

Aus dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München

Direktor: Prof. Dr. Dr. Florian Holsboer

Mechanismen der zentralen Stresshormonregulation –  
Der Einfluss von Stressexposition  
auf die Genexpression beteiligter Hormone und Rezeptoren

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Martin Greetfeld

aus  
München

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Marianne B. Müller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Danek  
Priv.-Doz. Dr. J. Schopohl

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 21.04.2005

# INHALT

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Depression und pathogenetische Konzepte	1
1.2 Das Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HPA)-System	2
1.2.1 Allgemeine Einführung: Regulation des Stresshormonsystems unter physiologischen Bedingungen	2
1.2.2 Das Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-System und Depression	3
1.2.3 Zentrale Regulationsmechanismen des HPA-Systems	5
1.2.3.1 Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH)	6
1.2.3.2 Corticotropin-Releasing-Hormon-Rezeptoren (CRHR)	6
1.2.3.3 Vasopressin (AVP)	7
1.2.3.4 Kortikosteroidrezeptoren: Glukokortikoid- (GR) und Mineralokortikoid- (MR) Rezeptor	8
1.3 Die Funktion von CRHR1: Befunde von Mausmutanten mit einer hirnauspezifischen Inaktivierung des Rezeptors	8
1.4 Ziele der Arbeit	11
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>13</b>
2.1 Tiere	13
2.2 Aufbau der Stress-Experimente	13
2.2.1 Aufbau des Experiments mit C57/Bl6-Mäusen	13
2.2.2 Aufbau des Experiments mit <i>Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre</i> -Mutanten	13
2.3 Gehirnpräparation und Gefrierschneiden	14
2.4 In situ-Hybridisierung	14
2.4.1 In situ-Hybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotidproben	14
2.4.1.1 Radioaktive Markierung der Oligosonde	14
2.4.1.2 Prähybridisierungsbehandlung der Schnitte	15
2.4.1.3 Hybridisierung	16
2.4.1.4 Waschen der Schnitte	16
2.4.2 In situ-Hybridisierung mit radioaktiv markierten Ribonukleotidproben	16
2.4.2.1 Markierung der Ribosonden mit <sup>35</sup> S-thio-rUTP	17
2.4.2.2 Prä-Hybridisierungsbehandlung der Schnitte und Hybridisierung	17
2.4.2.3 Waschen und Nachbehandlung	18

2.4.3	Autoradiographie	19
2.4.4	Färben und Eindecken	19
<b>2.5</b>	<b>Auswertung: Messung der optischen Dichte</b>	<b>20</b>
<b>2.6</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Zeitverlauf der stressabhängigen Genregulation bei C57/Bl6-Mäusen</b>	<b>23</b>
3.1.1	mRNA-Expression im Nucleus paraventricularis hypothalami (PVN)	23
3.1.1.1	Expression der CRH mRNA im PVN	23
3.1.1.2	Expression der CRHR1 mRNA im PVN	24
3.1.1.3	Expression der AVP mRNA im PVN	25
3.1.2	mRNA-Expression im Hippocampus	26
3.1.2.1	Expression der CRHR1 mRNA im Hippocampus	26
3.1.2.2	Expression der CRHR2 mRNA im Hippocampus	29
3.1.2.3	Expression der MR mRNA im Hippocampus	32
3.1.3	mRNA-Expression im Cortex	34
3.1.3.1	Expression der CRHR1 mRNA im Cortex	34
<b>3.2</b>	<b>Untersuchung der Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre-Mutanten</b>	<b>36</b>
3.2.1	mRNA-Expression im Nucleus paraventricularis hypothalami (PVN)	36
3.2.1.1	Expression der CRH mRNA im PVN	36
3.2.1.2	Expression der AVP mRNA im PVN	37
3.2.2	mRNA-Expression im Hippocampus	39
3.2.2.1	Expression der MR mRNA im Hippocampus	39
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>Einführung</b>	<b>42</b>
<b>4.2</b>	<b>Untersuchung der C57/Bl6-Tiere</b>	<b>43</b>
4.2.1	mRNA-Expression im PVN	43
4.2.1.1	Rascher, reversibler Anstieg der CRH mRNA-Expression im PVN nach „restraint stress“	44
4.2.1.2	Keine Änderung der CRHR1 mRNA-Expression im PVN nach „restraint stress“	45
4.2.1.3	Keine Regulation der AVP mRNA-Expression im PVN nach akutem „restraint stress“	47
4.2.2	mRNA-Expression im Hippocampus	48
4.2.2.1	Rascher Abfall der CRHR1 mRNA-Expression in CA1 und CA3, und verzögerter Anstieg der CRHR2 mRNA-Expression im DG nach „restraint stress“	49
4.2.2.2	Nachhaltiger Anstieg der MR mRNA-Expression in allen hippocampalen Regionen nach „restraint stress“	50

