 2011). Beside a decrease of 5-HT neurotransmission found in high or even escalated trait aggression, increased activation of 5-HT neurons in the dorsal raphe nucleus was observed in state aggression (van der Vegt et al., 2003a). These findings indicate a multifaceted role of 5-HT in aggressive behavior.

One important regulatory factor of the 5-HT system is the 5-HT<sub>1A</sub> receptor. This receptor is located presynaptically as an inhibiting autoreceptor on the soma and dendrites of 5-HT neurons in the raphe nuclei and postsynaptically on non-serotonergic neurons in telencephalic areas that receive 5-HT input (de Vry, 1995). The activation of autoreceptors via 5-HT or 5-HT<sub>1A</sub> agonists leads to direct inhibition of the firing rate of 5-HT neurons and in turn to decreased 5-HT release in projection areas, while postsynaptic receptors are part of an indirect inhibiting feedback loop acting onto the 5-HT neurons (Hamon et al., 1990; Hajos et al., 1999; Pineyro and Blier, 1999). Consequently, activation of both receptor sites leads to decreased 5-HT neurotransmission. Agonists of 5-HT<sub>1A</sub> receptors, specific pre- and postsynaptic agonists as well as non-specific ones had an anti-aggressive effect in rodents (Olivier et al., 1995; Miczek et al., 1998; de Boer et al., 1999; de Boer and Koolhaas, 2005). However, such an effect seemed to occur at doses that also affected non-aggressive behaviors like social and nonsocial exploration (Olivier et al., 1995; Olivier, 2004). A number of studies address the mRNA expression, sensitivity, and density of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in selected highly aggressive mice lines (Korte et al., 1996; Veenema et al., 2005; Caramaschi et al., 2007). These studies indicate an increased sensitivity as well as a higher density of 5-HT<sub>1A</sub>

receptors in selected highly aggressive mice compared to low-aggressive mice in the frontal cortex and lateral septum. It is therefore argued that differences in the function of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor are due to the co-selection of different phenotypes of aggressive behavior. However, alcohol-heightened aggressive mice and non-selected aggressive rats revealed also an enhanced sensitivity of the postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the frontal cortex and lateral septum compared to alcohol-non-heightened mice and low-aggressive rats, respectively (van der Vegt et al., 2001; Chiavegatto et al., 2010).

The study presented here aims to identify changes in 5-HT<sub>1A</sub> receptor density in male rats of the DA strain following exposures to social and/or agonistic encounters with male Wistar rats. Rats of the DA inbred strain do not exhibit stable trait aggression but variability in state aggression. Individuals respond to intruders with varying intensities of aggressive behavior across encounters (study 1: Arlt et al., 2013). The objective of the present investigation is to compare the density of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in limbic areas between non-manipulated controls and rats that performed a standard RI-test on four consecutive days. First, the results reveal whether exposure to an opponent induces changes in the receptor density in rats displaying non- or low-aggressive or aggressive behavior. Secondly, the findings provide information whether the encounter or the aggressive behavior leads to changes in receptor density, and which brain areas are involved. The results on the potential up- or down-regulation of receptor density will also give hints on the regulatory processes of 5-HT neurotransmission following social and/or aggressive encounters. The following areas of the limbic system (also investigated in study 1) were analyzed: the medial orbital (MO), ventral orbital (VO), lateral orbital (LO), prelimbic (PrL), and infralimbic cortex (IL), agranular insular (AI), granular insular (GI), and dysgranular insular cortex (DI), lateral septal nucleus intermediate part (LSI), lateral septal nucleus ventral part (LSV), accumbens nucleus core (AcbC), accumbens nucleus shell (AcbSh), central amygdaloid nucleus (CeA), basolateral amygdaloid nucleus (BLA), basomedial amygdaloid nucleus (BMA), lateral amygdaloid nucleus (La), medial

amygdaloid nucleus anterior part (MeA), and medial amygdaloid nucleus posterior part (MeP), and additionally the dorsal raphe nucleus (DR).

### 4.3 Material and methods

#### 4.3.1 Animals

Experiments were carried out on 18 male DA rats bred in our institute (stock of the University of Bremen). At the time of the experiment, rats were 14-20 weeks old, and weighted 260-340 g. Ten age matched female DA rats that underwent ligation of the oviduct were used as mates. Prior to the experiments, rats were kept in same-sex groups of five individuals in macrolon standard cages (54 x 36 x 21 cm). Food (10 H 10 standard food, Nohrlin GmbH, Bad Salzuflen, Germany) and water were available *ad libitum*, while temperature and relative humidity were kept at 21°C ( $\pm$  2°C) and 55% ( $\pm$  5%), respectively. Rats were maintained in a light cycle of 12 h with lights on at 07:00 h. Rats were habituated to a background noise by turning a radio on during light cycle. Twenty male age-matched Wistar rats were used as opponents in the RI-test. These rats were maintained under similar conditions, except for the food conditions, in a separate room. They were kept on a diet ( $12 \pm 2$  g/rat/day) to match the body weight of resident and intruder. Each intruder was used twice. The experiments were performed in accordance with the National Institutes of Health ethical guidelines for the care and use of laboratory animals for experiments.

#### 4.3.2 Experimental design

Rats of the control group (n=8; DA 1-8) were left undisturbed in their cages without any experimental exposure before sacrificing. Each RI group rat (n=10; DA 9-18) was housed together with a female DA rat in their so-called home cage (54 x 36 x 21 cm) for five days prior to testing and during the time of the experiment except for habituation to the test room

and testing. Rats underwent four RI-tests (RI 1-RI 4) on consecutive days. On the days of testing, the female rat was removed and the resident DA rat was kept singly in its home cage for 60 min. The resident was transferred in its home cage to the test room. A test room was chosen in order to prevent DA rats in the climatized room to become accustomed to rats of the Wistar strain, i.e., to the smell, vocal communication or view of the opponents. The temperature in the test room was set at 23°C, the luminance intensity 120 lx, and a radio was turned on. The cage of the intruder Wistar rat was placed in an anteroom of the test room. RI-tests took place in a random order during day time (09:00-13:00) and started with the placement of the intruder into the home cage of the resident. The duration of encounters was 10 min. The behavior shown in the RI-test was recorded by a video camera (DCR-TRV900E, Sony Corporation, Tokyo, Japan) through the transparent walls of the home cage. After removal of the intruder, the resident was kept again together with its female in the keeping room except for RI 4, after which the resident was sacrificed. Each resident was confronted only once with the same intruder. Intruders were used only two times to prevent habituation to the test situation. Residents of the two groups were decapitated using a small animal guillotine (Kent Scientific Corporation, Torrington, USA); the brains were quickly removed and processed as described below.

#### 4.3.3. Analysis of behavior

The behaviors recorded on a video were analyzed for agonistic behavior by two well-trained observers. Cronbach's  $\alpha$  for the inter-rater reliability of data ranged from 0.81 to 0.99. The duration of the offensive behavior (bite, chase, keep down, offensive upright), and the latency of the first bite attack were determined. Rats were classified into three different groups: (i) low aggressive, when <15% of time was spent in offensive behavior; (ii) intermediate aggressive, with 15-55% of time; (iii) highly aggressive, >55% of time (de Boer et al., 2003).

For the comparison of immunohistological staining, rats were defined as aggressive when they displayed highly aggressive and intermediate aggressive behavior each in at least one RI-test or intermediate aggressive behavior on at least three test days. Other rats were classified as low-aggressive.

#### 4.3.4 Histological processing of brains

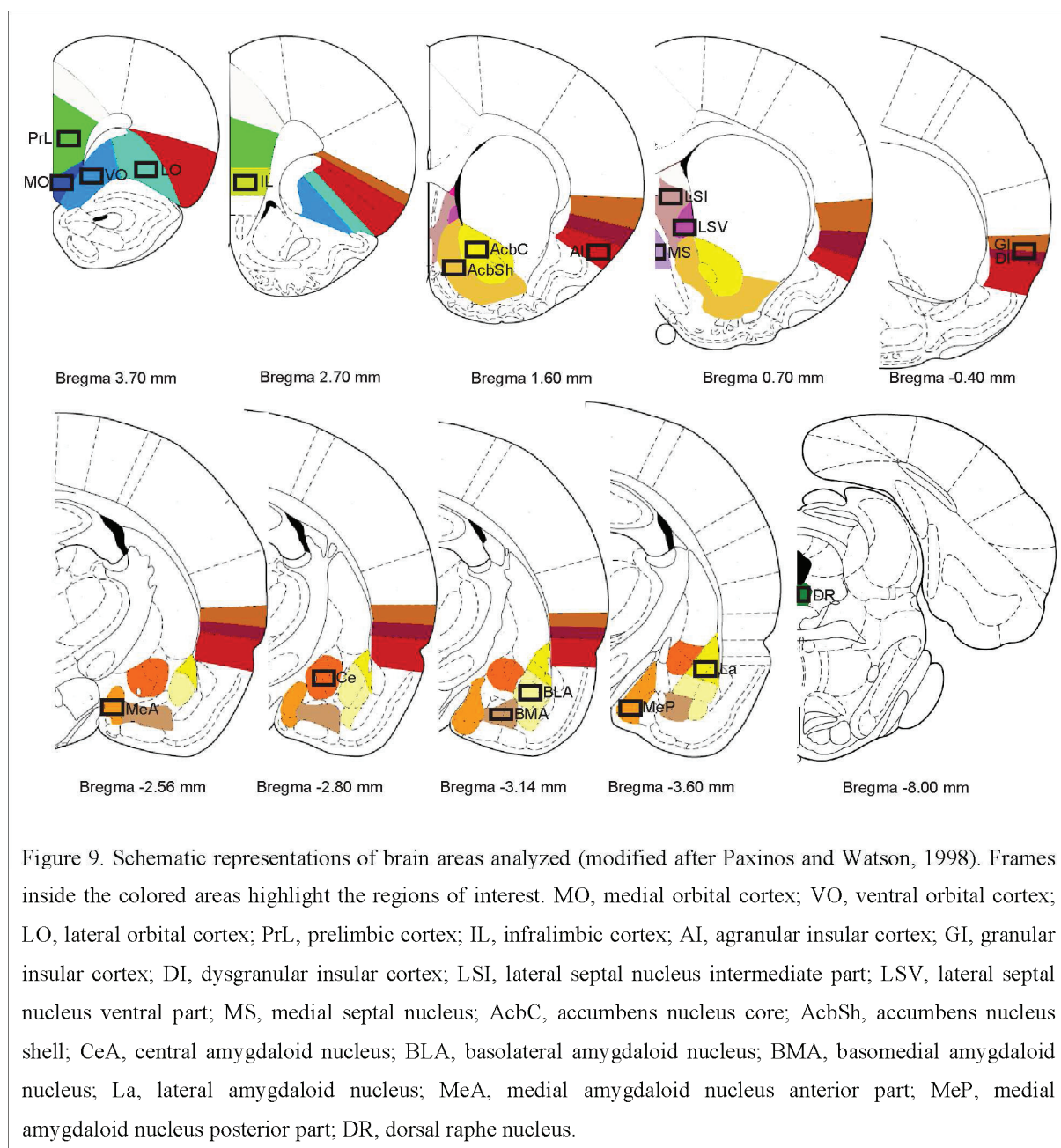
Brains were removed and fixed for 24 h in 4% paraformaldehyde (in 0.1 M phosphate buffer; PB, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Before sectioning, brains were cryoprotected in 30% sucrose in PB. Each brain was cut on a cryostat (CM 1850, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) into five series of 40  $\mu$ m sections; one series was used for immunohistochemical staining of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor protein. Sections were initially blocked in PB containing 5% normal goat serum and 0.3% Triton-X-100 for 1 h. The sections were incubated in a rabbit antibody raised against a region located in the large third intracellular loop of the rat 5-HT<sub>1A</sub> receptor protein (1:1,000; Millipore, Billerica, USA) for 2 days at 4°C. Thereafter, sections were washed in PB and incubated in biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:200; Vector Laboratories, Burlingame, USA) for 1 h at room temperature. After washing sections again in PB, they were exposed to an avidin-biotin complex (Vector Laboratories, Burlingame, USA) for 60 min and subsequently washed in PB. Staining was continued by incubation in PB containing diaminobenzidine (0.1 mg/ml; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), 0.003% cobalt chloride, 0.003% nickel sulfate and 0.015% hydrogen peroxide. Stained sections were mounted, dehydrated, and coverslipped.

#### 4.3.5 Quantification of 5-HT<sub>1A</sub> receptor protein staining

Each region of the brain (Fig. 9) was identified by the use of standard brain landmarks (Paxinos and Watson, 1998). Microscopic images were digitized by a digital camera



connected with a microscope (1300 x 1030 pixel; Axiocam, Zeiss, Göttingen, Germany). In each region three images were taken at a distance of 160  $\mu\text{m}$  between them. The region of interest was marked by a frame in the image using a computer program (Corel Photo-Paint X3, 2005, Corel Corporation, Munich, Germany). The size of the frame was 355  $\mu\text{m}$  x 280  $\mu\text{m}$ ; it was adapted to the smaller size of the CeA and MeP (274  $\mu\text{m}$  x 274  $\mu\text{m}$ ) and of the DR (177  $\mu\text{m}$  x 280  $\mu\text{m}$ ; Fig. 9). A defined threshold (25% darker than the background) was applied for identifying labeled receptors inside the frame of the image. Afterwards the image was converted into an 8-bit black-and-white image, and the percentage of black pixel was automatically analyzed by a computer program (Image J, Wayne Rasband, Institutes of Health, Bethesda, USA). Thereafter, the percentages of values of the three images of each region were averaged.



#### 4.3.6 Statistical analysis

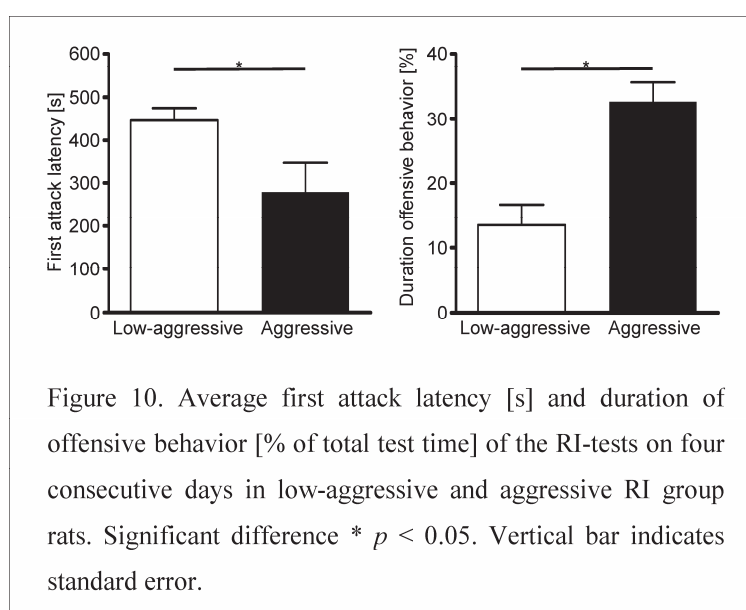
Statistical analysis was performed by SPSS software (SPSS Version 19, SPSS Inc., Chicago, USA). Distribution of data was analyzed for normality using the Shapiro-Wilk test. Non normally distributed data were transformed using the natural logarithm or square root to ensure normality as possible. Behavioral data of low-aggressive and aggressive RI group rats were tested for significance using the unpaired Student's t-test. The percentages of the values of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor protein in rats of the control group, and in low-aggressive and aggressive rats of the RI group were compared by analysis of variance (ANOVA). When

homogeneity of variance was given, the F-test was used; in case of heterogeneity of variance the Brown-Forsythe (BF) -test was applied. Post hoc analysis of inter-group differences was undertaken by the Gabriel (homogeneity of variance) or Tamhane-T2 (heterogeneity of variance) -test. The Student's t-test or Mann-Whitney U-test (non normally distribution or heterogeneity of variances) was applied when data of the control and the RI group rats were compared. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ . Data were expressed as means  $\pm$  standard error of the means (SEM).

## 4.4 Results

### 4.4.1 Offensive behavior in the resident-intruder test

The duration and pattern of aggressive behavior of RI group rats varied to a substantial degree among individuals. The time individuals spent in offensive behavior varied across test days. Only one resident was assigned to the same group in RI 1-4. In the remaining residents, the duration of aggressive behavior and thus, assignment to a group, differed over the successive RI-tests. Two out of ten rats displayed highly aggressive and intermediate aggressive behavior each in at least one RI-test and two displayed intermediate aggressive behavior in at least



three RI-tests. These rats were assigned to the aggressive group and spent 15.35 - 60.44% of time of RI 4 in aggressive behavior. The remaining rats (n=6) were classified as low-aggressive; the time spent in aggressive behavior in RI 4 was 0 - 29.44%. Across all RI-tests (RI 1-4) the first

attack latency was significantly shorter (on average  $279.19 \pm 69.45$  s) in rats defined as aggressive ones compared to low-aggressive rats ( $446.17 \pm 29.15$  s;  $p < 0.05$ ). Aggressive rats spent on average  $32.69 \pm 2.89\%$  of time of RI 1-4 in offensive behavior; this value was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than in low-aggressive rats which displayed aggressive behavior in  $13.84 \pm 3.22\%$  of time (Fig. 10).

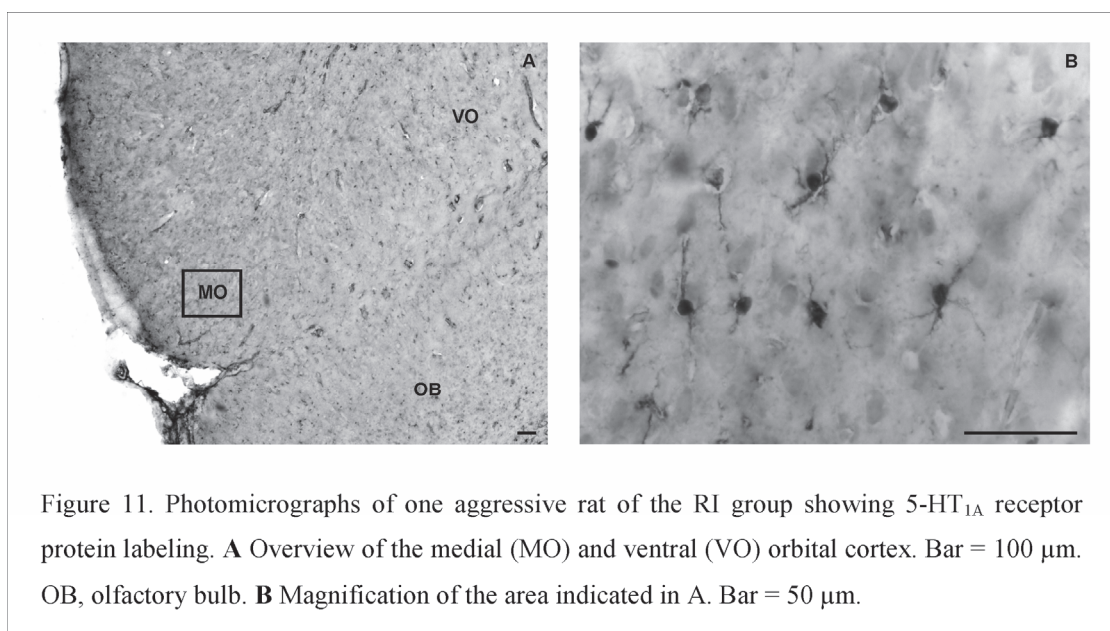
4.4.2 5-HT<sub>1A</sub> receptor density in limbic centers

Some of the areas studied did not reveal significant differences in the percentages of 5-HT<sub>1A</sub> receptor labeling in rats of the groups studied. These were the dysgranular cortex, the lateral and medial septum, the accumbens nucleus, and the basolateral, basomedial and medial amygdaloid nucleus.