---

4.2.3	mRNA-Expression im Cortex	53
4.2.3.1	Rascher und nachhaltiger Abfall der CRHR1 mRNA-Expression im Neocortex nach einmaligem „restraint stress“	53
<b>4.3</b>	<b>Untersuchung der Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre-Mutanten</b>	<b>55</b>
4.3.1	mRNA-Expression im PVN	55
4.3.1.1	Analoger Anstieg der CRH mRNA-Expression im PVN nach „restraint stress“ bei Crhr1 <sup>loxP/loxP</sup> -Kontrolltieren und Crhr1 <sup>loxP/loxP</sup> NesCre-Mutanten	55
4.3.1.2	Kein Unterschied der AVP mRNA-Expression im PVN zwischen Crhr1 <sup>loxP/loxP</sup> -Kontrolltieren und Crhr1 <sup>loxP/loxP</sup> NesCre-Mutanten unter Basalbedingungen und nach „restraint stress“	58
4.3.2	mRNA-Expression im Hippocampus	59
4.3.2.1	Keine Regulation der MR mRNA in Abwesenheit von CRHR1	59
<b>4.4</b>	<b>Kernaussagen und klinischer Ausblick</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>63</b>
<b>DANKSAGUNG</b>		<b>65</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>		<b>66</b>
<b>LEBENS LAUF</b>		<b>76</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 *Depression und pathogenetische Konzepte*

Depression ist eine Volkskrankheit: Etwa jeder fünfte bis zehnte Mensch erkrankt im Laufe seines Lebens an einer depressiven Episode. Allein in Deutschland sind circa 4 Millionen Menschen betroffen, das sind 5% der Gesamtbevölkerung.

Die Krankheit versetzt den Betroffenen in einen unerträglichen seelischen Zustand: Er ist dauerhaft niedergeschlagen und traurig, verliert die Fähigkeit, sich zu freuen, seinen Antrieb, seine Konzentrations- und Leistungsfähigkeit; darüber hinaus leidet er an vegetativen Symptomen wie Schlaf- oder Appetitstörungen.

Oft engt sich die Gedankenwelt des Erkrankten so stark auf die Ausweglosigkeit der eigenen Situation ein, dass es zu Todesgedanken bis hin zu konkreten Selbsttötungsabsichten kommt: Bei circa 15% der Patienten endet die Erkrankung infolge Suizid tödlich. In der Altersgruppe der 15-35jährigen stellt der depressionsbedingte Suizid nach dem Unfalltod die zweithäufigste Todesursache dar.

Wie bei vielen psychiatrischen Erkrankungen wird auch bei den affektiven Störungen, zu denen die Depression gezählt wird, eine „multifaktorielle Ätiopathogenese“ angenommen. Dieses Konzept beschreibt das Zusammenwirken einer ererbten Vulnerabilität (einer anlagebedingten Verletzlichkeit), mit psychosozialen und neurobiologischen Faktoren, die gemeinsam letztendlich die Krankheit verursachen.

Die Beobachtung depressiogener Nebenwirkungen des Antihypertensivums Reserpin einerseits und der Befund einer antidepressiven Wirkung des Tuberkulostatikums Iproniazid andererseits in den 50er Jahren lenkte die Suche nach den möglichen neurobiologischen Ursachen der Depression aufgrund der entgegengesetzten zentralen Wirkmechanismen dieser Medikamente zunächst in die Richtung der Monoamine. Der Entdeckung der Antidepressiva, beginnend mit dem Trizyklikum Imipramin, folgten Befunde, dass diese Pharmaka die Konzentration von Monoaminen im synaptischen Spalt erhöhen. Die Summe dieser Erkenntnisse führte zur Entwicklung der „Monoaminmangelhypothese“ der Depression (Schildkraut, 1995; Hirschfeld, 2000; Delgado, 2000).

Ein weiteres neurobiologisches Konzept postuliert eine Überaktivität und Fehlregulation im Stresshormon-System (Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-System, engl. hypothalamo-pituitary-adrenocortical- oder HPA-System) als mögliche Ursache für die Entstehung und Aufrechterhaltung depressiver Störungen. Beispielsweise zeigten bereits

Untersuchungen in den 50er und 60er Jahren, dass bei depressiven Patienten das Stresshormon Kortisol vermehrt freigesetzt wird (Board *et al.*, 1957; Gibbons, 1964).

## **1.2 Das Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HPA)-System**

### **1.2.1 Allgemeine Einführung: Regulation des Stresshormonsystems unter physiologischen Bedingungen**

Das HPA-System besteht aus einer Kaskade von Hormonen, die mannigfaltige Wirkungen auf den Organismus haben. Diese reichen von der Kontrolle der Vitalfunktionen bis hin zur Modifikation des Erlebens und Modulation komplexer emotionaler Zustände. So kann sich der Organismus gegen Gefahrensituationen (d. h. Stressoren) wappnen, seien es physische, wie starker Blutverlust oder Infektionen, oder psychische, wie eine akute Bedrohung durch Feinde oder chronischer Stress.

Corticotropin-releasing Hormon (CRH) ist das Leithormon dieser Kaskade. Es wird im Gehirn hauptsächlich im Nucleus paraventricularis (PVN) des Hypothalamus synthetisiert und über die Eminentia mediana in den hypophysären Portalkreislauf freigesetzt. In Synergismus mit dem ebenfalls hypothalamischen peptidergen Neurohormon Vasopressin (AVP) bewirkt CRH am Hypophysenvorderlappen die Freisetzung des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) in den Blutkreislauf. Letzteres stimuliert die Freisetzung von Glukokortikoidhormonen aus der Nebennierenrinde.

Glukokortikoide ihrerseits üben in einer negativen Rückkopplung einen hemmenden Einfluss auf die Stressachse auf der Ebene der Hypophyse, des Hypothalamus und des Hippocampus aus und kontrollieren auf diese Weise die Aktivität des HPA-Systems (zur Übersicht: de Kloet *et al.*, 1987), siehe Abbildung 1.1.