**Table 2** Percentage of 5-HT<sub>1A</sub> receptor in limbic centers of the telencephalon.

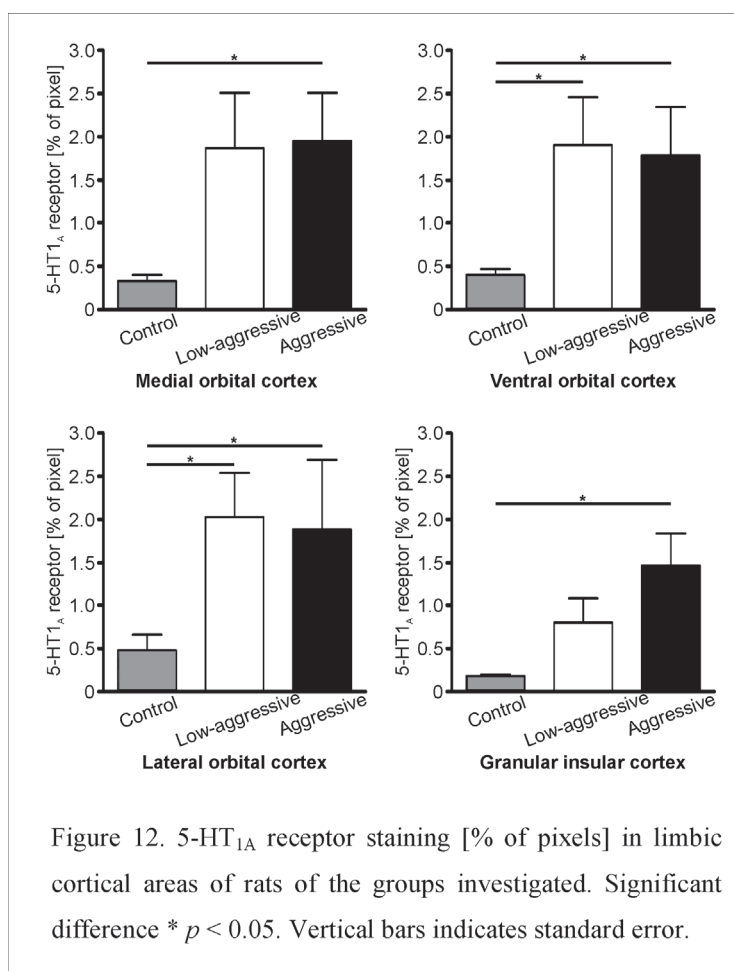
Brain region		Control (n=8)	Post hoc analysis		T-test
			Low-aggr <sup>a</sup> (n=6)	Aggr <sup>b</sup> (n=4)	RI group <sup>c</sup> (=10)
MO	Control	0.33 (± 0.07)	↑ <sup>d</sup>	↑ * <sup>e</sup>	↑ *
	Low-aggr		1.87 (± 0.64)	= <sup>f</sup>	
	Aggr			1.95 (± 0.56)	
	RI group				
VO	Control	0.40 (± 0.07)	↑ *	↑ *	↑ *
	Low-aggr		1.91 (± 0.55)	=	
	Aggr			1.79 (± 0.56)	
	RI group				
LO	Control	0.48 (± 0.18)	↑ *	↑ *	↑ *
	Low-aggr		2.03 (± 0.51)	=	
	Aggr			1.89 (± 0.80)	
	RI group				
PrL	Control	0.32 (± 0.04)	↑	↑	↑ *
	Low-aggr		1.98 (± 0.59)	=	
	Aggr			1.84 (± 0.34)	
	RI group				
AI	Control	0.19 (± 0.04)	↑	↑	↑ *
	Low-aggr		0.77 (± 0.26)	↑	
	Aggr			1.14 (± 0.55)	
	RI group				
GI	Control	0.18 (± 0.02)	↑	↑ *	1.07 (± 0.23)
	Low-aggr		0.80 (± 0.28)	↑	
	Aggr			1.47 (± 0.37)	
	RI group				
CeA	Control	0.42 (± 0.10)	↑	↑	↑ *
	Low-aggr		1.25 (± 0.47)	=	
	Aggr			1.51 (± 0.58)	
	RI group				
DR	Control	0.49 (± 0.06)	↑	↑	↑ *
	Low-aggr		2.52 (± 0.65)	=	
	Aggr			2.45 (± 1.18)	
	RI group				

<sup>a</sup> low-aggressive rats of the RI group; <sup>b</sup> aggressive rats of the RI group; <sup>c</sup> all rats of the RI group; <sup>d</sup> increase of percentage; <sup>e</sup>  $p < 0.05$ ; <sup>f</sup> equal



*Cortical areas*

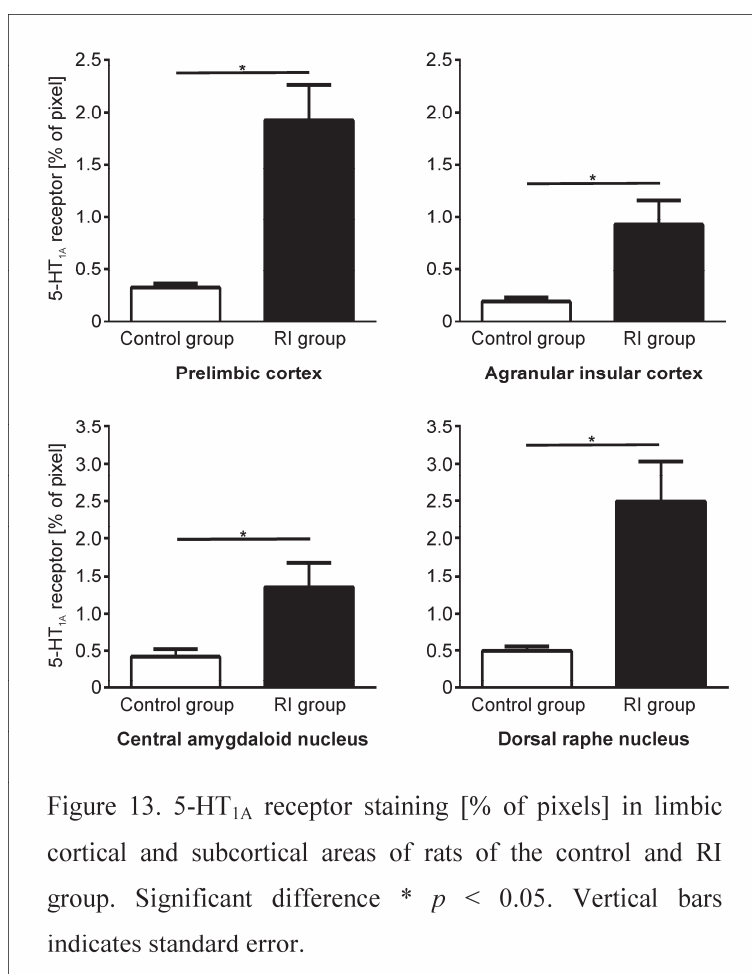
The areas stained for 5-HT<sub>1A</sub> receptors ranged between 0.18 and 2.03% of total pixel number in the limbic cortices studied. In brains of all rats investigated, the highest density of 5-HT<sub>1A</sub> receptor staining was found in the orbital cortex, followed by the prelimbic cortex. Low density of 5-HT<sub>1A</sub> receptor labeling occurred in the insular cortex. The percentages of 5-HT<sub>1A</sub> receptor labeling differed significantly between rats of the control group, the low-aggressive



rats of the RI group and the aggressive rats of the RI group in MO (BF=7.676), VO (F=7.233), LO (F=8.321), and GI (F=4.148). Post hoc analysis revealed that the density in VO and LO ( $p < 0.05$ ) was significantly higher in both low-aggressive and aggressive RI rats, and aggressive RI rats revealed significantly higher percentages of 5-HT<sub>1A</sub> receptor labeling in MO (Fig. 11) and GI ( $p < 0.05$ ) in addition when compared to controls (Tab. 2, Fig. 12). Data of low-aggressive and aggressive RI rats did not differ significantly in the areas studied (post hoc analysis,  $p > 0.5$ ), and therefore, data of RI group rats were pooled and compared with those of controls. Density of staining in the OFC (LO, MO, VO), the PrL, and the AI was significantly higher (t-test;  $p < 0.05$ ) in RI group rats when compared to controls (Tab. 2, Fig. 13).

*Subcortical areas and dorsal raphe nucleus*

5-HT<sub>1A</sub> receptor labeling ranged between 0.26 and 0.88% of total pixel number in controls; it was strongest in CeA ( $0.80 \pm 0.28\%$ ). The density of labeling in low-aggressive RI rats was higher than in controls, the percentage of labeled receptor protein ranged from 0.62 to 2.52% of total pixel number. The highest percentage was found in the DR ( $2.52 \pm 0.65\%$ ). In aggressive RI rats, the highest percentage of labeling was



found in all subcortical areas investigated except for area DR in which the percentage was higher in low-aggressive RI rats. The values in aggressive rats ranged from 1.23 to 2.45%, the latter value was again identified in the DR. Post hoc analysis did not reveal significant differences between the values of the three groups studied. However, pooled data of the RI residents differed significantly in areas CeA and DR ( $p < 0.05$ ) when compared to controls (Tab. 2; Fig. 13).

#### 4.5 Discussion

The present study aimed to reveal differences in 5-HT<sub>1A</sub> receptor density between controls, low-aggressive and aggressive rats of the DA inbred strain after exposure to four RI-tests on consecutive days in selected limbic cortical and subcortical areas. DA rats of the RI group were classified into a low-aggressive and aggressive group based on the duration of their offensive behavior in four RI-tests. These two groups differed significantly in first attack latency and duration of offensive behavior. ANOVA and post hoc analysis revealed a significant increase in 5-HT<sub>1A</sub> receptors of low-aggressive and aggressive RI group rats in cortical areas VO and LO, and in aggressive rats in MO and GI in addition when compared to controls. In subcortical areas, values did not differ among the three groups. Values between non-aggressive and aggressive rats did also not differ significantly in all brain areas studied. The pooled data of resident rats of the RI group compared to controls revealed significant differences in the OFC, PrL, and AI, and in the subcortical areas CeA and DR. These areas all take part in modulation of physiological and behavioral stress responses. Therefore, increased receptor density is most likely due to the social stress caused by territorial intrusion.



*Prefrontal cortex*

5-HT<sub>1A</sub> receptors are located presynaptically as autoreceptors in the raphe nuclei and postsynaptically in a large variety of telencephalic areas like the cortex, septum, hippocampus, and amygdaloid complex (de Vry, 1995). Therefore, the 5-HT<sub>1A</sub> receptor system is involved in a large number of functional systems. These concern the regulation of emotional and affective behaviors such as anxiety/fear, impulsivity, aggression, and stress reactions; this receptor system is further involved in depression and mood disorders (Koprowska et al., 2002; de Boer and Koolhaas, 2005; Popova, 2006; Holmes, 2008; Saha et al., 2010; McDevitt and Neumaier, 2011; Puig and Gullledgs, 2011; Shishkina et al., 2012). In the present study, parts of the frontal cortex revealed increased 5-HT<sub>1A</sub> receptor density in the resident rats. The prefrontal cortex of rats is divided into the OFC, mPFC, and IPFC cortex (Paxinos and Watson, 1998). These brain areas have strong inter-cortical connections and diverging but partially overlapping functions. The OFC (MO, VO, LO) is responsible for emotional and behavioral flexibility; it adjusts responses according to situations, and develops and maintains social interactions. Furthermore, it takes part in reversal learning, impulse control, and reward assessment (Dalley et al., 2004; Kolb et al., 2004; Rempel-Clower, 2007; Roesch et al., 2007; Perry et al., 2011). The mPFC (PrL, IL, cingulate cortex) is likewise involved in reward assessment. It has different higher-order functions like learning, memory, selective attention, decision making, and goal directed behavior, and further modulates autonomic and endocrine responses to stress (Dalley et al., 2004; Vertes, 2006; Kim and Haller, 2007; Czéh et al., 2008; Perry et al., 2011). The functions of the IPFC (dorsal and ventral AI) also include decision making processes, behavioral inhibition and attentional gating. In addition, it plays a role in specific regulation of autonomic emotional expression in relation to sensory cues (Dalley et al., 2004; Rempel-Clower, 2007; Perry et al., 2011). The postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptor is widely distributed in these prefrontal areas. In the PrL, 61% of the glutamatergic pyramidal neurons contain 5-HT<sub>1A</sub> mRNA and 20% of the GABAergic

interneurons contain 5-HT<sub>1A</sub> receptors (Santana et al., 2004), while others report that 94% of the parvalbumin containing interneurons express 5-HT<sub>1A</sub> receptors (Gui et al., 2011). In the pyramidal neurons, the highest concentration of 5-HT<sub>1A</sub> receptors was found in the proximal fragments of axons in the cingulate cortex and receptors were localized distally to the inhibitory GABAergic terminals; this suggests that they might control the excitability and information transmission of the pyramidal cells (Czyrak et al., 2003). Studies on adaptations in the 5-HT<sub>1A</sub> receptor density, expression or sensitivity mainly refer to the entire frontal cortex and data of the present investigation in distinct areas of the frontal cortex are therefore hard to compare.

A large number of studies concentrate on the influence of stress on 5-HT<sub>1A</sub> receptor density or function, and results were partly conflicting. Intense stress such as cat exposure (a rat model for post traumatic stress disorders), forced swimming and chronic restraint stress led to increased mRNA expression in the frontal cortex in the rat (Iyo et al., 2009; Campos et al., 2012; Shishkina et al., 2012). Mild stress exposure like social defeat in turn led to down-regulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors or reduced ligand binding in the frontal cortex of rats and tree shrews, respectively (Flügge et al., 1995; Kieran et al., 2010). Changes in the 5-HT<sub>1A</sub> system appear to depend on the type of stressor as well as on the duration of stress. In the present study, the 5-HT<sub>1A</sub> receptor density was up-regulated in frontal areas, and according to the above mentioned, data might indicate an intense stress experience of residents although the exposure to the stress was short in time.

Other studies concentrate on differences in 5-HT<sub>1A</sub> in rats bred for the absence of aggressiveness or high aggressiveness with respect to man or in selected low or highly aggressive mice. Aggressive rats revealed increased 5-HT<sub>1A</sub> receptor density and mRNA expression in the frontal cortex, but decreased ligand binding (Popova et al., 1997; Popova et al., 2005; Popova et al., 2007). Data on selected highly aggressive mice are inconsistent.

Korte et al. (1996) found increased 5-HT<sub>1A</sub> receptor ligand binding in the frontal cortex, whereas Veenema et al. (2004) did not find different effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists in low and highly aggressive mice. In the present study, differences in receptor density in prefrontal areas were not significant between low aggressive and aggressive residents. Therefore, the increase in receptor density appears to be based less on the execution of aggressive behavior but is rather caused by social stress experienced by encounters. As mentioned above, social defeat as a model for social stress led to down-regulation of the receptor in the frontal cortex, whereas in resident RI rats an increase was observed. In the RI paradigm, activation of areas involved in territorial and dominance defense and in stress experience may together induce the increase of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor density.

### *Amygdala*

Beside prefrontal areas the subcortical central amygdaloid nucleus revealed a significant increase in 5-HT<sub>1A</sub> receptor density in resident rats. The CeA receives strong input of areas that perceive information on the environment and converts this sensory information into appropriate behavioral and physiological responses. It is considered to be the main output nucleus for autonomic expression of fear and anxiety and is together with the mPFC involved in stress-related reactions (Morilak et al., 2003; Davis and Shi, 2006; Kim and Haller, 2007; Gilpin, 2012). In the CeA, 30% of ipsilateral neurons that project to the dorsomedial medulla oblongata revealed 5-HT<sub>1A</sub>-positive immunoreactivity (Saha et al., 2010); little information exists on the regulatory function of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the CeA. Acute administration of 5-HT<sub>1A</sub> agonists led to decreased 5-HT neurotransmission and increased Fos immunoreactivity in the CeA, whereas chronic administration led to increased 5-HT activity (Compaan et al., 1996; Nishi et al., 2009). After co-administration of the selective serotonin reuptake inhibitor citalopram and the 5-HT<sub>1A</sub> antagonist WAY-100635, Fos immunoreactivity

increased as well (Jongsma et al., 2003). Studies on the receptor density or function refer either to the whole amygdaloid complex or to the basolateral or basomedial amygdaloid nuclei. In Norwegian rats selected for absence or presence of aggressiveness with respect to man, an increase of 5-HT<sub>1A</sub> receptor density and mRNA expression but a decrease in ligand binding was found in the amygdaloid complex of aggressive rats (Popova et al., 1997; Popova et al., 2005; Popova et al., 2007). In the present study, an increase of the receptor density was also found, but it was restricted to the central amygdala and was found in aggressive and in non-aggressive rats. This result is difficult to compare because of the different functions of the amygdaloid subnuclei. In DA rats, a higher anxiety level was found compared to other strains, which was significantly reduced by handling (Mechan et al., 2002; Roy and Chapillon, 2004). In these different behavioral contexts when stress-like events and anxious behavior are concerned, the amygdala appears to be one of the major targets for adaptations of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor system. The increase in receptor density might induce changes in serotonergic transmission, which in turn leads to a more stress-robust or a less anxious behavior

#### *Dorsal raphe nucleus*

Approximately 50% of serotonergic neurons in the rat brain are localized in the DR, the largest 5-HT containing nucleus. However, less than 50% of DR neurons are serotonergic and a substantial number of other neurotransmitter and neuropeptides modulate these serotonergic neurons. The DR is involved in nociception and responses to stress (Waselus et al., 2011); it has strong reciprocal connections with the prefrontal cortex as well as with the amygdala. A larger number of studies focused on the function of the presynaptic 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor, and the data are inconsistent and partly conflicting. In aggression research, Cooper et al. (2009) found increased 5-HT<sub>1A</sub> mRNA in the DR of aggressive hamsters compared with submissive ones. However, aggressive rats revealed decreased sensitivity and a reduction of 5-HT<sub>1A</sub>

mRNA in the DR (Popova et al., 2005; Popova et al., 2007), while in selected low and highly aggressive mice differences in 5-HT<sub>1A</sub> receptor function were not found (Korte et al., 1996; Veenema et al., 2004). Our data, with an increase of receptor density in both aggressive and non-aggressive rats, yield another picture. Such conflicting results also concern studies on the influence of stress on adaptations of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the DR; and as already reported for other brain areas, the nature and duration of stress seems to be critical for changes in 5-HT<sub>1A</sub> receptor density or function. Long-time forced swimming, single prolonged stress as well as administration of corticotrophin-releasing factor led to increased 5-HT<sub>1A</sub> ligand binding and mRNA expression in rats (Tejani-Butt and Labow, 1994; Raghupathi and McGonigle, 1997; Clark et al., 2007; Luo et al., 2011). Other forms of stress such as uncontrollable, unpredictable and inescapable stress as well as early deprivation desensitize the 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor or decrease the receptor-binding capacity and receptor density (Laaris et al., 1997; Maier and Watkins, 2005; Bambico et al., 2009; Leventopoulos et al., 2009; Rozeske et al., 2011). In the present case, the repeated brief exposure to an opponent increased the receptor density in the DR, which most likely is not related to the nociceptive function of the DR, because attacks of the intruder towards residents did not occur. It rather is related to the stress event of the encounter and thus constitutes a stress response.

In summary, repeated territorial intrusion lead to increased 5-HT<sub>1A</sub> receptor density in low-aggressive and aggressive residents compared to controls. These changes were most likely not induced by aggressive behavior, because in the majority of areas no differences were found between low-aggressive and aggressive rats. The density of postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the prefrontal cortex and the CeA as well as that of presynaptic autoreceptors in the DR was increased; such an increase is reported to lead in turn to decreased 5-HT neurotransmission of neurons (Hamon et al., 1990; de Vry, 1995; Hajos et al., 1999; Pineyro and Blier, 1999). Such a decrease in neurotransmission was found in aggressive behavior (Blanchard et al., 1991; Blanchard et al., 1993; de Almeida and Lucion, 1997; van Erp and Miczek, 2000; de Boer et

al., 2003; Ferrari et al., 2003; Caramaschi et al., 2007; Caramaschi et al., 2008; Takahashi et al., 2011), and in responses to stress as well (Tejani-Butt and Labow, 1994; Raghupathi and McGonigle, 1997; Vicentic et al., 2006; Clark et al., 2007; Iyo et al., 2009; Luo et al., 2011; Campos et al., 2012; Shishkina et al., 2012). We conclude that brief exposure to an opponent represents a form of social stress. The increased receptor density in brain areas involved in behavioral flexibility and modulation of behavioral responses to stress might be a part of the neuronal mechanisms of stress-coping responses and lead to a more stress-robust future behavior.

## **5. Die soziale *Instigation* führt zu erhöhter Aggressivität ohne eskalierte Aggressionsmuster und steigert die Fos-Aktivierung im neuronalen Netzwerk der Stressbewältigung**

Carolin Arlt & Ursula Dicke

### **5.1 Zusammenfassung**

Aggressives Verhalten ist ein biologisch adaptives Verhalten, das auf speziesspezifischen Regeln beruht. Werden diese Regeln missachtet, kann es zu ernsthaften Verletzungen kommen; man spricht von eskalierter oder abnormaler Aggression. Bei Nagern untersucht man eskaliertes aggressives Verhalten unter anderem mittels der so genannten sozialen *Instigation*. Diese beruht auf einer Provokationsphase, in der dem Versuchstier ein Kontrahent dargeboten wird, der zwar gesehen und gerochen jedoch nicht angegriffen werden kann. Um den Effekt der sozialen *Instigation* auf männliche Ratten des DA Stammes zu untersuchen, wurde solch eine 5minütige Provokationsphase vor einem Standard Bewohner-Eindringling (*Resident-Intruder*) -Test eingeführt. Es wurde die Auswirkung auf kampfunerfahrene und kampferfahrene Ratten untersucht. Des Weiteren wurden die Auswirkungen der Provokationsphase auf die c-Fos-Aktivierung in limbischen telenzephalen Hirngebieten aggressiver Ratten im Vergleich zu aggressiven Ratten, die keine Provokationsphase durchliefen, analysiert. Ratten beider Gruppen wurden vor und während der Versuchswochen mit einem weiblichen Partnertier gehalten und absolvierten mehrere RI-Tests an aufeinander folgenden Tagen. Die soziale *Instigation* führte nur bei Ratten mit vorheriger Kampferfahrung zu einer verkürzten Angriffslatenz und verlängertem aggressiven Verhalten; eskalierte Aggressivität wurde nicht hervorgerufen. Des Weiteren verringerte sich der Effekt der Provokationsphase im Laufe von drei Versuchstagen. Die c-Fos-Aktivierung reflektierte den momentanen Einfluss der Provokationsphase. Die nachgewiesenen Erhöhungen im

orbitofrontalen und lateralen präfrontalen Kortex sowie der medialen Amygdala scheinen am ehesten mit dem erhöhten Stress und der damit verbundenen Stressbewältigung während der Provokationsphase einherzugehen und nicht mit dem aggressiven Verhalten. Der erhöhte Stress könnte durch die Unterdrückung des direkten Angriffs- oder Dominanzverhaltens entstanden sein.

## 5.2 Einleitung

Aggressivität ist ein natürliches Verhalten, das eingesetzt wird um Vorteile wie soziale Dominanz und den damit verbundenen Zugang zu Ressourcen zu erlangen. Zur Vermeidung ernsthafter Verletzungen werden aggressive Verhaltensweisen häufig durch weniger gefährliche Handlungen und Drohgebärden ersetzt. Aggression ist somit ein biologisch adaptives Verhalten mit speziesspezifischen Regeln (Benus et al., 1991; Bushmann und Anderson, 2001; Martinez et al., 2002; Miczek et al., 2003; Miczek et al., 2004; de Almeida, 2005; Haller und Kruk, 2006). Werden diese Regeln missachtet, kann es zum eskalierten aggressiven Verhalten und ernsthaften Schädigungen anderer kommen (Volavka, 1999). Eskalierte Aggression geht einher mit dem Verlust von kommunikativen Funktionen und der inhibitorischen Kontrolle. Soziale Signale der Kontrahenten wie unterwürfige Haltungen führen nicht mehr zur Unterbrechung der Attacken. Stark verkürzte Angriffslatenzen, häufigere und intensivere Angriffe sowie Angriffe auf verletzbare Körperteile wie den Kopf, die Kehle oder den Bauch sind Bestandteile von abnormalen Aggressionsmustern. Des Weiteren attackieren Angreifer Weibchen, Jungtiere und sogar anästhesierte Artgenossen (Miczek et al., 2003; Miczek et al., 2004; de Almeida, 2005; Haller und Kruk, 2006; Miczek et al., 2013).

Diese abnormale Aggression wurde an Mäusen, gezüchtet auf eine kurze Angriffslatenz, übererregten (*hyperarousal*) Ratten mit sozialer Isolation nach dem Absetzen vom Muttertier,



untererregten (*hypoarousal*) Ratten ohne Nebenniere und Ratten, gezüchtet auf geringe Ängstlichkeit, untersucht (Halász et al., 2002a; Haller et al., 2005; Haller et al., 2006; Halász et al., 2006; Tulogdi et al., 2010; Beiderbeck et al., 2012; Tóth et al., 2012). Neben der gezielten Selektion und Langzeitmanipulationen des Verhaltens oder der Physiologie wurde eskaliertes aggressives Verhalten in Kurzzeitverhaltensversuchen unter Alkoholeinfluss, bei gezielt ausgelöster Frustration oder durch soziale *Instigation* provoziert. Die soziale *Instigation* wird auch als *Attack Priming* bezeichnet und führt zur so genannten aggressiven Erregtheit (*aggressive arousal*) bei Mäusen, Hamstern und Ratten. Die aggressive Erregtheit führt bei Nagetieren zu einer verkürzten Angriffslatenz, erhöhten Dauer des offensiven Verhaltens und gesteigerter Anzahl von Angriffen bzw. Drohungen. Sie wirkt sich ausschließlich auf das aggressive Verhalten aus; andere Verhaltensweisen werden nicht beeinflusst (Potegal, 1991; Potegal, 1992; Miczek et al., 2002; Miczek et al., 2003; de Almeida 2005). In der vorliegenden Studie führten wir vor einem Standard Bewohner-Eindringling-Test eine 5minütige Provokationsphase ein. Während dieser Provokationsphase konnten die Bewohner den Eindringling durch eine perforierte Trennscheibe aus Plexiglas sehen und riechen, aber nicht direkt mit ihm in Kontakt treten bzw. ihn attackieren. Hierdurch sollte untersucht werden, ob die soziale *Instigation*, also eine Provokationsphase unmittelbar vor einem Standard RI-Test, bei DA Ratten mit und ohne vorherige offensive Erfahrung zu eskaliertem aggressiven Verhalten führt. Bei Ratten des Laborstammes Long Evans führte die soziale *Instigation* verlässlich zu einer verkürzten Angriffslatenz, jedoch nicht zu abnormaler Aggression (Potegal, 1992). Während Long Evans Ratten wenig bis mäßig aggressives Verhalten, definiert aufgrund dessen Dauer, zeigten (de Bruin, 1990; de Boer et al., 2003), verhielten sich Individuen des DA Stammes hoch aggressiv (Radant, 2009; Studie 1: Arlt et al., 2013). Daher soll untersucht werden, ob die soziale *Instigation* auf DA Ratten einen stärkeren Effekt hat und eskalierte Aggression auslöst. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Studie ist die Untersuchung von limbischen telenzephalen Hirngebieten. Mittels

Immunhistochemie soll die Expression des *Immediate Early Genes* c-Fos, einem Marker für neuronale Aktivierung (Sagar et al., 1988; Hughes und Dragunow, 1995), unter Einfluss einer Provokationsphase in Gehirnen von aggressiven Bewohnern im Vergleich zu aggressiven Bewohnern, die keine vorherige Provokation durchliefen, untersucht werden. In anderen Studien führte die eskalierte Aggression zu einer erhöhten neuronalen Aktivierung im OFC, mPFC und in der zentralen Amygdala. Des Weiteren wurde eine verringerte Aktivierung des lateralen Septums gefunden (Haller et al., 2006; Halász et al., 2006; Beiderbeck et al., 2012; Tóth et al., 2012). Ratten des DA Stammes zeigten nach sozialen und agonistischen Konfrontationen ohne abnormales aggressives Verhalten eine signifikant erhöhte c-Fos-Expression im OFC, mPFC und insulären Kortex sowie der zentralen und basolateralen Amygdala im Vergleich zu Kontrollratten (Studie 1: Arlt et al., 2013). In Bezug auf die oben genannten Studien und Studie 1 wurden folgende Hirnareale untersucht: medialer orbitaler Kortex (MO), ventraler orbitaler Kortex (VO), lateraler orbitaler Kortex (LO), prälimbischer Kortex (PrL), infralimbischer Kortex (IL), agranulärer insulärer Kortex (AI), granulärer insulärer Kortex (GI), dysgranulärer insulärer Kortex (DI), laterales Septum intermediärer Teil (LSI), laterales Septum ventraler Teil (LSV), zentrale Amygdala (CeA), basolaterale Amygdala (BLA), basomediale Amygdala (BMA), laterale Amygdala (La), mediale Amygdala anteriorer Teil (MeA) und mediale Amygdala posteriorer Teil (MeP).

## **5.3 Material und Methoden**

### **5.3.1 Versuchstiere**

Als Versuchstiere dienten 17 männliche DA Ratten, die im Institut für Hirnforschung der Universität Bremen gezüchtet wurden. Zum Zeitpunkt der Experimente waren die Tiere zwischen 14-24 Wochen alt und wogen 260-350 g. Siebzehn sterilisierte DA Weibchen des gleichen Alters wurden als Partnertiere genutzt. Als Kontrahenten im RI-Test dienten 34 männliche Wistar Ratten (Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland); Alter und Gewicht

der Wistar Ratten wurden an das der DA Ratten angepasst. Vor Beginn der Experimente erfolgte die Haltung der Ratten in gleichgeschlechtlichen Gruppen von fünf Tieren in Macrolon Standardkäfigen (54 x 36 x 21 cm). Die DA und Wistar Ratten wurden in getrennten Haltungsräumen untergebracht. Beide Räume wiesen eine Temperatur von 21°C ( $\pm$  2°C) und eine Luftfeuchtigkeit von 55% ( $\pm$  5%) auf. Die Tiere wurden in einem 12 h Hell-Dunkel-Zyklus gehalten, dessen Lichtphase um 7 Uhr begann. Zur Gewöhnung an beständige Hintergrundgeräusche wurde während der Hellphase ein Radio eingeschaltet. Den DA Ratten standen Futter (10 H 10 Standardfutter, Nohrlin GmbH, Bad Salzuflen, Deutschland) und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Um das Gewicht von Bewohner und Eindringling aneinander anzugleichen, wurden die Wistar Ratten rationiert gefüttert ( $12 \pm 2$  g/Ratte/Tag). Die Experimente entsprachen den Richtlinien des Tierschutzgesetzes und den internationalen Gesetzen für Tierversuche.

### 5.3.2 Versuchsaufbau

Die 17 männlichen DA Ratten wurden in zwei Gruppen unterteilt: (i) eine RI-Gruppe/Studie 1 und (ii) eine Provokations-Gruppe. Die Versuche und Auswertung zur RI-Gruppe wurden im Rahmen der Studie 1 (*„Behavior in inter-male encounters is associated with increased c-Fos activation in the frontal cortex and the central and basolateral amygdaloid nuclei of Dark Agouti rats“*) dieser Dissertation durchgeführt. Erhobene Daten dieser Gruppe dienten als Vergleichsdaten für die c-Fos-Anfärbung der Provokations-Gruppe; auf die Verhaltensdaten der RI-Gruppe wird nur in Hinsicht auf die Gruppeneinteilung als „aggressive Bewohner“ eingegangen. Die Ratten beider Versuchsgruppen wurden für fünf Tage vor und während der Zeit der Verhaltensversuche zusammen mit einem weiblichen Partnertier im so genannten Heimkäfig (54 x 36 x 21 cm) gehalten. (i) An den Tagen der Verhaltensversuche wurde das Weibchen aus dem Heimkäfig entnommen und die Männchen der RI-Gruppe/Studie 1 für 60

min einzeln gehalten. Im Anschluss wurde der Käfig in den Versuchsraum transportiert. Der Heimkäfig des Bewohners war der einzige Käfig im Versuchsraum; der Käfig des Wistar Eindringlings wurde in einem Vorraum platziert. Die Temperatur im Versuchsraum betrug 23°C, die Lichtintensität 120 lx und ein Radio war eingeschaltet. Die RI-Tests wurden in randomisierter Reihenfolge während der Hellphase (09:00-13:00) durchgeführt. Jedes DA Männchen der RI-Gruppe/Studie 1 durchlief vier RI-Tests an aufeinander folgenden Tagen, wobei jeder Bewohner nur einmal mit dem gleichen Eindringling konfrontiert wurde. Um einen Gewöhnungseffekt auszuschließen, wurde jeder Eindringling maximal in zwei RI-Tests eingesetzt. Der RI-Test begann mit dem Platzieren des Eindringlings in den Heimkäfig des Bewohners und dauerte 10 min. Das in dem 10minütigen RI-Test gezeigte Verhalten wurde mit einer Videokamera (DCR-TRV900E, Sony Corporation, Tokio, Japan) durch die transparente Seitenwand des Heimkäfigs aufgezeichnet. Mit Ausnahme des vierten RI-Tests (RI 4) wurde der Bewohner nach der Entnahme des Eindringlings wieder mit seinem weiblichen Partnertier im klimatisierten Raum gehalten. Nach RI 4 blieb der Bewohner für 60 min ungestört, bevor er dekapitiert wurde. (ii) Ratten der Provokations-Gruppe wurden während der 5tägigen Haltung mit dem weiblichen Partnertier täglich für 2 h an einen Plexiglas Käfigdeckel gewöhnt. Dieser Käfigdeckel diente in den späteren Provokationsversuchen zur Trennung des Heimkäfigs in zwei Untereinheiten. An den Versuchstagen wurden die Weibchen aus den Heimkäfigen entnommen. Direkt nach Entnahme der Weibchen wurde der Heimkäfig mit dem Plexiglas Käfigdeckel ausgestattet und der Bewohner für 60 min einzeln gehalten. Im Anschluss wurde der Heimkäfig in den Versuchsraum transportiert und mittels einer durchsichtigen, perforierten Plexiglas Trennscheibe in zwei Untereinheiten unterschiedlicher Größe (große Untereinheit: 33 x 36 cm; kleine Untereinheit: 20 x 36 cm) unterteilt. Die Provokationsphase begann mit der Platzierung des Eindringlings in die kleine Untereinheit; der Bewohner befand sich in der großen Untereinheit. Während der 5minütigen Provokationsphase konnte der Bewohner den

Eindringling sehen und riechen; direkter physikalischer Kontakt war nicht möglich. Nach 5 min wurde die Trennscheibe entfernt und eine 5minütige direkte RI-Konfrontation durchgeführt. Jeder Bewohner wurde nur einmal mit dem gleichen Wistar Eindringling konfrontiert. Jeder Eindringling wurde in maximal fünf RI-Tests eingesetzt. Pro Woche durchliefen die Eindringlinge maximal zwei RI-Tests zwischen denen mindestens ein Tag zur Regeneration lag. Das gezeigte Verhalten während der direkten Konfrontation wurde mit der Videokamera durch die transparente Seitenwand des Heimkäfigs aufgezeichnet. Ratten der Provokations-Gruppe durchliefen drei Versuchswochen mit jeweils drei aufeinander folgenden Versuchstagen. In der ersten und der letzten Versuchswoche fand vor jeder direkten Konfrontation eine Provokationsphase statt. In der zweiten Versuchswoche wurden drei 10minütige Standard RI-Tests durchgeführt (Tab. 3). Zur Untersuchung des Einflusses der Provokationsphase auf das aggressive Verhalten dienten die gesammelten Daten aus den drei Standard RI-Tests ohne vorherige Provokation als Referenzwerte. Nach den drei Versuchstagen der ersten und der zweiten Versuchswoche hatten die Tiere vier Tage zur Regeneration. Mit Ausnahme des neunten Versuchstages wurde der Käfigdeckel im Anschluss an den Verhaltensversuch wieder ausgetauscht und der Bewohner mit seinem weiblichen Partnertier im klimatisierten Raum gehalten. Nach dem neunten Verhaltensversuch blieb der Bewohner für 60 min ungestört, bevor er dekapitiert wurde. Die Ratten beider Gruppen wurden mit einer Kleintierguillotine (Kent Scientific Corporation, Torrington, USA) dekapitiert. Die Gehirne wurden schnellstmöglich entnommen und wie unten beschrieben aufgearbeitet.

**Tabelle 3.** Zeitplan des Versuchsablauf der Provokations-Gruppe

	1. Versuchswoche				2. Versuchswoche				3. Versuchswoche			
RI-Test	1	2	3	Reg. <sup>a</sup>	4	5	6	Reg.	7	8	9	Dek. <sup>b</sup>
Prov. <sup>c</sup>	+ <sup>d</sup>	+	+		- <sup>e</sup>	-	-		+	+	+	

<sup>a</sup> 4tägige Regeneration; <sup>b</sup> Dekapitierung; <sup>c</sup> Provokation; <sup>d</sup> mit vorheriger Provokationsphase; <sup>e</sup> ohne vorherige Provokationsphase

### 5.3.3 Verhaltensanalyse

Zur besseren Vergleichbarkeit mit der 5minütigen direkten RI-Konfrontation im Provokationstest wurden die Standard RI-Tests in zwei 5 min Intervalle unterteilt. Das erste 5minütige Intervall des Standard RI-Tests wurde später mit der direkten RI-Konfrontation verglichen. Während der direkten Konfrontation wurden die Latenz bis zur ersten Beißattacke und die Dauer des offensiven Verhaltens gemessen. Das offensive Verhalten umfasste Beißattacken, seitliche Drohungen, offensives Aufrichten, Jagen und das auf den Boden drücken des Eindringlings. Ferner wurden nicht-speziesspezifische Verhaltensweisen protokolliert. Diese umfassten Beißattacken gegen Kopf, Bauch oder Kehle und die Missachtung unterwürfiger Verhaltensweisen. Beruhend auf der Dauer des offensiven Verhaltens wurden die Bewohner in drei Klassen unterteilt: (1) wenig aggressiv, Ratten investierten <15% der Zeit in offensives Verhalten; (2) mäßig aggressiv, Ratten verbrachten 15-55% der Zeit mit offensivem Verhalten und (3) hoch aggressiv, >55% der Zeit (de Boer et al., 2003).

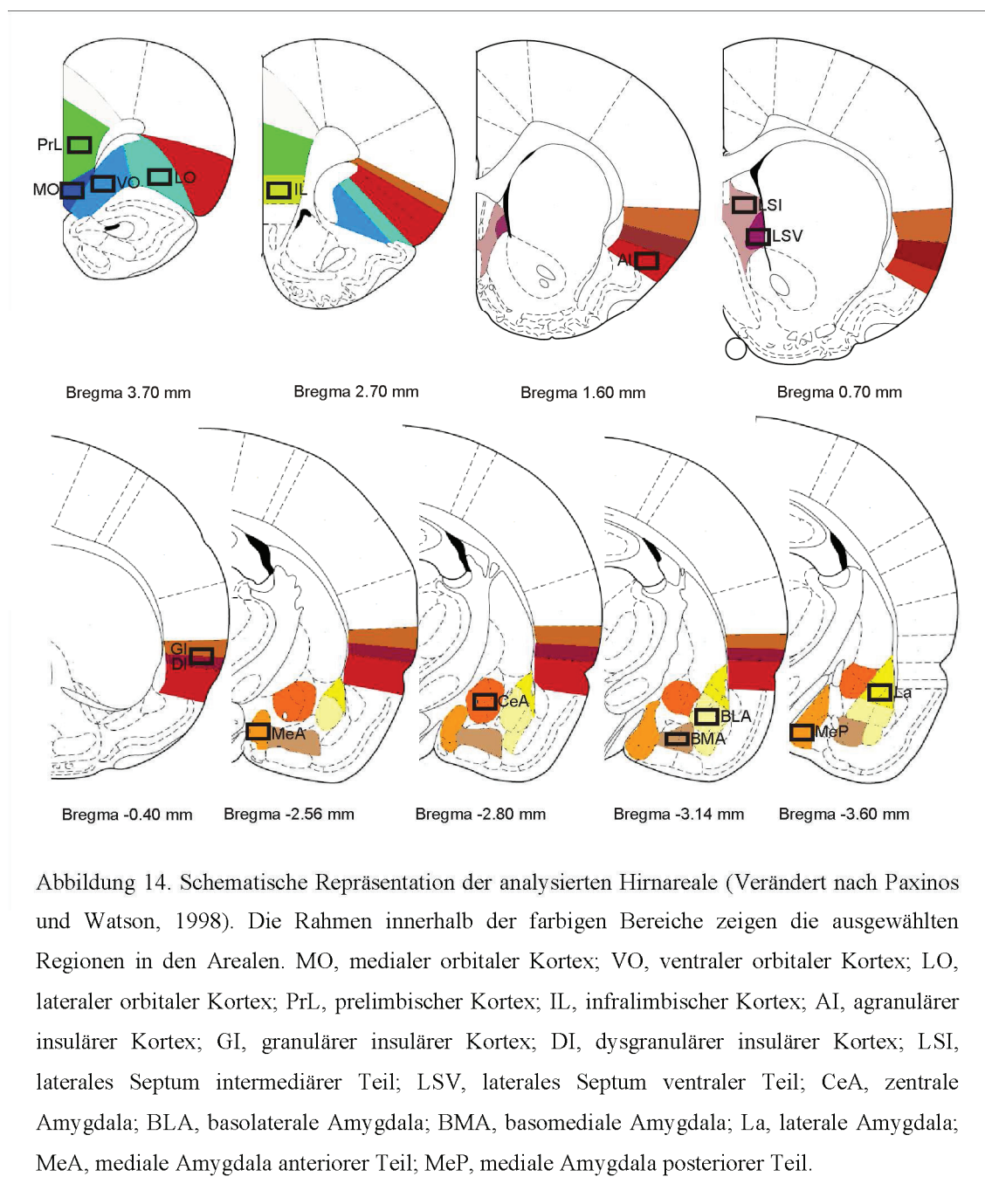
### 5.3.4 Histologische Aufarbeitung der Gehirne

Nach RI 4 (RI-Gruppe/Studie 1) bzw. RI 9 (Provokations-Gruppe) wurden die Bewohner dekapitiert und ihre Gehirne entnommen. Im Anschluss wurden die Gehirne für 24 h in 4% Paraformaldehyd (in 0,1 M Phosphatpuffer; PB; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) fixiert. Vor dem Schneiden wurden die Gehirne in 30% Saccharose inkubiert, um Gefrierschäden am Gewebe zu vermeiden. Mittels eines Kryostats wurden 40 µm dicke Schnitte angefertigt (CM 1850, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland). Jedes Gehirn wurde in fünf Serien geschnitten, von denen eine für den c-Fos-Nachweis genutzt wurde. Zu Beginn wurden die Schnitte in 1,5% Normal Goat Serum und 0,3% Triton-X-100 in PB für 60 min geblockt und anschließend im Rabbit Anti-c-Fos Antikörper (1:2.000; K-25, Santa Cruz

Biotechnology, Dallas, USA) für 2 Tage bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Schnitte in PB gewaschen und in biotinyliertem Goat Anti-rabbit IgG (1:400; Vector Laboratories, Burlingame, USA) für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen in PB wurden die Schnitte für 60 min einem Avidin-Biotin-Komplex (Vector Laboratories, Burlingame, USA) ausgesetzt und anschließend wieder in PB gewaschen. Die Anfärbung wurde durch die Inkubation in PB mit Diaminobenzidin (0,2 mg/ml; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 0,003% Kobaltchlorid, 0,003% Nickelsulfat und 0,03% Wasserstoffperoxid fortgesetzt. Die angefärbten Schnitte wurden aufgezogen, dehydriert und eingedeckt.