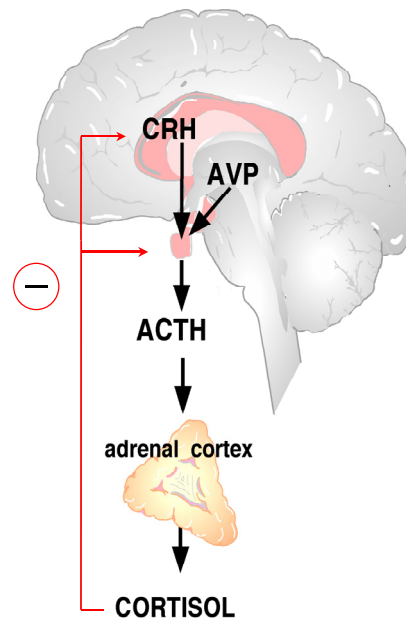


Abbildung 1.1 Vereinfachte Darstellung der Stresshormonkaskade. CRH bewirkt gemeinsam mit AVP am Hypophysenvorderlappen die Freisetzung von ACTH, welches die Sekretion von Glukokortikoiden (z. B. Kortisol) aus der Nebennierenrinde (adrenal cortex) stimuliert. Glukokortikoide wiederum hemmen in einer negativen Feedback-Schleife die übergeordneten Hormone (hier schematisch durch den roten Pfeil angedeutet).

Zahlreiche klinische Befunde stützen die Hypothese, dass eine Veränderung des HPA-Systems ein wichtiger pathogenetischer Faktor für die Entstehung und Aufrechterhaltung affektiver Störungen sein könnte.

### 1.2.2 Das Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-System und Depression

Einige Befunde, die für eine Störung im HPA-System bei Depression sprechen, sind im folgenden kurz zusammengefasst (zur Übersicht: Holsboer & Barden, 1996; Holsboer, 2000).

Erste Daten, die auf eine Überaktivität des Stresshormon-Systems bei Depression hinweisen, wurden bereits in den 50er und 60er Jahren publiziert (Board *et al.*, 1957; Gibbons, 1964).

Neuere Hormonmessungen *in vivo* im Vergleich zu Gesunden zeigten, dass circa 40% der depressiven Patienten erhöhte Kortisolwerte im Serum bei erhaltenem circadianem Rhythmus haben (Rubin *et al.*, 1987). Die Ausscheidung von freiem Kortisol im Urin ist ebenfalls gesteigert (Carroll *et al.*, 1976). Auch die Konzentration von CRH ist im Liquor cerebrospinalis depressiver Patienten erhöht (Nemeroff *et al.*, 1984).

**Post mortem** Untersuchungen von Gehirnen ehemals depressiver Patienten zeigten eine erhöhte Anzahl von CRH-exprimierenden Neuronen im PVN (Raadsheer *et al.*, 1994; Raadsheer *et al.*, 1995). Indirekte Hinweise auf eine übermäßige Freisetzung von CRH finden



sich auch bei Suizidopfern (Nemeroff *et al.*, 1988). Neurone, die AVP und Oxytocin (OXT) (diese Peptide sind ebenfalls an der Stresshormonregulation beteiligt) exprimieren, sind im PVN depressiver Patienten ebenfalls erhöht (Purba *et al.*, 1996).

Neben diesen Messungen wurden auch **Funktionstests**, die dem dynamischen Charakter des HPA-Systems besser gerecht werden, in die psychiatrische Forschung übernommen. Beim Dexamethason-Suppressions-Test (DST) beispielsweise, der ursprünglich für die Differentialdiagnose des Cushing-Syndroms entwickelt wurde, erhält der Patient spät abends (23 Uhr) eine definierte Menge Dexamethason. Am nächsten Morgen wird die Plasma-Kortisolkonzentration bestimmt, die sich im Normalfall durch den negativen Feedback nahezu komplett supprimieren lassen sollte. Depressive Patienten zeigten nun bei diesem Test eine geringere Supprimierbarkeit von Kortisol (sog. „Dexamethason-non-Suppression“), die darüber hinaus auch viel kürzer als bei Gesunden anhält (Carroll, 1982).

Überdies wurden auch Stimulationsversuche durch CRH-Gabe durchgeführt. Hierbei fand sich eine abgeschwächte Freisetzung von ACTH -aber nicht von Kortisol- bei depressiven Patienten (Holsboer *et al.*, 1986; Gold *et al.*, 1986).