### 5.3.5 Quantifikation der c-Fos-positiven Zellkerne

Die untersuchten Hirngebiete (Abb. 14) wurden mit Hilfe von standardisierten Landmarken identifiziert (Paxinos und Watson, 1998). Die mikroskopischen Bilder wurden mittels einer Digitalkamera, die mit dem Mikroskop verbunden war, digitalisiert (1300 x 1030 Pixel; Axiocam, Zeiss, Göttingen, Deutschland). Mit Hilfe eines Computerprogramms wurden ausgewählte Regionen innerhalb der untersuchten Areale durch einen Rahmen markiert (Corel Photo-Paint X3, 2005, Corel Corporation, München, Deutschland). Die Größe des Rahmens betrug 355 x 280 µm. Dieser wurde an die kleinere Größe der CeA und MeP (274 µm x 274 µm) und der BMA (274 µm x 220 µm) angepasst (Abb. 14). Gefärbte Zellkerne wurden gewertet, wenn sie dunkler als 25% des Hintergrundfarbwertes waren. Zudem mussten sie mindestens eine Größe von fünf Pixeln aufweisen. Zellkerne, die den Bedingungen entsprachen, wurden durch ein Computer Programm rot gefärbt (Image J, Wayne Rasband; Institutes of Health, Bethesda, USA) und gezählt.



### 5.3.6 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit der Software SPSS (PASW Version 18, SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Die ermittelten Daten einzelner Gruppen wurden mittels eines Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung untersucht. Um möglichst eine Normalverteilung zu gewährleisten, wurden nicht normal verteilte Daten transformiert. Daten des offensiven Verhaltens und der Angriffslatenz aus den neun RI-Tests wurden innerhalb der



Versuchswochen und zwischen den Versuchswochen mit dem allgemeinen linearen Modell mit Messwiederholungen analysiert. Die Post hoc Analyse wurde mit dem Bonferroni-Test durchgeführt. Des Weiteren wurden die Dauer des offensiven Verhaltens, die Angriffslatenz (beides im letzten RI-Test) und die Anzahl der c-Fos-positiven Zellkerne zwischen aggressiven Bewohnern der RI-Gruppe/Studie 1 (mäßig und hoch aggressiv) und aggressiven Bewohnern der Provokations-Gruppe (mäßig und hoch aggressiv) analysiert. Bei vorliegender Normalverteilung wurde der Unterschied der Mittelwerte zwischen diesen zwei Datengruppen mit den Student's t-Test auf Signifikanz getestet. Bei Daten, die trotz Transformation keine Normalverteilung aufwiesen, oder Daten mit Varianzheterogenität wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  wurden Unterschiede als signifikant bezeichnet, bei  $p < 0,001$  als hoch signifikant. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittels (SEM) angegeben.

## 5.4 Ergebnisse

### 5.4.1 Aggressives Verhalten der Provokations-Gruppe im *Resident-Intruder*-Test

#### 5.4.1.1 Aggressives Verhalten innerhalb der drei Versuchswochen

Während der ersten Versuchswoche durchliefen die Ratten der Provokations-Gruppe drei RI-Konfrontationen mit vorheriger Provokationsphase (RI 1+P - RI 3+P). Die Angriffslatenz und Dauer des offensiven Verhaltens wiesen innerhalb dieser drei Versuchstage keinen signifikanten Unterschied auf und wurden daher gemittelt. Nach Entnahme der Trennscheibe attackierten die Bewohner innerhalb von durchschnittlich  $264,00 \pm 15,71$  s den Eindringling; die Angriffslatenz reichte von 19-269 s. Während der direkten RI-Konfrontationen zeigten die Bewohner im Mittel  $11,39 \pm 3$ , 94 % der Gesamtzeit offensives Verhalten. In RI 1+P wurden sechs Ratten der wenig aggressiven, zwei der mäßig aggressiven und eine der hoch aggressiven Gruppe zugeordnet. In RI 2+P zeigte eine andere Ratte hoch aggressives

Verhalten, die restlichen Ratten zeigten wenig aggressives Verhalten. In RI 3+P bildeten sieben Bewohner die wenig aggressive Gruppe, die verbleibenden zwei die mäßig aggressive Gruppe (Abb. 15). In keinem der RI-Tests konnten Verhaltensmuster der eskalierten Aggression beobachtet werden; dies traf auch für die folgenden Versuchswochen zu.

In der zweiten Versuchswoche wurden drei Standard RI-Tests an drei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt (RI 4 - RI 6). Wie auch in der ersten Versuchswoche wurden keine signifikanten Unterschiede in der Angriffslatenz und der Dauer des offensiven Verhaltens innerhalb der Versuchstage festgestellt. Während der ersten 5 min attackierten die Bewohner nach durchschnittlich  $211,00 \pm 17,87$  s den Eindringling. Die Angriffslatenz wies innerhalb der drei RI-Tests ein Spektrum von 37-257 s auf. Die Bewohner zeigten  $22,34 \pm 3,63\%$  der Zeit offensives Verhalten. Beruhend auf den ersten 5 min wurden in RI 4 drei Bewohner der wenig aggressiven Gruppe zugeordnet. Fünf Ratten zeigten zwischen 15-55% der Zeit aggressives Verhalten und bildeten somit die mäßig aggressive Gruppe. Eine Ratte zeigte hoch aggressives Verhalten. In RI 5 bildeten vier Ratten die wenig aggressive und vier Ratten die mäßig aggressive Gruppe. Eine andere Ratte zeigte hoch aggressives Verhalten. In RI 6 wurde kein hoch aggressives Verhalten beobachtet. Fünf Ratten wurden als wenig aggressiv und vier Ratten als mäßig aggressiv klassifiziert (Abb. 15).

Die dritte Versuchswoche beinhaltete wie die erste Versuchswoche drei RI-Konfrontationen mit vorheriger Provokation (RI 7+P - RI 9+P). Im Gegensatz zu den ersten beiden Versuchswochen wies die Angriffslatenz einen signifikanten Unterschied innerhalb der Versuchstage auf. In RI 7+P ( $78,00 \pm 13,44$  s) und RI 8+P ( $75,89 \pm 17,16$  s) war die Angriffslatenz signifikant kürzer als in RI 9+P ( $197,89 \pm 39,60$  s;  $p < 0,05$ ). Während der drei Versuchstage reichte die Angriffslatenz von 13-177 s. Die Dauer des offensiven Verhaltens wies keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Versuchstage auf. Die Bewohner zeigten durchschnittlich  $40,71 \pm 4,52\%$  der Zeit offensives Verhalten. In RI 7+P wurde ein Bewohner

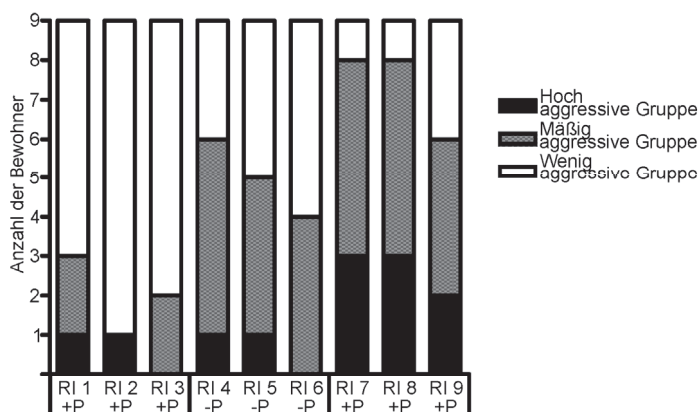
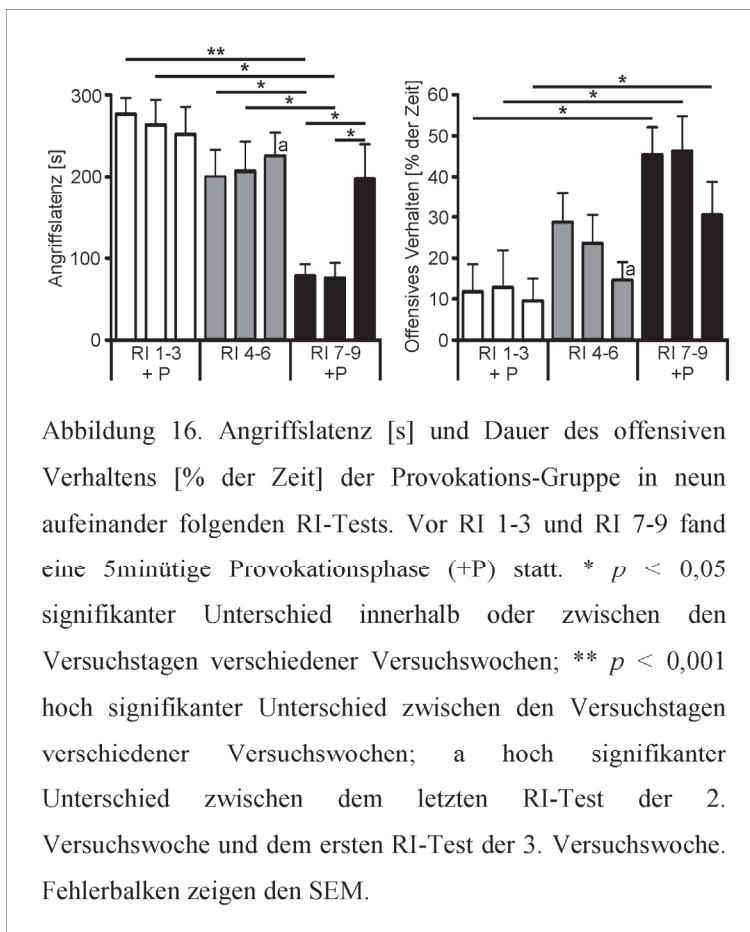


Abbildung 15. Klassifizierung der Bewohner der Provokations-Gruppe ( $n=9$ ) in eine hoch, mäßig oder wenig aggressive Gruppe in neun aufeinander folgenden Resident-Intruder Tests (RI 1-9) mit (+P) oder ohne (-P) vorherige Provokationsphase. Hoch: > 55% der Zeit mit aggressivem Verhalten verbracht; mäßig: 15 – 55% der Zeit; wenig: < 15% der Zeit.

der wenig aggressiven Gruppe zugeordnet, fünf Ratten der mäßig aggressiven und die restlichen drei der hoch aggressiven Gruppe. RI 8+P zeigte die gleiche Gruppenverteilung. In RI 9+P bildeten drei Ratten die wenig aggressive Gruppe, vier die mäßig aggressive und zwei Ratten die hoch aggressive Gruppe (Abb. 15).

#### 5.4.1.2 Vergleich des aggressiven Verhaltens der Provokations-Gruppe zwischen den drei Versuchswochen

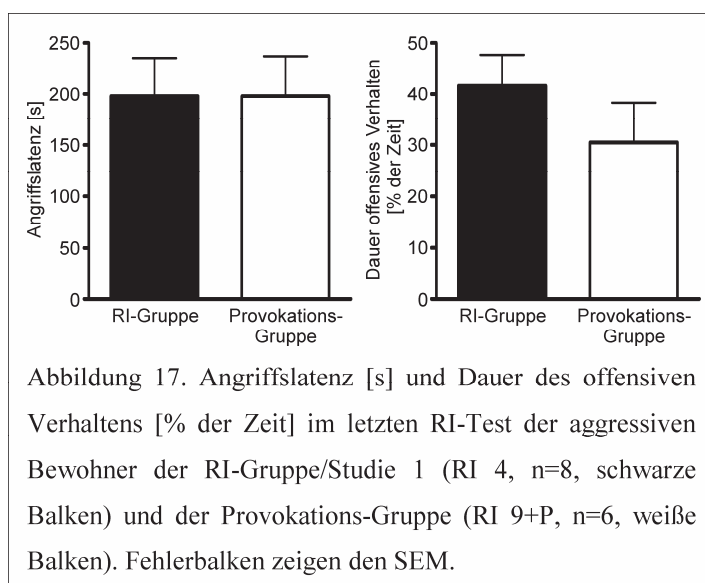
Die Analyse der Angriffslatenz und des offensiven Verhaltens der ersten Versuchstage jeder Versuchswoche zeigte eine signifikant längere Angriffslatenz in RI 1+P ( $p < 0,001$ ) und RI 4 ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu RI 7+P. Die Dauer des offensiven Verhaltens war in RI 1+P signifikant kürzer als in RI 7+P ( $p < 0,05$ ). Der Vergleich der zweiten Versuchstage der jeweiligen Versuchswochen zeigte das gleiche Muster. Die Angriffslatenz in RI 2+P und RI 5 ( $p < 0,05$ ) war signifikant länger im Vergleich zu RI 8+P. Die Dauer des offensiven Verhaltens war in RI 2+P signifikant kürzer als in RI 8+P ( $p < 0,05$ ). Die Angriffslatenzen der dritten Versuchstage unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Versuchswochen. Die Dauer des offensiven Verhaltens war jedoch signifikant kürzer in RI 3+P im Vergleich zu RI 9+P ( $p < 0,05$ ). Der Vergleich zwischen dem letzten RI-Test der ersten und dem ersten RI-Test der zweiten Versuchswoche bzw. dem letzten RI-Test der zweiten Versuchswoche und



dem ersten RI-Test der dritten Versuchswache wies eine signifikant längere Angriffslatenz und signifikant kürzeres offensives Verhalten in RI 6 als in RI 7+P auf ( $p < 0,001$ ) (Abb. 16).

#### 5.4.1.3 Vergleich des aggressiven Verhaltens der RI-Gruppe/Studie 1 und der Provokations-Gruppe im letzten RI-Test

Im letzten RI-Test der RI-Gruppe/Studie 1 (RI 4) wurden fünf Bewohner als mäßig aggressiv und drei als hoch aggressiv klassifiziert. Sie attackierten die Eindringlinge nach durchschnittlich  $185,13 \pm 37,58$  s und zeigten  $45,00 \pm 5,39\%$  der Zeit offensives Verhalten. Der Vergleich



der Angriffslatenz und der Dauer des offensiven Verhaltens im letzten RI-Test (RI-Gruppe/Studie 1, RI 4; Provokations-Gruppe, RI 9+P) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abb. 17).

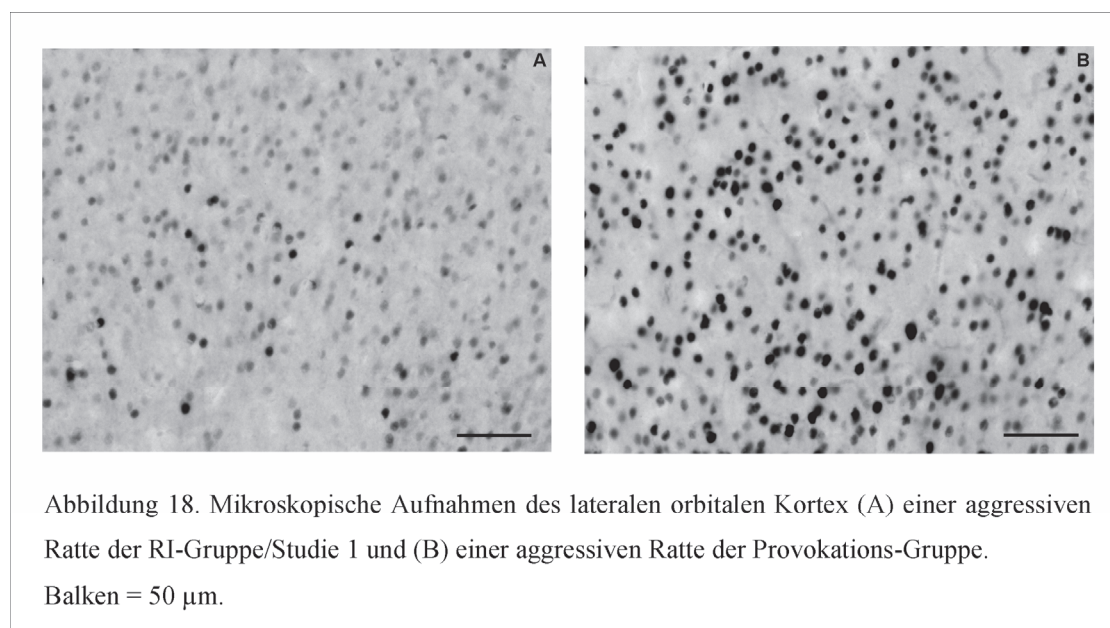
#### 5.4.2 Verteilung von c-Fos-positiven Zellkernen in limbischen telenzephalen Hirngebieten

Im Folgenden werden die statistischen Unterschiede der c-Fos-Anfärbung zwischen den aggressiven Tieren der RI-Gruppe/Studie 1 (n=8) und den aggressiven Tieren der Provokations-Gruppe (n=6) dargestellt. Das aggressive Verhalten der Bewohner beider Gruppen war über die Versuchsdauer nicht konstant, daher reflektiert die c-Fos-Expression den momentanen Zustand im letzten RI-Test. Des Weiteren wurden mäßig und hoch aggressive Tiere als aggressive Gruppe zusammengefasst, da keines der Tiere an mehr als drei Versuchstagen hoch aggressives Verhalten zeigte. Einige der untersuchten telenzephalen Hirngebiete zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der c-Fos-positiven Zellkerne zwischen den beiden untersuchten Gruppen. Diese waren VO, IL, PrL, DI, GI, LSV sowie wie die amygdalären Kerngebiete CeA, BLA, BMA, La und MeP.

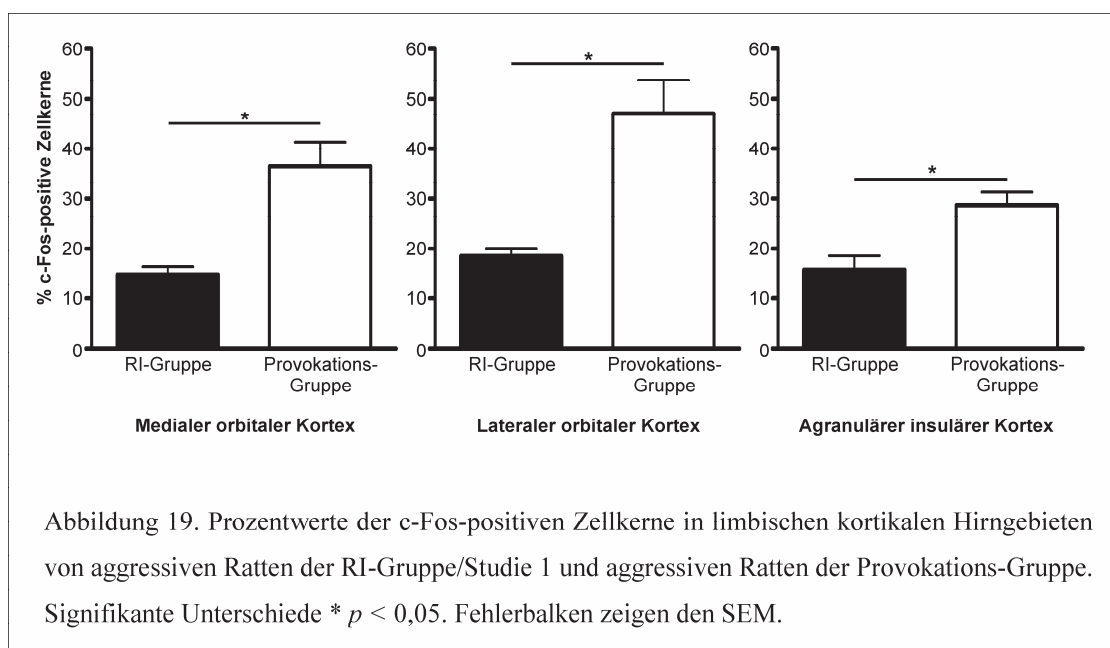
**Tabelle 4.** Prozentwerte der c-Fos-positiven Zellkerne in limbischen telenzephalen Hirngebieten aggressiver Ratten der RI- Gruppe/Studie 1 und Provokations-Gruppe.