Überraschende Ergebnisse lieferte der kombinierte Dexamethason/CRH-Test (Dex/CRH-Test). Hierbei erhält der Patient um 23 Uhr des Vortages 1,5 mg Dexamethason oral. Am Testtag wird um 15 Uhr 100 µg humanes CRH intravenös appliziert. Hierauf werden die ACTH- und Kortisolfreisetzung über einen mehrstündigen Zeitraum bestimmt. Bei Gesunden lassen sich ACTH und Kortisol nach Dexamethason-Suppression kaum stimulieren. Depressive Patienten zeigten hingegen einen viel höheren Anstieg der beiden Hormone. Dieser Effekt scheint paradox, da depressive Patienten schon *a priori* über erhöhte Kortisolspiegel verfügen und die Feedback-Inhibition somit noch ausgeprägter sein sollte. Die Mechanismen, die dieser Beobachtung zugrunde liegen, sind noch nicht vollständig geklärt. Man nimmt an, dass die Störung von zentralen Feedback-Mechanismen und eine Überfunktion im hypothalamischen CRH/AVP-System zum Durchbrechen der Suppression führen (Heuser *et al.*, 1994).

Die beobachtete Überaktivität des HPA-Systems normalisiert sich unter antidepressiver Therapie schon kurz vor Eintritt der klinischen Besserung (zur Übersicht: Holsboer & Barden, 1996). Darüber hinaus erlaubt der Dex/CRH-Test sogar eine Aussage über die mittelfristige Prognose klinisch remittierter depressiver Patienten: Höhere Kortisolwerte in diesem Test gehen trotz psychopathologischer Remission mit einem erhöhten Rezidivrisiko binnen sechs Monaten einher (Zobel *et al.*, 1999).

Doch auch vor diesem Hintergrund stellt sich weiterhin die Frage, ob es sich bei der Störung der Stresshormonachse um Begleitphänomene der Depression oder um kausale, pathogenetische Mechanismen handelt.

Einen besonderen Hinweis auf eine pathogenetisch bedeutsame Rolle des HPA-Systems liefert die *Münchener Vulnerabilitätsstudie*. Da bekannt ist, dass affektive Erkrankungen in der Familienanamnese einen bedeutenden Risikofaktor für die Entwicklung einer Depression darstellen, wurden in dieser Studie Verwandte depressiver Patienten, die selbst nie erkrankt waren, mit dem Dex/CRH-Test hinsichtlich ihres neuroendokrinen Profils charakterisiert: Hierbei wurden bei diesen Hochrisiko-Familienangehörigen Kortisol-Spiegel gemessen, die zwischen denen von Erkrankten und Gesunden lagen (Holsboer *et al.*, 1995). Diese Resultate blieben auch nach vier Jahren konstant reproduzierbar, so dass man von einem stabilem Marker genetisch verankerter Vulnerabilität sprechen kann (Modell *et al.*, 1998; Lauer *et al.*, 1998).

In Synopse all dieser Beobachtungen stellt das gestörte Stresshormon-System einen viel versprechenden Angriffspunkt für die Entwicklung neuartiger antidepressiver Substanzen dar. Erste Studien mit einem selektiven Antagonisten gegen den CRH-Rezeptor-Typ1 lieferten erfolgversprechende Ergebnisse (Zobel *et al.*, 2000). Es handelt sich hierbei um Psychopharmaka, die auf einem hypothesenbasierten Ansatz entwickelt wurden: ein Novum in der Psychopharmakotherapie.

Für die Entwicklung weiterer Arzneimittel ist eine möglichst detaillierte Kenntnis der zentralen Regulationsmechanismen des HPA-Systems notwendig. In folgendem Abschnitt soll der derzeitige Erkenntnisstand kurz dargestellt werden.

### 1.2.3 Zentrale Regulationsmechanismen des HPA-Systems

Die hier dargestellten Erkenntnisse über zentrale Regulationsmechanismen der HPA-Achse entstammen größtenteils präklinischen tierexperimentellen Studien. Die Mehrzahl der Arbeiten beschäftigte sich mit der Ratte als Versuchstier, so dass umfangreiches Wissen über die Stresshormon-Regulation bei dieser Spezies besteht.