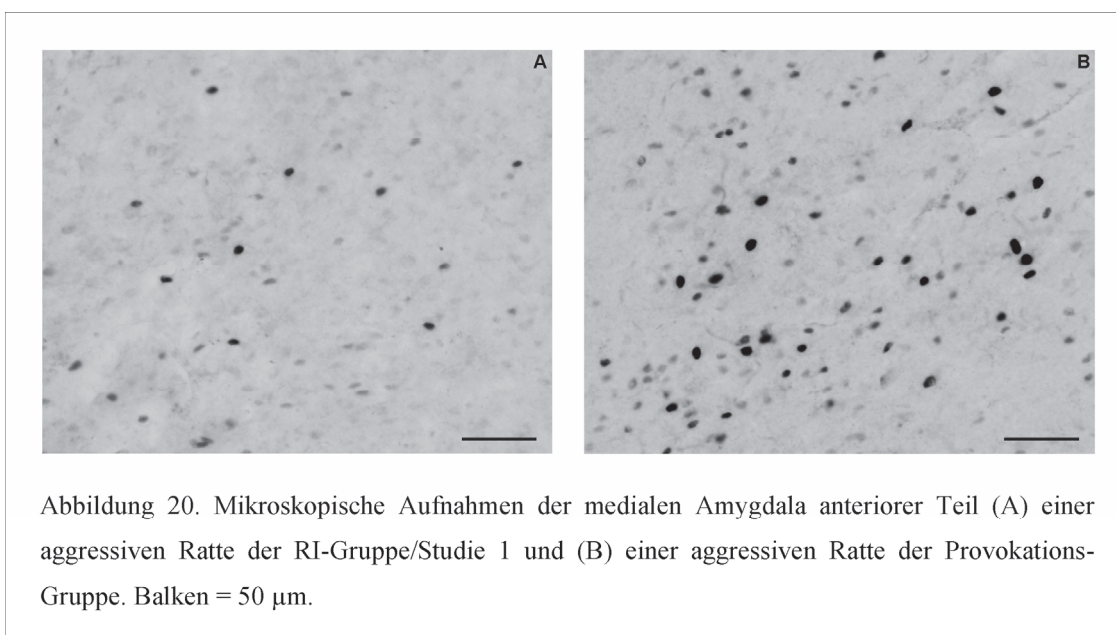
Hirngbiet		RI-Gruppe (n=8)	Provokations-Gruppe (n=6)
MO	RI-Gruppe	14,80 (± 1,48)	↑ <sup>a</sup> * <sup>b</sup>
	Provokations-Gruppe		32,69 (± 5,73)
LO	RI-Gruppe	18,46 (± 1,62)	↑*
	Provokations-Gruppe		43,54 (± 7,05)
AI	RI-Gruppe	15,71 (± 2,82)	↑*
	Provokations-Gruppe		28,63 (± 2,39)
LSI	RI-Gruppe	1,65 (± 0,43)	↑*
	Provokations-Gruppe		8,39 (± 1,88)
MeA	RI-Gruppe	4,50 (± 0,95)	↑*
	Provokations-Gruppe		12,19 (± 2,27)

<sup>a</sup> Anstieg der Prozentwerte; <sup>b</sup>  $p < 0.05$ .

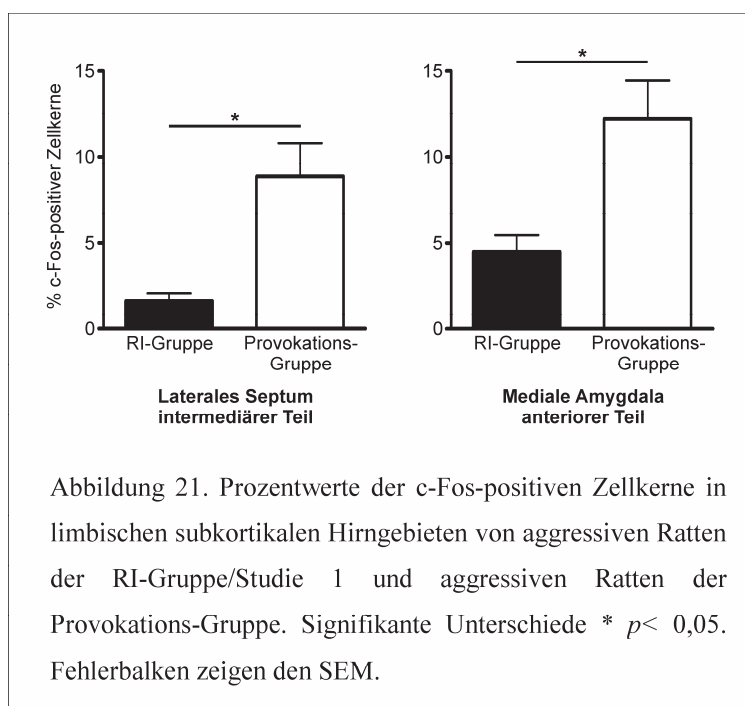


Alle untersuchten kortikalen Hirngebiete zeigten eine moderate bis starke c-Fos-Anfärbung mit über 10% c-Fos-positiven Zellkernen. In der Provokations-Gruppe wiesen 12-54% der Zellkerne eine c-Fos-positive Anfärbung auf. Die stärkste Anfärbung zeigte der VO ( $53,12 \pm 6,78\%$ ), die schwächste der GI ( $12,39 \pm 2,41\%$ ). Der statistische Vergleich mit der RI-Gruppe/Studie 1 ergab eine signifikant höhere Anzahl c-Fos-positiver Zellkerne im MO, LO (Abb. 18) und AI ( $p < 0,05$ ) in Gehirnen der Provokations-Gruppe (Tab. 4; Abb. 19).





Die untersuchten subkortikalen Hirngebiete wiesen eine schwache c-Fos-Anfärbung (max. 8%) im LSI und LSV auf. Die Amygdala wies eine moderate bis starke Anfärbung, mit der stärksten c-Fos-Anfärbung in der La ( $27,81 \pm 5,85\%$ ), auf. Der statistische Vergleich mit den aggressiven



Ratten der RI-Gruppe/Studie 1 ergab eine signifikant höhere c-Fos-Anfärbung der Zellkerne im LSI und der MeA (Abb. 20) ( $p < 0,05$ ) in Gehirnen der Provokations-Gruppe (Tab. 4; Abb. 21).

## 5.5 Diskussion

Die vorliegende Studie untersuchte den Einfluss einer Provokationsphase, der so genannten sozialen *Instigation*, auf das Aggressionsverhalten von männlichen DA Ratten. Die neuronale Aktivierung von limbischen telenzephalen Hirnarealen wurde mittels immunhistochemischer Anfärbung des Expressionsproduktes c-Fos analysiert. In der ersten Versuchswoche wurde den Bewohnern vor der direkten RI-Konfrontation für 5 min ein Eindringling präsentiert. Dieser konnte gesehen und gerochen, aber nicht angegriffen werden. Das führte bei den Bewohnern weder zu einer verkürzten Angriffslatenz noch zu verlängertem aggressiven Verhalten. Der Großteil der Bewohner zeigte in den drei RI-Tests der ersten Versuchswoche wenig aggressives Verhalten. In der zweiten Versuchswoche, ohne vorherige Provokation, wurden die meisten Bewohner der wenig oder mäßig aggressiven Gruppe zugeteilt; wenige zeigten hoch aggressives Verhalten. Der statistische Vergleich der Angriffslatenz und Dauer des offensiven Verhaltens der ersten beiden Versuchswochen ergab weder innerhalb noch zwischen den Versuchswochen einen signifikanten Unterschied. Die erneute Durchführung einer Provokationsphase in der dritten Versuchswoche führte zu einer signifikant verkürzten Angriffslatenz im Vergleich zu den ersten beiden Versuchswochen und einem signifikant verlängerten offensiven Verhalten im Vergleich zur ersten Versuchswoche. Aggressionsmuster der eskalierten Aggression wurden jedoch nicht beobachtet. Der Vergleich der c-Fos-positiven Zellkerne zwischen aggressiven Bewohnern der Provokations-Gruppe, mit einer Provokationsphase vor dem letzten RI-Test, und den aggressiven Bewohnern der RI-Gruppe/Studie 1, ohne vorherige Provokation, ergab eine signifikant höhere c-Fos-Anfärbung in den limbischen kortikalen Arealen MO, LO und AI in Gehirnen der Provokations-Gruppe. Die subkortikalen Hirnareale LSI und MeA wiesen ebenfalls eine signifikant höhere Anzahl c-Fos-positiver Zellkerne bei aggressiven Tieren der Provokations-Gruppe auf. Die soziale *Instigation* führt nicht zur Eskalation des aggressiven Verhaltens bei DA Ratten, jedoch zu einer erhöhten Fos-Aktivierung in einigen limbischen Hirngebieten. Diese lässt sich am



ehesten auf die verhaltensbezogene Flexibilität und Stressbewältigung während der Provokationsphase zurückführen.

### 5.5.1 Auswirkungen der Provokationsphase

Die Durchführung der sozialen *Instigation* vor der direkten Konfrontation mit dem Eindringling führte nur bei Ratten mit offensiver Erfahrung zu einer verkürzten Angriffslatenz bzw. einer verlängerten Dauer des aggressiven Verhaltens. Studien, die von einem aggressionssteigernden Effekt der Provokationsphase berichten, untersuchten Hamster, Mäuse oder Ratten, die schon vor Versuchsbeginn Angriffe auf Gegner gezeigt hatten (Potegal, 1991; Potegal, 1992; Fish et al., 1999; de Almeida und Miczek, 2002, Centenaro et al., 2008). Die Ratten der vorliegenden Studie wurden seit der Trennung vom Muttertier in einer gleichgeschlechtlichen Gruppe von fünf Ratten, meist Tiere aus einem Wurf, gehalten. Bis zum Zeitpunkt der Versuche wurden sie nicht mit einem fremden Kontrahenten konfrontiert. Der Effekt der sozialen *Instigation* wird durch die so genannte aggressive Erregtheit ausgelöst. Diese Erregtheit wirkt sich ausschließlich auf das aggressive Verhalten aus; nicht aggressive Verhaltensweisen werden nicht beeinflusst (Potegal, 1991; Potegal, 1992; Miczek et al., 2002; Miczek et al., 2003; de Almeida, 2005). Die Kampfunerfahrenheit der Ratten aus der vorliegenden Studie könnte dazu geführt haben, dass die aggressive Erregtheit ohne Wirkung blieb. Im Gegensatz dazu reichten bei aggressiv-erregten Nagern mit offensiver Erfahrung minimale Aktionen des Kontrahenten aus, um die nächsten Attacken auszulösen (Potegal, 1991; Potegal, 1992; Fish et al., 1999). Die aggressive Erregtheit wurde in Verhaltensexperimente eingefügt, um eskaliertes aggressives Verhalten zu untersuchen. Allerdings zeigten sich bei den verschiedenen Versuchstierarten unterschiedlich starke Effekte. Bei weiblichen Hamstern war der Effekt stärker als bei männlichen Ratten (Potegal, 1992). Der stärkste Effekt wurde jedoch bei Mäusen beobachtet. Bei Mäusen führte die

vorherige Provokation zu eskalierendem aggressivem Verhalten. Sie zeigten neben einer stark verkürzten Angriffslatenz und einer mehr als zweifach erhöhten Anzahl von Angriffen und Drohungen auch Beißattacken gegen verletzbare Körperteile wie Kopf, Bauch oder Kehle. Des Weiteren missachteten sie speziesspezifische Regeln; sie griffen Weibchen und anästhesierte Artgenossen an und reagierten nicht auf unterwürfiges Verhalten des Gegners (Miczek et al., 2003; Miczek et al., 2004; de Almeida, 2005; Haller und Kruk 2006; de Boer et al., 2009; Miczek et al., 2013). Durch die Provokation hervorgerufenes eskaliertes aggressives Verhalten konnte weder in der vorliegenden Studie noch bei männlichen Ratten oder weiblichen Hamstern in anderen Studien beobachtet werden (Potegal, 1991; Potegal, 1992). Auch in Standard RI-Tests konnten Unterschiede zwischen Ratten und Mäusen festgestellt werden. Während bei Mäusen 90% der Bewohner offensives Verhalten gegenüber dem Eindringling im RI-Test zeigten, wurde dies bei nur 60-70% der Ratten beobachtet (Miczek et al., 2003). Diese Unterschiede könnten auf verschiedene soziale Strukturen zurückzuführen sein. Während Ratten zusammen in Kolonien leben, leben Mäuse dispersiv in Territorien. Daher werden Aggressionen bei Ratten eher als dominantes Verhalten und bei Mäusen als territoriales Verhalten bezeichnet (de Almeida und Miczek, 2002; Miczek et al., 2002; Miczek et al., 2003; de Almeida, 2005). Mäuse vertreiben die Konkurrenten aus ihrem Territorium, welches während des RI-Tests nicht möglich ist und somit zur Eskalation führen könnte, während Ratten eine Rangordnung festlegen. Des Weiteren vokalisieren die Eindringlinge in RI-Tests mit den Bewohner-Ratten, wenn sie in Bedrängnis geraten; Mäuse tun dies nicht (Miczek et al., 2002). Dies deutet darauf hin, dass bei Ratten eine andere Kommunikationsebene existiert als bei Mäusen. Obwohl einige Individuen des in der vorliegenden Studie untersuchten DA Rattenstammes schon in Standard RI-Tests hoch aggressives Verhalten zeigten und somit aggressiver waren als die von Potegal (1992) untersuchten Long Evans Ratten (de Bruin, 1990; de Boer et al., 2003), führte die soziale *Instigation* auch bei DA Ratten nicht zur Eskalation des aggressiven Verhaltens. Sie zeigten

keine Elemente abnormalen aggressiven Verhaltens, sondern es trat lediglich eine Verlängerung des aggressiven Verhaltens auf. Solch quantitative Steigerung kann nicht mit eskalierendem aggressivem Verhalten gleich gesetzt werden (Haller und Kruk, 2006). Des Weiteren scheint der Effekt der Provokation über die Versuchstage abzunehmen. So zeigten Ratten der vorliegenden Studie am letzten Versuchstag eine signifikant längere Angriffslatenz als in den beiden vorherigen Versuchstagen mit Provokationsphase, die sich nicht mehr signifikant von den Angriffslatenzen der ersten beiden Versuchswochen unterschied.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die aggressive Erregtheit nur bei Ratten ausgelöst werden kann, die zuvor schon Kontrahenten angegriffen haben. Der Effekt der Erregtheit wirkt sich hauptsächlich auf die Angriffslatenz aus und nimmt über die Versuchstage hinweg wieder ab. Auch bei Ratten mit aggressiverem Grundtemperament führt die soziale *Instigation* nicht zur Missachtung der speziesspezifischen Regeln. Dieser Unterschied, im Vergleich zu Mäusen, könnte an den verschiedenen sozialen Strukturen liegen.

## 5.5.2 Verteilung der c-Fos-positiven Zellkerne

### 5.5.2.1 Orbitofrontaler Kortex

Die Angriffslatenz und Dauer des offensiven Verhaltens wiesen zwischen den aggressiven Bewohnern der Provokations-Gruppe und den aggressiven Bewohnern der RI-Gruppe/Studie 1 keine Unterschiede auf. Dennoch war die Anzahl c-Fos-positiver Zellkerne im MO und LO des OFC in Gehirnen der Provokations-Ratten signifikant höher. Im Vergleich mit Kontrolltieren zeigte der LO nach vier RI-Tests an aufeinander folgenden Tagen, sowohl bei nicht aggressiven als auch bei aggressiven Ratten, eine erhöhte Aktivierung. Der MO zeigte keinen Unterschied zwischen Bewohnern und Kontrolltieren (Studie 1: Arlt et al., 2013). Diese und die aktuellen Ergebnisse deuten darauf hin, dass nicht das aggressive Verhalten zu der gesteigerten Aktivierung dieser Hirngebiete führte, obwohl in anderen Studien die

Aktivierung des OFC mit aggressivem Verhalten in Zusammenhang gebracht wird (Halász et al., 2006; Haller et al., 2006; Tóth et al., 2010; Beiderbeck et al., 2012). Der OFC, besonders der MO, weist starke interkortikale und subkortikale limbische Verbindungen mit dem mPFC, dem Septum, dem Nucleus accumbens, der Amygdala und dem Hypothalamus auf (Tóth et al., 2010; Hoover und Vertes, 2011). Er verarbeitet soziale Reize wie das Dominanzverhalten von Konkurrenten als auch Belohnungserwartungen und -bewertungen und ist somit bedeutend an der Entscheidungsfindung beteiligt (Mobini et al., 2002; Blair, 2004; Cardinal, 2006; Rudebeck et al., 2006; Dalley et al., 2008; Stopper et al., 2012). Des Weiteren ist er für die emotionale und verhaltensbezogene Flexibilität zuständig; er passt Reaktionen an aktuelle Situationen an. Außerdem ist der OFC an Umlernprozessen und der Impulskontrolle beteiligt (Kolb et al., 2004; Rempel-Clower, 2007; Roesch et al., 2007; Perry et al., 2011). Die gefundenen Unterschiede zwischen der Provokations- und RI-Gruppe/Studie 1 sind offenbar auf das unterschiedliche Versuchsdesign in den beiden Gruppen zurückzuführen. In der zweiten Versuchswoche der Provokations-Gruppe wurden Standard RI-Tests durchgeführt. Die Bewohner konnten sofort in direkten Kontakt mit dem Eindringling treten. Dies war in der dritten Versuchswoche, durch die vorhandene Trennscheibe während der ersten fünf Minuten, nicht möglich. Die Anpassung an diese Situation setzt eine verhaltensbezogene Flexibilität voraus. Des Weiteren mussten die Bewohner einen eventuellen Angriffsimpuls gegen den Eindringling, bedingt durch die Trennwand, unterdrücken. Sowohl die Flexibilität als auch die Impulskontrolle werden im OFC verarbeitet und lösten am ehesten die erhöhte Fos-Aktivierung im OFC der Ratten bei Provokation aus.

#### 5.5.2.2 Agranulärer insulärer Kortex

Der agranuläre insuläre Kortex bildet den lateralen präfrontalen Kortex (IPFC). Er ist beteiligt an der Speicherung von emotionalen Reizen und Reaktionen auf diese (Shin und Liberzon,

2010), an Entscheidungsfindungsprozessen und wie der OFC an der Inhibition des Verhaltens (Dalley et al., 2004; Rempel-Clower, 2007; Perry et al., 2011). Des Weiteren ist er über seine neuronale Verbindung mit dem mPFC in die Stressbewältigung involviert (Stevenson und Gratton, 2003; Heidbreder und Groenewegen, 2003; Spencer et al., 2004; Spencer und Day, 2004). Die Präsentation eines Eindringlings, der nicht angegriffen werden kann, ist sowohl ein emotionaler Reiz als auch eine Form von sozialem Stress. Die Bewohner der vorliegenden Studie wurden in keinem RI-Test von einem Eindringling angegriffen und zeigten niemals unterwürfiges Verhalten. Sie waren also stets das dominante Tier. Allerdings zeigten auch dominante Tiere Stressreaktionen bei Konfrontationen mit unterlegenen Tieren (McKittrick et al., 1995). Zusammen mit den Ergebnissen anderer deuten die vorliegenden Daten eher darauf hin, dass die gesteigerte Aktivierung des AI durch die psychosoziale Konfrontation und dem damit verbundenen Stress ausgelöst wurde, als durch das aggressive Verhalten während der direkten RI-Konfrontation (Halász et al. 2006; Beiderbeck et al., 2012; Studie 1: Arlt et al., 2013). Die vorherige soziale *Instigation* führt zur erzwungenen Unterdrückung des aggressiven Verhaltens, welches wiederum mehr Stress auslösen könnte als die direkte Interaktion mit einem Eindringling wie es bei Tieren der RI-Gruppe der Fall war.

#### 5.5.2.3 Septum

Läsionen des Septums führen zu verschiedenen kognitiven Defiziten wie Störungen des Gedächtnisses oder der Aufmerksamkeit und zur Desynchronisation der elektrischen Aktivität des Hippocampus (Wenk, 1997; Leutgeb und Mizumori, 1999; Numann, 2000). Des Weiteren konnte nach septalen Läsionen ein erhöhtes aggressives Verhalten beobachtet werden (Annen et al., 1985; Albert et al., 1993). Das laterale Septum weist eine starke Projektion zum hypothalamischen Angriffsareal auf. Dieses hypothalamische Areal ist maßgeblich an der Auslösung von Attacken beteiligt (Tóth et al., 2010). In gezüchteten hoch aggressiven

Nagern, die auch abnormale Aggressionsmuster aufwiesen, wurde eine verminderte septale Aktivierung gefunden, während wenig aggressive Nager eine erhöhte Aktivierung zeigten (Haller et al., 2006; Beiderbeck et al., 2007). Man könnte schlussfolgern, dass die Aktivierung des lateralen Septums zur Inhibition abnormalen aggressiven Verhaltens führt. Ratten der Provokations-Gruppe würden somit eine erhöhte septale Aktivierung aufweisen, da in aggressiv-erregten Ratten eine stärkere Inhibition zur Vermeidung eskalierter Aggression notwendig ist. Allerdings wurde in anderen Versuchsmodellen bei abnormaler Aggression ebenfalls eine erhöhte septale Aktivierung gefunden (Halász et al., 2002a; Tóth et al., 2012; Marquez et al., 2013). Des Weiteren deutet die verlängerte Angrifflatenz in RI 9+P darauf hin, dass mit wiederholter Provokation die aggressive Erregtheit zurückgeht. Somit scheinen abnormale Aggressionsmuster nicht durch eine erhöhte septale Aktivierung verhindert zu werden. Die genaue Rolle des lateralen Septums im Kontext der sozialen *Instigation* bleibt weiterhin offen.

#### 5.5.2.4 Mediale Amygdala

In der vorliegenden Studie war die mediale Amygdala der einzige amygdaläre Kern, der einen signifikanten Unterschied aufwies. Der Vergleich zeigte eine höhere Fos-Aktivierung bei Ratten der Provokations-Gruppe als bei Ratten der RI-Gruppe/Studie 1. Viele Studien berichten, dass die mediale Amygdala die normale territoriale bzw. dominante Aggression moduliert (Siegel et al., 1999; Halász et al., 2002a; Haller et al., 2006; Veenema und Neumann, 2007; Tóth et al., 2010). Da Bewohner der Provokations-Gruppe im aggressiven Verhalten jedoch keinen Unterschied zur RI-Gruppe/Studie 1 aufwiesen, kann diese Erhöhung nicht auf das aggressive Verhalten zurückgeführt werden. Es ist auch hier wahrscheinlicher, dass die veränderten Versuchsbedingungen der Provokations-Gruppe zur Steigerung führten. Neben einer aggressionsgesteigerten Aktivierung wurde eine erhöhte Aktivierung der

medialen Amygdala auch in Angstmodellen und bei sozialem Stress gefunden (Duncan et al., 1996; Senba und Ueyama, 1997; Martinez et al., 1998; Nikulina et al., 2008; Fekete et al., 2009). Wie bereits erwähnt, könnte neben dem sozialen Stress, bedingt durch die Konfrontation mit einem Konkurrenten, die Trennung vom Eindringling während der Provokationsphase zu gesteigertem Stress geführt haben und somit zu den Aktivierungsunterschieden zwischen Provokations-Gruppe und RI-Gruppe/Studie 1 in der medialen Amygdala.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die erhöhte Fos-Aktivierung nicht auf die aggressive Erregtheit oder das aggressive Verhalten, sondern am ehesten auf die Verhaltensinhibition während der Provokationsphase zurückzuführen ist. Die durch die Trennwand erzwungene Unterdrückung des direkten Angriffs- und Dominanzverhaltens scheint beim Bewohner zu einer erhöhten Stressreaktion zu führen. Die gesteigerte Fos-Aktivierung im OFC könnte mit der verhaltensbezogenen Flexibilität einhergehen, die im Rahmen der Stressbewältigung erforderlich wird, während die erhöhte Aktivierung des AI und der MeA eher direkt auf die Stressreaktion zurückzuführen ist.

## **6. Allgemeine Diskussion**

Verliert das aggressive Verhalten seinen biologischen, adaptiven Charakter kommt es zu abnormaler Aggression bzw. Gewalt, die zu großen Schäden und auch Kosten in unserer heutigen Gesellschaft führt (Benus et al., 1991; Bushman und Anderson, 2001; Dahlberg und Krug, 2002). Um die Ursachen von gewalttätigem Verhalten zu verstehen, ist es unerlässlich die Grundlagen des ‚normalen‘ aggressiven Verhaltens, zum Beispiel des territorialen Verhaltens, zu erforschen. Mittels Untersuchungen des individuell variierenden offensiven Verhaltens männlicher DA Ratten konnte in der vorliegenden Arbeit das derzeitige Wissen über die neuronalen Grundlagen des territorialen Verhaltens erweitert und eine Verbindung zwischen den neuronalen Netzwerken der Aggression und der Stressbewältigung hergestellt werden.

### **6.1 Territoriales Verhalten männlicher Dark Agouti Ratten**

Alle drei Studien dieser Arbeit zeigten, dass das territoriale Verhalten von DA Ratten große individuelle Unterschiede aufweist. Die meisten Bewohner wurden als wenig oder mäßig aggressiv klassifiziert, allerdings wurde in jeder Studie bei einigen Individuen hoch aggressives Verhalten beobachtet. Solch hoch aggressives Verhalten, definiert durch eine Dauer von über 55% der Zeit der Konfrontation mit einem Kontrahenten, wurde bisher nur bei Ratten des Wild-Typ Groningen Stammes, der eine trimodale Verteilung der Aggressionsphänotypen aufweist, beobachtet. Allerdings zeigen die aggressiven Individuen des Wild-Typ Groningen Stammes neben einer erhöhten Dauer des aggressiven Verhaltens ebenfalls eine erhöhte Anzahl von Beißattacken (de Bruin, 1990; de Boer et al., 2003); dies wurde bei Ratten des DA Stammes nicht beobachtet. Selbst die hoch aggressiven DA Ratten zeigten nur eine geringe Anzahl von Beißattacken. Würde man die Klassifizierung der Bewohner aufgrund des Verhältnisses von Beißattacken zu Drohungen durchführen, würden



sich die DA Ratten nicht von anderen Laborstämmen unterscheiden (Haller et al., 2001; Halász et al., 2002a). Somit zeigen DA Ratten zwar eine hohe Anzahl von Drohungen und Dominanzgebärden wie dem offensiven Aufrichten und das zu Boden drücken des Eindringlings, jedoch vermeiden sie größtenteils Verhaltensweisen, die zu Verletzungen führen könnten. Dieses Vermeiden von Verletzungen ist Bestandteil der speziesspezifischen Regeln des territorialen Verhaltens und spiegelt seinen adaptiven Charakter wider (Miczek et al., 2002; de Almeida, 2005; Haller und Kruk, 2006). Somit widerspricht die geringe Anzahl von Beißattacken bei DA Ratten nicht der Klassifizierung als hoch aggressiv, da hoch aggressives Verhalten keinesfalls mit abnormaler bzw. eskalierter Aggression gleichzusetzen ist. Der adaptive Charakter des territorialen Verhaltens von DA Ratten spiegelt sich auch in den intraindividuellen Unterschieden zwischen den einzelnen Versuchstagen wider. Die Bewohner zeigten in den verschiedenen RI-Tests unterschiedliche Reaktionen auf die jeweils unbekanntem Eindringlinge. Während andere Studien vom aggressiven Verhalten als eine gleichbleibende Charaktereigenschaft, der *trait aggression*, berichten (van der Vegt et al., 2001; van der Vegt et al., 2003a; van der Vegt et al., 2003b), scheinen DA Ratten ihre Drohungen und Dominanzgebärden auf die momentane Situation und das Verhalten des Eindringlings abzustimmen. Des Weiteren verlor das territoriale Verhalten der DA Ratten auch durch die soziale *Instigation* in Studie 3 nicht seinen adaptiven Charakter. Die Provokationsphase vor der direkten Konfrontation führte bei DA Ratten mit Kampferfahrung zwar zu einer aggressiven Erregtheit (Potegal, 1991; Potegal, 1992; de Almeida 2005), die sich in einer stark verkürzten Angriffslatenz und erhöhten Dauer des aggressiven Verhaltens widerspiegelte, jedoch nicht zu Verhaltensmustern der abnormalen Aggression. Die speziesspezifischen Regeln wurden somit auch nach der Provokation nicht missachtet und die kommunikative Ebene nicht gestört (Miczek et al., 2003; Miczek et al., 2004; Haller und Kruk, 2006). Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass Ratten des DA

Stammes, bedingt durch ihre individuellen Aggressionsmuster, ein geeignetes Versuchstier zur Untersuchung des ‚normalen‘ aggressiven Verhaltens sind.

## **6.2 C-Fos-Aktivierung und Änderungen der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptordichte in limbischen telenzephalen Hirnarealen**

Betrachtet man die Ergebnisse aller drei Studien im Ganzen, scheinen insbesondere der präfrontale Kortex und drei Kerngebiete der Amygdala in das vielschichtige territoriale Verhalten während der RI-Konfrontationen involviert zu sein.

Der OFC wies sowohl bei den Bewohnern aus Studie 1 eine erhöhte c-Fos-Aktivierung als auch eine erhöhte 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptordichte bei Bewohnern aus Studie 2 auf; signifikante Unterschiede zwischen nicht-aggressiven und aggressiven Bewohnern wurden nicht gefunden. Des Weiteren wurde im OFC eine erhöhte Fos-Aktivierung bei aggressiven Ratten der Provokations-Gruppe im Vergleich zu aggressiven Ratten ohne vorherige Provokationsphase festgestellt. Diese Ergebnisse deuten auf eine komplexe Rolle des OFC im Rahmen des territorialen Verhaltens hin. Trotz fehlender Signifikanzen zwischen der Aktivierung im OFC bei nicht-aggressiven und aggressiven Bewohnern in Studie 1 kann ein modulierender Einfluss auf aggressive Verhaltensweisen nicht ausgeschlossen werden. Während in Studie 1 die gesteigerte Fos-Aktivierung im ventralen und lateralen orbitalen Kortex von aggressiven gegenüber nicht-aggressiven Ratten lediglich einen Trend darstellte, zeigten andere Studien eine erhöhte Aktivierung des OFC während psychosozialer Konfrontationen und einen weiteren Anstieg während der direkten agonistischen Konfrontation (Halász et al., 2006; Haller et al., 2006; Beiderbeck et al., 2012). Des Weiteren deuten insbesondere die Ergebnisse aus Studie 3 darauf hin, dass die Modulation der Impulskontrolle und der verhaltensbezogenen Flexibilität, an welcher der OFC beteiligt ist (Blair, 2004; Cardinal, 2006), zu einer Erhöhung seiner Fos-Aktivierung geführt haben

könnte. Während in Studie 1 unterschiedliche Belohnungsbewertungen und das variierende Verhalten der Eindringlinge flexibles Verhalten und eine Kontrolle des impulsiven Verhaltens forderten, wurden die Bewohner in Studie 3 durch die Trennscheibe zur Unterdrückung eines Angriffsimpulses und somit zu einer erhöhten Flexibilität der Verhaltensreaktionen gezwungen. Dies könnte zur weiteren Steigerung der OFC Aktivierung geführt haben. Ferner deuten die Ergebnisse der Studie 2 auf einen großen Einfluss von sozialem Stress auf das territoriale Verhalten hin. Der Anstieg der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptordichte lässt sich am ehesten durch die Wechselwirkungen zwischen der gesteigerten OFC Aktivierung während des territorialen Verhaltens und den Einfluss von sozialem Stress, bedingt durch die Konfrontation mit einem Kontrahenten, erklären. Eine gesteigerte Rezeptordichte in serotonergen Projektionsarealen führt zu einer verringerten Serotoninausschüttung (Hamon et al., 1990; de Vry, 1995; Hajos et al., 1999; Pineyro und Blier, 1999), die wiederum Einfluss auf die Aktivierungsmuster des OFC und auf das territoriale Verhalten nehmen könnte.

In Studie 2 wurde ferner eine gesteigerte 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptordichte im mPFC von Bewohnern gefunden. Auch in diesem Hirngebiet scheint der Anstieg der Rezeptordichte im Zusammenhang mit dem sozialen Stress, an dessen Modulation er beteiligt ist (Stevenson und Gratton, 2003; Spencer et al., 2004; Spencer und Day, 2004), zu stehen. Die Stressreaktionen, bedingt durch das Eindringen eines Kontrahenten ins Territorium, könnten ebenfalls zur gesteigerten c-Fos-Aktivierung in Studie 1 geführt haben. Allerdings führte der zusätzliche Stress in Studie 3, bedingt durch die Unterdrückung des Angriffs- und Dominanzverhaltens, zu keinem weiteren Anstieg der Fos-Aktivierung im mPFC. Dies lässt darauf schließen, dass neben der Stressreaktion weitere Faktoren auf die Aktivierung des mPFC Einfluss nehmen. In Studie 1 zeichnete sich ein Trend ab, der auf einen weiteren Anstieg der mPFC Aktivierung bei aggressiven Ratten im Vergleich zu nicht-aggressiven Ratten deutete. In anderen Studien wurde dieser Trend bestätigt; je stärker das aggressive Verhalten, desto höher war die Aktivierung des mPFC (Halász et al., 2006; Haller et al., 2006; Beiderbeck et al., 2012).

Zusammengefasst scheint der mPFC eine wichtige Schaltstelle im Netzwerk des territorialen Verhaltens zu sein, da er neben der Regulation von Stressreaktionen Informationen über interne und externe Reize integriert und diese an hypothalamische Zentren wie das hypothalamische Angriffsareal weiterleitet (Tóth et al., 2010).

Die gesammelten Daten zur c-Fos-Aktivierung und 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptordichte im IPFC weisen ebenfalls daraufhin, dass die Konfrontation mit einem Kontrahenten im eigenen Territorium bei Bewohnern zu sozialem Stress führt. Sowohl bei nicht-aggressiven als auch bei aggressiven Bewohnern wurde eine signifikant gesteigerte Fos-Aktivierung in Studie 1 und eine signifikant erhöhte 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptordichte in Studie 2 im Vergleich zu den Kontrolltieren gefunden. Die Konfrontationen mit einem unangreifbaren Eindringling während der Provokationsphase in Studie 3 führten zu einem weiteren signifikanten Anstieg der IPFC Aktivierung. Diese und Ergebnisse anderer Studien weisen darauf hin, dass der IPFC eher an der Stressbewältigung im Zusammenhang mit der psychosozialen Konfrontation als an der Modulation des aggressiven Verhaltens beteiligt ist (Halász et al., 2006; Beiderbeck et al., 2012).

Drei Kerngebiete der Amygdala scheinen Einfluss auf das Verhalten der Bewohner während der territorialen Konfrontation zu nehmen. Während sowohl die gesteigerte c-Fos-Aktivierung bei Bewohnern der Studie 1 als auch die erhöhte 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptordichte bei Bewohner der Studie 2 auf eine Beteiligung der zentralen Amygdala schließen lassen, wurde eine gesteigerte Fos-Aktivierung in der basolateralen Amygdala ausschließlich bei Bewohnern der Studie 1 und eine gesteigerte Fos-Aktivierung in der medialen Amygdala ausschließlich nach der Provokationsphase in Studie 3 gefunden. In der zentralen Amygdala führt die Bindung eines Agonisten an den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor zu einer verminderten Ausschüttung von Serotonin und einer erhöhten c-Fos-Aktivierung (Compaan et al., 1996; Nishi et al., 2009). Somit könnte die gesteigerte Rezeptordichte der Bewohner aus der vorliegenden Arbeit zu der erhöhten

Aktivierung der zentralen Amygdala geführt und ferner das Verhalten beeinflusst haben. Eine erhöhte Aktivierung der zentralen ebenso wie der basolateralen Amygdala wurde bei unterwürfigen Eindringlingen während einer Konfrontation mit einem dominanten Tier gefunden (Martinez et al., 1998; Nikulina et al., 2008; Fekete et al., 2009). Somit könnte die gesteigerte Aktivierung dieser Kerngebiete entweder auf den sozialen Stress der Konfrontation oder auf die Ausübung von standardisierten offensiven als auch defensiven territorialen Verhaltensweisen zurückzuführen sein. Die basolaterale Amygdala ist ferner Teil des Impulskontrollnetzwerks (Chambers and Potenza, 2003; Winstanley et al., 2004; Winstanley, 2011). Ihre erhöhte c-Fos-Aktivierung in Studie 1 könnte demnach ebenfalls durch die Unterdrückung von Angriffsimpulsen bedingt sein. Jedoch zeigte die basolaterale Amygdala keine weitere Steigerung der Aktivierung nach der Provokationsphase in Studie 3. In Studie 3 war die Unterdrückung des Angriffsimpulses durch die Trennwand erzwungen, während es in Studie 1 keine erzwungene Impulskontrolle gab. Diese erzwungene Impulskontrolle könnte zu anderen Aktivierungsmustern innerhalb der basolateralen Amygdala führen oder in anderen Arealen des Impulskontrollnetzwerks verarbeitet werden. Somit ist die Erhöhung der Fos-Aktivierung in der basolateralen Amygdala durch die Steuerung des impulsiven Verhaltens nicht auszuschließen, da die erzwungene Impulskontrolle in Studie 3 nicht zwangsläufig zu einer weiteren Steigerung der Aktivierung führen musste. Eine erhöhte Aktivierung der medialen Amygdala wird häufig mit offensivem Verhalten in Zusammenhang gebracht (Siegel et al., 1999; Halász et al., 2002a; Haller et al., 2006; Veenema und Neumann, 2007; Tóth et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wiesen jedoch die nicht-aggressiven und aggressiven Bewohner aus Studie 1 weder untereinander noch gegenüber der Kontrollgruppe einen signifikanten Unterschied auf. Allerdings führte die Provokationsphase in Studie 3 zu einer signifikant erhöhten Aktivierung im Vergleich zu Bewohnern ohne vorherige Provokation, obwohl zwischen den beiden Gruppen kein Unterschied im aggressiven Verhalten bestand. Dies schließt eine aggressionsbedingte

Aktivierungssteigerung der medialen Amygdala aus. Eine erhöhte Aktivierung der medialen Amygdala wurde ebenfalls bei sozialem Stress beobachtet (Martinez et al., 1998; Nikulina et al., 2008; Fekete et al., 2009). In Studie 3 scheint somit am ehesten der zusätzliche soziale Stress der psychosozialen Konfrontation während der Provokationsphase zu der erhöhten Aktivierung der medialen Amygdala geführt zu haben.

### **6.3 Schlussfolgerung und Ausblick**

Das territoriale Verhalten setzt sich aus verschiedenen nicht-sozialen, sozialen und offensiven Verhaltensweisen zusammen. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigten, dass Individuen des DA Stammes gemäß der momentanen Situation und des Verhaltens des Eindringlings mit unterschiedlich intensivem offensiven Verhalten auf eine Konfrontation reagieren. Diese individuellen Unterschiede spiegelten sich jedoch nicht in den Untersuchungen der limbischen Hirngebiete wider; in einigen Hirngebieten konnte lediglich ein Trend beobachtet werden. Die Erhöhung der Anzahl der Versuchstiere könnte zu einer statistischen Bestätigung dieser Trends führen. Allerdings sprechen auch die gleich starken Aktivierungen der hier untersuchten Hirngebiete bei nicht-aggressiven und aggressiven Ratten während des RI-Tests nicht gegen deren Beteiligung an der Modulation des aggressiven Verhaltens. Je nach Aktivierungsmuster könnte dasselbe Hirngebiet das aggressive Verhalten sowohl unterdrücken als auch aktivieren. Im Falle des OFC würde dies zum Beispiel bedeuten, dass auch bei gleich starker Aktivierung GABAerge und glutamaterge Neurone in unterschiedlichem Maße aktiviert sein können und somit zu verschiedenen Ausprägungen desselben Verhaltens führen könnten. Die Durchführung von Doppelanfärbungen des c-Fos-Proteins und verschiedener Transmittersysteme würde einen tieferen Einblick in die Aktivierungsmuster der hier untersuchten limbischen Hirngebiete liefern. Auch wenn die erhobenen Daten eine erhöhte Aktivierung einiger untersuchter Hirngebiete wie dem OFC

und mPFC aufgrund des aggressiven Verhaltens nicht ausschließen, so scheint doch vor allem der soziale Stress zu den neuronalen Veränderungen geführt zu haben. Insbesondere die Daten zur gesteigerten 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptordichte bei den Bewohnern aus Studie 2 deuten darauf hin. Die Konfrontation mit einem Kontrahenten führt sowohl bei dominanten als auch bei unterwürfigen Tieren zu sozialem Stress und zu individuell verschiedenen Bewältigungsstrategien, die wiederum nicht-aggressive als auch aggressive Verhaltenweisen beinhalten können. Die Ergebnisse aus Studie 3 weisen ebenfalls darauf hin, dass das neuronale Netzwerk der Stressbewältigung das aggressive Verhalten beeinflusst. So führte die Provokationsphase zur aggressiven Erregtheit, die mit einer gesteigerten Aktivierung von Arealen des Stressnetzwerks einherging und zu einem gesteigerten aggressiven Verhalten führte. Zusammen mit den Daten anderer deuten die vorliegenden Daten auf eine teilweise Überlappung der neuronalen Netzwerke des aggressiven Verhaltens und der Stressbewältigung hin. Somit scheinen die Stressbewältigung und das territoriale Verhalten eng miteinander verknüpft zu sein und sich gegenseitig zu bedingen. Die Ergebnisse verdeutlichen gleichzeitig die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen der beteiligten Hirngebiete wie Doppelanfärbungen und Rezeptornachweise zur Differenzierung zwischen aggressions- und stressbedingten neuronalen Prozessen.