Die Maus rückte erst in jüngerer Zeit ins Zentrum des Interesses. Dies rührt nicht zuletzt daher, dass neue molekularbiologische Techniken die Generierung so genannter „transgener Mäuse“, die distinkte genetische Modifikationen aufweisen, ermöglichen; mit Hilfe dieser Tiere gelingt eine genauere, funktionelle Betrachtung der an der Stresshormonregulation beteiligten Regelkreise.

Ein Teil der im Folgenden zitierten Arbeiten über die an der zentralen HPA-Regulation beteiligten Hormone und Hormonrezeptoren entstammt Studien an solchen „transgenen Mäusen“.

### 1.2.3.1 Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH)

1981 gelang *Vale et al.* die Isolierung des Corticotropin-Releasing-Hormons (CRH), eines aus 41 Aminosäuren bestehenden Peptids (*Vale et al.*, 1981). Im Gehirn ist es am stärksten in parvozellulären Neuronen des PVN im Hypothalamus exprimiert, die zur Eminentia mediana projizieren. Hier wird CRH in den hypophysären Portalkreislauf freigesetzt, um am Hypophysenvorderlappen die ACTH-Freisetzung aus kortikotropen Zellen zu stimulieren. Darüber hinaus ist CRH im Gehirn fast ubiquitär exprimiert (Substantia nigra, Nucleus raphe, Locus coeruleus, periaquäduktales Höhlengrau, Cerebellum der Ratte, nicht aber der Maus, [detailliertere Informationen siehe Referenzen]). Es findet sich vor allem auch in jenen Hirnarealen, die für Kognition und Emotion von Bedeutung sind (präfrontaler Kortex, Amygdala (Nucleus centralis), Hippocampus) (*Swanson et al.*, 1983; *Keegan et al.*, 1994).

Neben seiner endokrinen Funktion als „Aktivator“ des HPA-Systems fungiert CRH auch als Neurotransmitter (zur Übersicht: *Dunn & Berridge*, 1990). Erkenntnisse hierüber stammen größtenteils aus Studien, in denen Versuchstieren CRH intrazerebroventriculär (icv.) oder in bestimmte Hirnareale appliziert wurde. CRH bewirkt Veränderungen der Lokomotorik (*Sutton et al.*, 1982), führt zu einer Verminderung der Nahrungsaufnahme (*Morley & Levine*, 1982; *Heinrichs & Richard*, 1999), fördert das stressassoziierte Pflegeverhalten (*Britton et al.*, 1982) und dämpft das Sexualverhalten (*Sirinathsinghji*, 1987). Neben diesen Anzeichen für eine verstärkte Aktivierung der Tiere durch CRH zeigte sich vor allem auch ein gesteigertes Angstverhalten in etlichen Verhaltenstests, die den Parameter „Ängstlichkeit“ abgreifen (z. B. Untersuchung des „acoustic startle reflex“ (*Swerdlow et al.*, 1986), Tests des Sozialverhaltens (*Dunn & File*, 1987)).

### 1.2.3.2 Corticotropin-Releasing-Hormon-Rezeptoren (CRHR)

Die Wirkung von CRH wird durch Corticotropin-Releasing-Hormon-Rezeptoren vermittelt. Bisher konnten zwei Rezeptor-Subtypen isoliert werden: Corticotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor Typ 1 und Typ 2 (CRHR1/CRHR2). Beide Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembran-Domänen (*Vita et al.*, 1993; *Chang et al.*, 1993; *Perrin et al.*, 1993; *Chen et al.*, 1993; *Kishimoto et al.*, 1995; zur Übersicht: *De Souza*, 1995).