## 7. Literaturverzeichnis

- AGHAJANIAN GK, SANDERS-BUSH E. Serotonin. In: Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C (Eds.). *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. Nashville, TN: American College of Neuropsychopharmacology. 2002 pp. 15-34.
- ALBERT DJ, WALSH ML, JONIK RH. Aggression in humans: what is its biological foundation? *Neurosci Biobehav Rev*. 1993 Winter;17(4):405-25.
- ANNEN Y, FUJITA O. Septal lesions and biting attacks in rats bidirectionally selected for emotionality. *Behav Neural Biol*. 1985 Mar;43(2):132-42.
- BALL GF, BALTHAZART J. Sexual arousal, is it for mammals only? *Horm Behav*. 2011 May;59(5):645-55. Epub 2010 Nov 9.
- BAMBICO FR, NGUYEN NT, GOBBI G. Decline in serotonergic firing activity and desensitization of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors after chronic unpredictable stress. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2009 Mar;19(3):215-28. Epub 2009 Jan 15.
- BARNES NM, SHARP T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*. 1999 Aug;38(8):1083-152.
- BARRAT ES, STANFORD MS, DOWDY L, LIEBMAN MJ, KENT TA. Impulsive and premediated aggression: A factor analysis of self-reported acts. *Psychiatry Research* 1999 May 31;86(2):163-73.
- BARTON RA, AGGLETON JP, GRENYER R. Evolutionary coherence of the mammalian amygdala. *Proc Biol Sci*. 2003 Mar 7;270(1514):539-43.
- BASAR K, SESIA T, GROENEWEGEN H, STEINBUSCH HW, VISSER-VANDEWALLE V, TEMEL Y. Nucleus accumbens and impulsivity. *Prog Neurobiol*. 2010 Dec;92(4):533-57. Epub 2010 Sep 8.
- BEIDERBECK DI, NEUMANN ID, VEENEMA AH. Differences in intermale aggression are accompanied by opposite vasopressin release patterns within the septum in rats bred for low and high anxiety. *Eur J Neurosci*. 2007 Dec;26(12):3597-605. Epub 2007 Dec 4.
- BEIDERBECK DI, REBER SO, HAVASI A, BREDEWOLD R, VEENEMA AH, NEUMANN ID. High and abnormal forms of aggression in rats with extremes in trait anxiety - Involvement of the dopamine system in the nucleus accumbens. *Psychoneuroendocrinology*. 2012 Dec;37(12):1969-80. Epub 2012 May 16.
- BENUS RF, BOHUS B, KOOLHAAS JM, VAN OORTMERSSEN GA. Heritable variation for aggression as a reflection of individual coping strategies. *Experientia*. 1991 Oct 15;47(10):1008-19.
- BERMAN ME, TRACY JI, COCCARO EF. The serotonin hypothesis of aggression revisited. *Clin Psychol Rev*. 1997;17(6):651-65.
- BLAIR RJ. The roles of orbital frontal cortex in the modulation of antisocial behavior. *Brain Cogn*. 2004 Jun;55(1):198-208.
- BLANCHARD DC, CHOLVANICH P, BLANCHARD RJ, CLOW DW, HAMMER RP JR, ROWLETT JK, ET AL. Serotonin, but not dopamine, metabolites are increased in selected brain regions of subordinate male rats in a colony environment. *Brain Res*. 1991 Dec 24; 568(1-2):61-6.
- BLANCHARD DC, SAKAI RR, MCEWEN B, WEISS SM, BLANCHARD RJ. Subordination stress: behavioral, brain, and neuroendocrine correlates. *Behav Brain Res*. 1993 Dec 20; 58(1-2):113-21.



- BRUIJNZEEL AW, STAM R, COMPAAN JC, CROISET G, AKKERMANS LM, OLIVIER B, ET AL. Long-term sensitization of Fos-responsivity in the rat central nervous system after a single stressful experience. *Brain Res.* 1999 Feb 20;819(1-2):15-22.
- BRUNZELL DH, KIM JJ. Fear conditioning to tone, but not to context, is attenuated by lesions of the insular cortex and posterior extension of the intralaminar complex in rats. *Behav Neurosci.* 2001 Apr;115(2):365-75.
- BUSHMAN BJ, ANDERSON CA. Is it time to pull the plug on the hostile versus instrumental aggression dichotomy? *Psychol Rev.* 2001 Jan;108(1):273-9.
- CAMPOS AC, FERREIRA FR, GUIMARARES FS. Cannabidiol blocks long-lasting behavioral consequences of predator threat stress: possible involvement of 5HT1A receptors. *J Psychiatr Res.* 2012 Nov;46(11):1501-10. Epub 2012 Sep 11.
- CARAMASCHI D, DE BOER SF, KOOLHAAS JM. Differential role of the 5-HT1A receptor in aggressive and non-aggressive mice: an across-strain comparison. *Physiol Behav.* 2007; 90(4):590-601.
- CARAMASCHI D, DE BOER SF, DE VRIES H, KOOLHAAS JM. Development of violence in mice through repeated victory along with changes in prefrontal cortex neurochemistry. *Behav Brain Res.* 2008 Jun;189(2):263-72. Epub 2008 Jan 15.
- CARDINAL RN, PENNICOTT DR, SUGATHAPALA CL, ROBBINS TW, EVERITT BJ. Impulsive choice induced in rats by lesions of the nucleus accumbens core. *Science.* 2001 Jun;292(5526):2499-501. Epub 2001 May 24.
- CARDINAL RN. Neural systems implicated in delayed and probabilistic reinforcement. *Neural Netw.* 2006 Oct;19(8):1277-301. Epub 2006 Aug 30.
- CENTENARO LA, VIEIRA K, ZIMMERMANN N, MICZEK KA, LUCION AB, DE ALMEIDA RM. Social instigation and aggressive behavior in mice: role of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in the prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl).* 2008 Dec; 201(2):237-48. Epub 2008 Aug 8.
- CERDÁ M, DIGANGI J, GALEA S, KOENEN K. Epidemiologic research on interpersonal violence and common psychiatric disorders: where do we go from here? *Depress Anxiety.* 2012 May;29(5):359-85.
- CHAMBERS RA, POTENZA MN. Neurodevelopment, impulsivity, and adolescent gambling. *J Gambl Stud.* 2003 Spring;19(1):53-84.
- CHIAVEGATTO S, QUADROS IMH, AMBAR G, MICZEK KA. Individual vulnerability to escalated aggressive behavior by a low dose of alcohol: decreased serotonin receptor mRNA in the prefrontal cortex of male mice. *Genes Brain Behav.* 2010; 9(1):110-9.
- CLARK MS, MCDEVITT RA, HOPLIGHT BJ, NEUMAIER JF. Chronic low dose ovine corticotropin releasing factor or urocortin II into the rostral dorsal raphe alters exploratory behavior and serotonergic gene expression in specific subregions of the dorsal raphe. *Neuroscience.* 2007 Jun 8;146(4):1888-905. Epub 2007 Apr 30.
- COMPAAN JC, GROENINK L, VAN DER GUGTEN J, MAES RA, OLIVIER B. 5-HT1A receptor agonist flesinoxan enhances Fos immunoreactivity in rat central amygdala, bed nucleus of the stria terminalis and hypothalamus. *Eur J Neurosci.* 1996 Nov;8(11):2340-7.

- COOPER MA, GROBER MS, NICHOLAS CR, HUHMAN KL. Aggressive encounters alter the activation of serotonergic neurons and the expression of 5-HT1A mRNA in the hamster dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*. 2009; 161(3):680-90.
- CORBIT LH, BALLEINE BW. The general and outcome-specific forms of Pavlovian-instrumental transfer are differentially mediated by the nucleus accumbens core and shell. *J Neurosci*. 2011 Aug; 31(33):11786-94.
- COUPPIS MH, KENNEDY CH. The rewarding effect of aggression is reduced by nucleus accumbens dopamine receptor antagonism in mice. *Psychopharmacology (Berl.)*. 2008 Apr;197(3):449-56. Epub 2008 Jan 8.
- CZÉH B, PEREZ-CRUZ C, FUCHS E, FLÜGGE G. Chronic stress-induced cellular changes in the medial prefrontal cortex and their potential clinical implications: does hemisphere location matter? *Behav Brain Res*. 2008 Jun 26;190(1):1-13. Epub 2008 Mar 10.
- CZYRAK A, CZEPIEL K, MAĆKOWIAK M, CHOCYK A, WEDZONY K. Serotonin 5-HT1A receptors might control the output of cortical glutamatergic neurons in rat cingulate cortex. *Brain Res*. 2003 Oct 31;989(1):42-51.
- DAHLBERG LL, KRUG EG. Violence – a global public health problem. In: Krug EG, Dahlberg LL, Mercy JA, Zwi AB, Lozano R (Eds.). *World report on violence and health*. Geneva: World Health Organization. 2002. p. 1-19.
- DALLEY JW, CARDINAL RN, ROBBINS TW. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004 Nov;28(7):771-84.
- DALLEY JW, MAR AC, ECONOMIDOU D, ROBBINS TW. Neurobehavioral mechanisms of impulsivity: fronto-striatal systems and functional neurochemistry. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008 Aug;90(2):250-60. Epub 2007 Dec 27.
- DAVIS M, SHI C. The extended amygdala: are the central nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis differentially involved in fear versus anxiety? *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Jun 29;877:281-91.
- DE ALMEIDA RM, LUCION AB. 8-OH-DPAT in the median raphe, dorsal periaqueductal gray and corticomедial amygdala nucleus decreases, but in the medial septal area it can increase maternal aggressive behavior in rats. *Psychopharmacology*. 1997;134(4):392-400.
- DE ALMEIDA RM, MICZEK KA. Aggression escalated by social instigation or by discontinuation of reinforcement (“frustration”) in mice: inhibition by anpirtoline: a 5-HT1B receptor agonist. *Neuropsychopharmacology*. 2002 Aug;27(2):171–81.
- DE ALMEIDA RM, FERRARI PF, PARMIGIANI S, MICZEK KA. Escalated aggressive behavior: dopamine, serotonin and GABA. *Eur J Pharmacol*. 2005 Dec;526(1-3):51-64.
- DE BOER SF, LESOURD M, MOCAER E, KOOLHAAS JM. Selective antiaggressive effects of alnespirone in resident-intruder test are mediated via 5-hydroxytryptamine1A receptors: A comparative pharmacological study with 8-hydroxy-2-dipropylaminotetralin, ipsapirone, buspirone, eltoprazine, and WAY-100635. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;288(3):1125-33.
- DE BOER SF, VAN DER VEGT BJ, KOOLHAAS JM. Individual variation in aggression of feral rodent strains: a standard for the genetics of aggression and violence? *Behav Genet*. 2003 Sep;33(5):485-501.

- DE BOER SF, KOOLHAAS JM. 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonists and aggression: A pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis. *Eur J Pharmacol.* 2005;526(1-3):125-39.
- DE BOER SF, CARAMASCHI D, NATARAJAN D, KOOLHAAS JM. The vicious cycle towards violence: focus on the negative feedback mechanisms of brain serotonin neurotransmission. *Front Behav Neurosci.* 2009;3:52. Epub 2009 Nov 20.
- DE BRUIN JP, VAN OYEN HG, VAN DE POLL N. Behavioural changes following lesions of the orbital prefrontal cortex in male rats. *Behav Brain Res.* 1983 Dec;10(2-3):209-32.
- DE BRUIN JPC. Orbital prefrontal cortex, dopamine, and social-agonistic behavior of male long evans rats. *Aggressive Behav.* 1990;16(3-4):231–248.
- DE VRY J. 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists: recent developments and controversial issues. *Psychopharmacology.* 1995;121(1):1-26.
- DE WIT S, KOSAKI Y, BALLEINE, BW, DICKINSON A. Dorsomedial prefrontal cortex resolves response conflict in rats. *J Neurosci.* 2006 May;26(19):5224-9.
- DUNCAN GE, KNAPP DJ, BREESE GR. Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Res.* 1996 Mar 25;713(1-2):79-91.
- FEKETE EM, ZHAO Y, LI C, SABINO V, VALE WW, ZORRILLA EP. Social defeat stress activates medial amygdala cells that express type 2 corticotropin-releasing factor receptor mRNA. *Neuroscience.* 2009 Aug 4;162(1):5-13. Epub 2009 Apr 7.
- FERRARI PF, VAN ERP AM, TORNATZKY W, MICZEK KA. Accumbal dopamine and serotonin in anticipation of the next aggressive episode in rats. *Eur J Neurosci.* 2003 Jan;17(2):371-8.
- FISH EW, FACIDOMO S, MICZEK KA. Aggression heightened by alcohol or social instigation in mice: reduction by the 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonist CP-94,253. *Psychopharmacology (Berl).* 1999 Oct;146(4):391-9.
- FLÜGGE G. Dynamics of central nervous 5-HT<sub>1A</sub>-receptors under psychosocial stress. *J Neurosci.* 1995;15(11):7132-40.
- FUNK D, STEWART J. Role of catecholamines in the frontal cortex in the modulation of basal and stress-induced autonomic output in rats. *Brain Res.* 1996 Nov 25;741(1-2):220-9.
- GABBOTT PL, WARNER TA, JAYS PR, BACON SJ. Areal and synaptic interconnectivity of prelimbic (area 32), infralimbic (area 25) and insular cortices in the rat. *Brain Res.* 2003 Dec;993(1-2):59-71.
- GILPIN NW. Corticotropin-releasing factor (CRF) and neuropeptide Y (NPY): effects on inhibitory transmission in central amygdala, and anxiety- & alcohol-related behaviors. *Alcohol.* 2012 Jun;46(4):329-37. Epub 2012 May 4.
- GUI ZH, ZHANG QJ, LUI J, ZHANG L, ALI U, HOU C, ET AL. Unilateral lesion of the nigrostriatal pathway decreases the response of fast-spiking interneurons in the medial prefrontal cortex to 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist and expression of the receptor in parvalbumin-positive neurons in the rat. *Neurochem Int.* 2011 Oct;59(5):618-27. Epub 2011 Jun 13.
- HAJOS M, HAJOS-KORCSOK E, SHARP T. Role of the medial prefrontal cortex in 5-HT<sub>1A</sub> receptor-induced inhibition of 5-HT neuronal activity in the rat. *Br J Pharmacol.* 1999; 126(8):1741-50.

- HALLER J, VAN DE SCHRAAF J, KRUK MR. Deviant forms of aggression in glucocorticoid hyporeactive rats: a model for 'pathological' aggression? *J Neuroendocrinol*. 2001 Jan;13(1):102-7.
- HALLER J, TÓTH M, HALÁSZ J. The activation of raphe serotonergic neurons in normal and hypoarousal-driven aggression: a double labelling study in rats. *Behav Brain Res*. 2005 Jun;161(1):88-94. Epub 2005 Feb 12.
- HALLER J, TÓTH M, HALÁSZ J, DE BOER SF. Patterns of violent aggression-induced brain c-fos expression in male mice selected for aggressiveness. *Physiol Behav*. 2006 Jun;88(1-2):173-82. Epub 2006 May 9.
- HALLER J, KRUK MR. Normal and abnormal aggression: human disorders and novel laboratory models. *Neurosci Biobehav Rev*. 2006;30(3):292-303.
- HALÁSZ J, LIPOSITS Z, KRUK MR, HALLER J. Neural background of glucocorticoid dysfunction-induced abnormal aggression in rats: involvement of fear- and stress-related structures. *Eur J Neurosci*. 2002a Feb;15(3):561-9.
- HALÁSZ J, LIPOSITS Z, MEELIS W, KRUK MR, HALLER J. Hypothalamic attack-area-mediated activation of the forebrain in aggression. 2002b Jul;13(10):1267-70.
- HALÁSZ J, TÓTH M, KALLÓ, LIPOSITS Z, HALLER J. The activation of prefrontal cortical neurons in aggression--a double labeling study. *Behav Brain Res*. 2006 Nov;175(1):166-75. Epub 2006 Sep 15.
- HALÁSZ J, TÓTH M, MIKICS E, HRABOVSKY E, BARSY B, BARSVARI B, ET AL. The effect of neurokinin1 receptor blockade on territorial aggression in a model of violent aggression. *Biol Psychiatry*. 2008 Feb;63(3):271-8. Epub 2007 Aug 3.
- HAMON M, GOZLAN H, EL MESTIKAWY S, EMERIT MB, BOLANOS F, SCHECHTER L. The central 5-HT1A receptors: pharmacological, biochemical, functional, and regulatory properties. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;600:114-29.
- HEIDBREDE CA, GROENEWEGEN HJ. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003 Oct;27(6):555-79.
- HENSLER JG. Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci Biobehav Rev*. 2006;30(2):203-14. Epub 2005 Sep 12.
- HOLMES A. Genetic variation in cortico-amygdala serotonin function and risk for stress-related disease. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008 Sep;32(7):1293-314. Epub 2008 Mar 26.
- HOOVER WB, VERTES RP. Projections of the medial orbital and ventral orbital cortex in the rat. *J Comp Neurol*. 2011 Dec;519(18):3766-801.
- HUGHES P, DRAGUNOW M. Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol Rev*. 1995 Mar;47(1):133-78.
- IYO AH, KIERAN N, CHANDRAN A, ALBERT PR, WICKS, I, BISSETTE G, ET AL. Differential regulation of the serotonin 1 A transcriptional modulators five prime repressor element under dual repression-1 and nuclear-deformed epidermal autoregulatory factor by chronic stress. *Neuroscience*. 2009 Nov 10;163(4):1119-27. Epub 2009 Jul 30.
- JONGSMA ME, SEBENS JB, BOSKER FJ, KORF J. Effect of 5-HT1A receptor-mediated serotonin augmentation on Fos immunoreactivity in rat brain. *Eur J Pharmacol*. 2002 Nov 29;455(2-3):109-15.

- KIERAN N, OU XM, IYO AH. Chronic social defeat downregulates the 5-HT1A receptor but not Freud-1 or NUDR in the rat prefrontal cortex. *Neurosci Lett*. 2010 Jan 29;469(3):380-4. Epub 2009 Dec 18.
- KIM JJ, HALLER J. Glucocorticoid hyper- and hypofunction: stress effects on cognition and aggression. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Oct;1113:291-303. Epub 2007 May 18.
- KOOLHAAS JM, SCHUURMAN T, WIEPKEMA PR. The organization of intraspecific agonistic behaviour in the rat. *Prog Neurobiol*. 1980;15(3):247-68.
- KOLB B, PELLIS S, ROBINSON TE. Plasticity and functions of the orbital frontal cortex. *Brain Cogn*. 2004 Jun;55(1):104-15.
- KOPROWSKA M, KROTEWICZ M, ROMANIUK A, STRZELCZUK M, WIECZOREK M. Fear behavior and regional brain monoamines distribution after R(+)-8-OHDPAT and R(+)-UH-301 injections into the dorsal raphe nucleus in rats. *Acta Neurobiol Exp. (Wars)*. 2002;62(2):63-74.
- KORTE S, MEIJER OC, KLOET ER, BUWALDA B, KEIJER J, SLUYTER F, ET AL. Enhanced 5-HT1A receptor expression in forebrain regions of aggressive house mice. *Brain Res*. 1996 Oct;736(1-2):338-43.
- KRUK MR, VAN DER LAAN CE, VAN DER POEL AM, VAN ERP AMM, MEELIS W. Strain differences in attack patterns elicited by electrical stimulation in the hypothalamus of male CPBWEzob and CPBWI rats. *Aggress Behav*. 1990;16:177-190.
- LAARIS N, LE POUL E, HAMON M, LANFUMEX L. Stress-induced alterations of somatodendritic 5-HT1A autoreceptor sensitivity in the rat dorsal raphe nucleus--in vitro electrophysiological evidence. *Fundam Clin Pharmacol*. 1997;11(3):206-14.
- LEUTGEB S, MIZUMORI SJ. Excitotoxic septal lesions result in spatial memory deficits and altered flexibility of hippocampal single-unit representations. *J Neurosci*. 1999 Aug 1;19(15):6661-72.
- LEVENTOPOULOS M, RUSSIG H, FELDON J, PRYCE CR, OPACKA-JUFFRY J. Early deprivation leads to long-term reductions in motivation for reward and 5-HT1A binding and both effects are reversed by fluoxetine. *Neuropharmacology*. 2009 Mar;56(3):692-701. Epub 2008 Dec 24.
- LUO Q, NAKIC M, WHEATLEY T, RICHELL R, MARTIN A, BLAIR RJ. The neural basis of implicit moral attitude--an IAT study using event-related fMRI. *Neuroimage*. 2006 May 1;30(4):1449-57. Epub 2006 Jan 18.
- MAIER SF, WATKINS LR. Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(4-5):829-41.
- MARQUEZ C, POIRIER GL, CORDERO MI, LARSEN MH, GRONER A, MARQUIS J, ET AL. Peripuberty stress leads to abnormal aggression, altered amygdala and orbitofrontal reactivity and increased prefrontal MAOA gene expression. *Transl Psychiatry*. 2013 Jan 15;3:e216.
- MARTINEZ M, PHILLIPS PJ, HERBERT J. Adaptation in patterns of c-fos expression in the brain associated with exposure to either single or repeated social stress in male rats. *Eur J Neurosci*. 1998 Jan;10(1):20-33.
- MARTINEZ M, CALVO-TORRENT A, HERBERT J. Mapping brain response to social stress in rodents with c-fos expression: a review. *Stress*. 2002 Feb;5(1):3-13.

- MCDEVITT RA, NEUMAIER JF. Regulation of dorsal raphe nucleus function by serotonin autoreceptors: a behavioral perspective. *J Chem Neuroanat.* 2011 Jul;41(4):234-46. Epub 2011 May 8.
- McKITTRICK CR, BLANCHARD RJ, McEWEN BS, SAKAI RR. Serotonin receptor binding in a colony model of chronic social stress. *Biol Psychiatry.* 1995 Mar 15;37(6):383-93.
- MECHAN AO, MORAN PM, ELLIOTT MJ, YOUNG AJ, JOSEPH MH, GREEN RA. A comparison between Dark Agouti and Sprague-Dawley rats in their behaviour on the elevated plus-maze, open-field apparatus and activity meters, and their response to diazepam. *Psychopharmacology (Berl.).* 2002 Jan;159(2):188-95. Epub 2001 Sep 22.
- MICZEK KA, WEERTS E, HANEY M, TIDEY J. Neurobiological mechanisms controlling aggression: preclinical developments for pharmacotherapeutic interventions. *Neurosci Biobehav Rev.* 1994 Spring;18(1):97-110.
- MICZEK KA, HUSSAINE S, FACCIDOMO S. Alcohol-heightened aggression in mice: attenuation by 5-HT1A receptor agonists. *Psychopharmacology.* 1998;139(1-2):160-8.
- MICZEK KA, FISH EW, DE BOLD JF, DE ALMEIDA RM. Social and neural determinants of aggressive behavior: pharmacotherapeutic targets at serotonin, dopamine and gamma-aminobutyric acid systems. *Psychopharmacology (Berl).* 2002 Oct;163(3-4):434-58. Epub 2002 Aug 6.
- MICZEK KA, FISH EW, DE BOLD JF. Neurosteroids, GABAA receptors, and escalated aggressive behavior. *Horm Behav.* 2003 Sep;44(3):242-57.
- MICZEK KA, FACCIDOMO S, DE ALMEIDA RM, BANNAI M, FISH EW, DEBOLD JF. Escalated aggressive behavior: new pharmacotherapeutic approaches and opportunities. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Dec;1036:336-55.
- MICZEK KA, DE ALMEIDA RMM, KRAVITZ EA, RISSMAN EF, DE BOER SF, RAINE A. Neurobiology of escalated aggression and violence. *J Neurosci.* 2007; 27(44):11803-6.
- MICZEK KA, NIKULINA EM, TAKAHASHI A, COVINGTON HE 3<sup>RD</sup>, YAP JJ, BOYSON CO, ET AL. Gene expression in aminergic and peptidergic cells during aggression and defeat: relevance to violence, depression and drug abuse. *Behav Genet.* 2011 Nov;41(6):787-802. Epub 2011 Mar 17.
- MICZEK KA, DE BOER SF, HALLER J. Excessive aggression as model of violence: a critical evaluation of current preclinical methods. *Psychopharmacology (Berl).* 2013 Apr;226(3):445-58. Epub 2013 Feb 21.
- MOBINI S, BODY S, HO MY, BRADSHAW CM, SZABADI E, DEAKIN JF, ET AL. Effects of lesions of the orbitofrontal cortex on sensitivity to delayed and probabilistic reinforcement. *Psychopharmacology (Berl.).* 2002 Mar;160(3):290-8. Epub 2002 Jan 25.
- MORILAK DA, CECCHI K, KHOSHBOUEI H. Interactions of norepinephrine and galanin in the central amygdala and lateral bed nucleus of the stria terminalis modulate the behavioral response to acute stress. *Life Sci.* 2003 Jun 27;73(6):715-26.
- NEUMANN ID, VEENEMA AH, BEIDERBECK DI. Aggression and anxiety: social context and neurobiological links. *Front Behav Neurosci.* 2010 Mar;4:12.
- NIKULINA EM, ARRILLAGA-ROMANY I, MICZEK KA, HAMMER RP JR. Long-lasting alteration in mesocorticolimbic structures after repeated social defeat stress in rats: time course of mu-opioid receptor mRNA and FosB/DeltaFosB immunoreactivity. *Eur J Neurosci.* 2008 May;27(9):2272-84.

- NISHI K, KANEMARU K, HASEGAWA S, WATANABE A, DIKSIC M. Both acute and chronic buspirone treatments have different effects on regional 5-HT synthesis in Flinders Sensitive Line rats (a rat model of depression) than in control rats. *Neurochem Int.* 2009 Mar-Apr;54(3-4):205-14. Epub 2008 Nov 25.
- NUMANN R. Septal modulation of the working memory for voluntary behaviour. In: Numann R (Ed.). *The Behavioral Neuroscience of the Septal Region.* Springer-Verlag, New York. 2000 pp. 298-326.
- OLIVIER B, MOS J, VAN OORSCHOT R, HEN R. Serotonin receptors and animal models of aggressive behaviour. *Pharmacopsychiatry.* 1995;28 Suppl 2:80-90.
- OLIVIER B. Serotonin and aggression. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1036:382-92.
- OUALIAN C, GISQUET-VERRIER P. The differential involvement of the prelimbic and infralimbic cortices in response conflict affects behavioral flexibility in rats trained in a new automated strategy-switching task. *Learn Mem.* 2010 Nov;17(12):654-68.
- PAXINOS G, WATSON C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 4<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic Press. 1998.
- PERRY JL, JOSEPH JE, JIANG Y, ZIMMERMANN RS, KELLY TH, DARNA M, ET AL. Prefrontal cortex and drug abuse vulnerability: translation to prevention and treatment interventions. *Brain Res Rev.* 2011 Jan 1;65(2):124-49. Epub 2010 Sep 15.
- PINEYRO G, BLIER P. Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacol Rev.* 1999;51(3):533-91.
- PITKÄNEN A. Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: Aggleton JP (Ed.). *The amygdala. A functional analysis.* Oxford University Press. 2000 pp. 31-116.
- POPOVA NK, AVGUSTINOVICH DF, KOLPAKOV VG, PLYUSNINA IZ. Specific [3H]8-OH-DPAT binding in brain regions of rats genetically predisposed to various defense behavior strategies. *Pharmacol Biochem Behav.* 1998 Apr;59(4):793-7.
- POPOVA NK, NAUMENKO VS, PLYUSNINA IZ, KULIKOV AV. Reduction in 5-HT<sub>1A</sub> receptor density, 5-HT<sub>1A</sub> mRNA expression, and functional correlates for 5-HT<sub>1A</sub> receptors in genetically defined aggressive rats. *J Neurosci Res.* 2005 Apr;80(2):286-92.
- POPOVA NK. From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system. *Bioessays.* 2006 May;28(5):495-503.
- POPOVA NK, NAUMENKO VS, PLYUSNINA IZ. Involvement of brain serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors in genetic predisposition to aggressive behavior. *Neurosci Behav Physiol.* 2007 Jul;37(6):631-5.
- POTEGAL M. Attack priming and satiation in female golden hamsters: Tests of some alternatives to the aggression arousal interpretation. *Aggr Behav.* 1991; 17(6):327-35.
- POTEGAL M. Time course of aggressive arousal in female hamsters and male rats. *Behav Neural Biol.* 1992 Sep;58(2):120-4.
- POTHUIZEN HH, JONGEN-RÈLO AL, FELDON J, YEE BK. Double dissociation of the effects of selective nucleus accumbens core and shell lesions on impulsive-choice behaviour and salience learning in rats. *Eur J Neurosci.* 2005 Nov;22(10):2605-16.

- PUIG MV, GULLEDGE AT. Serotonin and prefrontal cortex function: neurons, networks, and circuits. *Mol Neurobiol.* 2011 Dec;44(3):449-64. Epub 2011 Nov 11.
- RADANT P. Untersuchungen zum Aggressionsverhalten männlicher Ratten und zur Modulation der Aggressivität durch serotonerge Pharmaka unter Berücksichtigung weiterer Verhaltensweisen [dissertation]. Bremen: University of Bremen; 2009. Germany (<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:gbv:46-diss000118576>).
- RAGHUPATHI RK, MCGONIGLE P. Differential effects of three acute stressors on the serotonin 5-HT1A receptor system in rat brain. *Neuroendocrinology.* 1997;65(4):246-58.
- REMPEL-CLOWER NL. Role of orbitofrontal cortex connections in emotion. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Dec;1121:72-86. Epub 2007 Sep 10.
- ROBINSON ES, EAGLE DM, MAR AC, BARI A, BANERJEE G, JIANG X, ET AL. Similar effects of the selective noradrenaline reuptake inhibitor atomoxetine on three distinct forms of impulsivity in the rat. *Neuropsychopharmacology.* 2008 Apr;33(5):1028-37. Epub 2007 Jul 18.
- RODGERS KM, BENISON AM, KLEIN A, BARTH DS. Auditory, somatosensory, and multisensory insular cortex in the rat. *Cereb Cortex.* 2008 Dec;18(12):2941-51. Epub 2008 Apr 18.
- ROESCH MR, CALU DJ, BURKE KA, SCHOENBAUM G. Should I stay or should I go? Transformation of time-discounted rewards in orbitofrontal cortex and associated brain circuits. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 May;1104:21-34. Epub 2007 Mar 7
- ROY V, CHAPILLON P. Further evidences that risk assessment and object exploration behaviours are useful to evaluate emotional reactivity in rodents. *Behav Brain Res.* 2004 Oct;154(2):439-48.
- ROZESKE RR, EVANS AK, FRANK MG, WATKINS LR, LOWRY CA, MAIER SF. Uncontrollable, but not controllable, stress desensitizes 5-HT1A receptors in the dorsal raphe nucleus. *J Neurosci.* 2011 Oct 5;31(40):14107-15.
- RUDEBECK PH, WALTON ME, SMYTH AN, BANNERMAN DM, RUSHWORTH MF. Separate neural pathways process different decision costs. *Nat Neurosci.* 2006 Sep;9(9):1161-8. Epub 2006 Aug 20.
- RUDEBECK PH, WALTON ME, MILLETTE BH, SHIRLEY E, RUSHWORTH MF, BANNERMAN DM. Distinct contributions of frontal areas to emotion and social behaviour in the rat. *Eur J Neurosci.* 2007 Oct;26(8):2315-26. Epub 2007 Oct 10.
- SAGAR SM, SHARP FR, CURRAN T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science.* 1988 Jun;240(4857):1328-31.
- SAHA S, GAMBOA-ESTEVEZ FO, BATTEN TF. Differential distribution of 5-HT 1A and 5-HT 1B-like immunoreactivities in rat central nucleus of the amygdala neurones projecting to the caudal dorsomedial medulla oblongata. *Brain Res.* 2010 May 12;1330:20-30. Epub 2010 Mar 11.
- SALOMÉ N, SALCHNER P, VILTART O, SEQUEIRA H, WIGGER A, LANDGRAF R, ET AL. Neurobiological correlates of high (HAB) versus low anxiety-related behaviour (LAB): differential Fos expression in HAB and LAB rats. *Biol Psychiatry.* 2004 Apr;55(7):715-23.
- SANTANA N, BORTOLOZZI A, SERRATS J, MENGOD G, ARTIGAS F. Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex.* 2004 Oct;14(10):1100-9. Epub 2004 Apr 27.



- SARI Y. Serotonin<sub>1B</sub> receptors: From protein to physiological function and behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 2004 Oct;28(6):565-82.
- SAXENA PR. Serotonin receptors: Subtypes, functional responses and therapeutic relevance. *Pharmacol Ther.* 1995 May;66(2):339-68.
- SENBA E, UEYAMA T. Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat. *Neurosci Res.* 1997 Nov;29(3):183-207.
- SHEEHAN TP, CHAMBERS RA, RUSSELL DS. Regulation of affect by the lateral septum: implications for neuropsychiatry. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004 Aug;46(1):71-117.
- SHIN LM, LIBERZON I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology.* 2010 Jan;35(1):169-91.
- SHISHKINA GT, KALININA TS, DYGALO NN. Effects of swim stress and fluoxetine on 5-HT<sub>1A</sub> receptor gene expression and monoamine metabolism in the rat brain regions. *Cell Mol Neurobiol.* 2012 Jul;32(5):787-94. Epub 2012 Mar 29.
- SIEGEL A, ROELING TA, GREGG TR, KRUK MR. Neuropharmacology of brain-stimulation-evoked aggression. *Neurosci Biobehav Rev.* 1999;23(3):359-89.
- SPENCER SJ, FOX JC, DAY TA. Thalamic paraventricular nucleus lesions facilitate central amygdala neuronal responses to acute psychological stress. *Brain Res.* 2004 Feb;997(2):234-7.
- SPENCER SJ, DAY TA. Role of catecholaminergic inputs to the medial prefrontal cortex in local and subcortical expression of Fos after psychological stress. *J Neurosci Res.* 2004 Oct;78(2):279-88.
- STEVENSON CW, GRATTON A. Basolateral amygdala modulation of the nucleus accumbens dopamine response to stress: role of the medial prefrontal cortex. *Eur J Neurosci.* 2003 Mar;17(6):1287-95.
- STOPPER CM, GREEN EB, FLORESCO SB. Selective Involvement by the Medial Orbitofrontal Cortex in Biasing Risky, But Not Impulsive, Choice. *Cereb Cortex.* 2012 Oct 4. Epub ahead of print.
- TAKAHASHI A, QUADROS IM, DE ALMEIDA RMM, MICZEK KA. Brain serotonin receptors and transporters: initiation vs. termination of escalated aggression. *Psychopharmacology.* 2011; 213(2-3):183-212.
- TEJANI-BUTT SM, LABOW DM. Time course of the effects of adrenalectomy and corticosterone replacement on 5-HT<sub>1A</sub> receptors and 5-HT uptake sites in the hippocampus and dorsal raphe nucleus of the rat brain: an autoradiographic analysis. *Psychopharmacology (Berl).* 1994 Jan;113(3-4):481-6.
- TÖRK I. Anatomy of the serotonergic system. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;600:9-34.
- TÓTH M, FUZESI T, HALÁSZ J, TULOGDI A, HALLER J. Neural inputs of the hypothalamic "aggression area" in the rat. *Behav Brain Res.* 2010 Dec 20;215(1):7-20. Epub 2010 Jun 4.
- TÓTH M, TULOGDI A, BIRO L, SOROS P, MIKICS E, HALLER J. The neural background of hyper-emotional aggression induced by post-weaning social isolation. *Behav Brain Res.* 2012 Jul 15;233(1):120-9. Epub 2012 Apr 23.
- TULOGDI A, TÓTH M, HALÁSZ J, MIKICS E, FUZESI T, HALLER J. Brain mechanisms involved in predatory aggression are activated in a laboratory model of violent intra-specific aggression. *Eur J Neurosci.* 2010 Nov;32(10):1744-53. Epub 2010 Oct 12.

- VAN DER VEGT BJ, DE BOER SF, BUWALDA B, DE RUITER AJ, DE JONG JG, KOOLHAAS JM. Enhanced sensitivity of postsynaptic serotonin-1A receptors in rats and mice with high trait aggression. *Physiol Behav.* 2001;74(1-2):205-11.
- VAN DER VEGT BJ, LIEUWES N, VAN DE WALL EHEM, KATO K, MOYA-ALBIOL L, MARTINEZ-SANCHIS S, ET AL. Activation of serotonergic neurotransmission during the performance of aggressive behavior in rats. *Behav Neurosci.* 2003a;117(4):667-74.
- VAN DER VEGT BJ, LIEUWES N, CREMERS TI, DE BOER SF, KOOLHAAS JM. Cerebrospinal fluid monoamine and metabolite concentrations and aggression in rats. *Horm Behav.* 2003b Sep;44(3):199-208.
- VAN ERP AM, MICZEK KA. Aggressive behavior, increased accumbal dopamine, and decreased cortical serotonin in rats. *J Neurosci.* 2000 Dec;20(24):9320-5.
- VEENEMA AH, CREMERS TI, JONGSMA ME, STEENBERGEN PJ, DE BOER SF, KOOLHAAS JM. Differences in the effects of 5-HT(1A) receptor agonists on forced swimming behavior and brain 5-HT metabolism between low and high aggressive mice. *Psychopharmacology (Berl.)*. 2005 Mar;178(2-3):151-60. Epub 2004 Sep 21.
- VEENEMA AH, NEUMANN ID. Neurobiological mechanisms of aggression and stress coping: a comparative study in mouse and rat selection lines. *Brain Behav Evol.* 2007;70(4):274-85. Epub 2007 Sep 18.
- VERTES RP. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience.* 2006 Sep 29;142(1):1-20. Epub 2006 Aug 2.
- VICENTIC A, FRANCIS D, MOFFETT M, LAKATOS A, ROGGE G, HUBERT GW, ET AL. Maternal separation alters serotonergic transporter densities and serotonergic 1A receptors in rat brain. *Neuroscience.* 2006 Jun 19;140(1):355-65. Epub 2006 Mar 13.
- VOLAVKA J. The neurobiology of violence: an update. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 1999 Summer;11(3):307-14.
- WASELUS M, VALENTINO RJ, VAN BOCKSTAELE EJ. Collateralized dorsal raphe nucleus projections: a mechanism for the integration of diverse functions during stress. *J Chem Neuroanat.* 2011 Jul;41(4):266-80. Epub 2011 May 30.
- WENK GL. The nucleus basalis magnocellularis cholinergic system: One hundred years of progress. *Neurobiol Learn Mem.* 1997 Mar;67(2):85-95.
- WINSTANLEY CA, THEOBALD DE, CARDINAL RN, ROBBINS TW. Contrasting roles of basolateral amygdala and orbitofrontal cortex in impulsive choice. *J Neurosci.* 2004 May;24(20):4718-22.
- WINSTANLEY CA. The utility of rat models of impulsivity in developing pharmacotherapies for impulse control disorders. *Br J Pharmacol.* 2011 Oct;164(4):1301-21.
- YOKOYAMA C, SASAKI K. Regional expressions of Fos-like immunoreactivity in rat cerebral cortex after stress; restraint and intraperitoneal lipopolysaccharide. *Brain Res.* 1999 Jan 23;816(2):267-75.

## 8. Danksagung

Spezieller Dank gilt meinen großartigen Eltern! Ihr habt mich jederzeit in allen Bereichen des Lebens unterstützt und mich stets ermutigt – ohne euch hätte diese Arbeit nicht entstehen können!

Außerdem danke ich...

...Frau Prof. Dr. Ursula Dicke für die Überlassung des Themas und die Betreuung meiner Arbeit sowie für die große Unterstützung bei der Überarbeitung der Manuskripte. Ihre Anregungen und kritischen Kommentare haben zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

...Herrn Prof. Dr. Michael Koch für die bereitwillige Übernahme des zweiten Gutachtens.

...Frau Dr. Nicole Strüber und Herrn Prof. Dr. Dr. Gerhard Roth für die Teilnahme am Prüfungsausschuss.

...den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG Dicke für all die schönen und kuchenreichen Tage in der Abteilung. Tim, Fabian, David, Paul und Mareike, ich habe euch an mehr als einem Tag vermisst! Barbara danke ich für das Aufziehen der gefühlt 1 Million Schnitte. Namentlich seien an dieser Stelle außerdem Swetlana Baichel, Judith Kreuzmann und Maike Möller genannt, die im Rahmen ihres Biologiestudiums an der Durchführung einiger Versuche beteiligt waren.

...Frau Dr. Sarina Bäckermann für ihre Unterstützung bei Studie 1.

...Dorothea Kittlaus! Du hast mir nicht nur im Labor stets zur Seite gestanden, sondern auch bei allen Höhen und Tiefen der letzten Jahre.

...von ganzem Herzen Andi, der auch in den Stressphasen der Dissertation nie entnervt und immer für mich da war! Ohne deine Kraft und Ermutigungen hätte ich das alles nicht geschafft und vor allem nicht so viel Spaß gehabt!

...meiner Schwester Jule, meinem Bruder Christoph, Tante Margie, Lydi und Malin für die moralische Unterstützung, aufmunternde Worte und Postkarten, zuckerhaltige Überlebenspakete und für das in mich gesetzte Vertrauen.