Neben seiner Expression an der Hypophyse ist CRHR1 im Gehirn beinahe ubiquitär, sowohl in subkortikalen Regionen (v. a. Amygdala und Hypothalamus), als auch im Neokortex und im Kleinhirn, nachzuweisen. CRHR2 hingegen findet sich vor allem in peripheren Geweben (Herz, Gefäße) und in einigen subkortikalen Hirnregionen (Septum, Hippocampus, Amygdala, Hypothalamus, Plexus choroideus) (Chalmers *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2000; Van Pett *et al.*, 2000).

Studien mit Antisense-Deoxynukleotiden (diese Technik interferiert gezielt mit der Proteinsynthese von Genprodukten durch Beeinträchtigung deren Translation (Altuvia & Wagner, 2000)) und CRHR1-Antagonisten zeigten, dass CRHR1 bei Versuchstieren für die Vermittlung angstassozierten Verhaltens verantwortlich ist (Liebsch *et al.*, 1995; Skutella *et al.*, 1998; Griebel *et al.*, 1998; Okuyama *et al.*, 1999).

Die Beobachtungen, dass CRHR1 eine Schlüsselrolle hinsichtlich der Stressantwort und des angstassozierten Verhaltens hat, wurden durch die Entwicklung und Untersuchung von *Crhr1*<sup>-/-</sup>-Mausmutanten weiter untermauert. Diese Nullmutanten, denen durch eine gezielte genetische Manipulation im gesamten Organismus ein funktionstüchtiger CRHR1-Rezeptor fehlt, zeigten eine gestörte hormonelle Stressantwort und eine reduzierte Ängstlichkeit (Timpl *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998).

Die Datenlage hinsichtlich der Funktionen von CRHR2 ist weniger einheitlich. In einigen (aber nicht allen) Arbeiten finden sich indirekte Hinweise auf CRHR2-vermittelte anxiolytische Effekte, Auswirkungen auf die Nahrungsaufnahme und den Blutdruck (Bale *et al.*, 2000; Coste *et al.*, 2000; Kishimoto *et al.*, 2000).

### 1.2.3.3 Vasopressin (AVP)

Vasopressin, auch AVP, wird hauptsächlich im magnozellulareren Anteil des PVN und im Nucleus supraopticus synthetisiert. Über den Hypophysenhinterlappen freigesetzt, ist es in der Peripherie über renale Vasopressin II-Rezeptoren an der Regulation des Wasserhaushalts beteiligt. Darüber hinaus ist AVP im Gehirn auch in parvozellulären Neuronen des PVN exprimiert (teils zusammen mit CRH, teils allein) und gelangt über die Lamina externa der Eminentia mediana in den hypophysären Portalkreislauf, um an der Hypophyse die ACTH-Freisetzung zu stimulieren (zur Übersicht: Antoni, 1993). Hierbei existiert ein überadditiver Synergismus zwischen AVP und CRH (Gillies *et al.*, 1982; Rivier & Vale, 1983).

AVP ist weiterhin als Neurotransmitter an verschiedenen Hirnleistungen, wie Lernen, Gedächtnis (Engelmann *et al.*, 1996) und Emotionalität (Stribley & Carter, 1999) beteiligt (zur Übersicht: Landgraf *et al.*, 1998).

#### **1.2.3.4 Kortikosteroidrezeptoren: Glukokortikoid- (GR) und Mineralokortikoid- (MR) Rezeptor**

Die Kortikosteroide (Kortisol beim Menschen und Kortikosteron bei Ratte und Maus) als Endhormone der Stresshormonkaskade üben ihrerseits grundsätzlich zwei verschiedene Feedback-Effekte auf das HPA-System aus: sie besitzen erstens eine „proaktive“ Wirkung im Sinne einer Aufrechterhaltung der basalen HPA-Aktivität und zweitens eine „reaktive“ im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus, um eine Aktivierung der HPA-Achse zu beenden (zur Übersicht: De Kloet *et al.*, 1998).

Für die Vermittlung dieser Mechanismen konnten zwei Kortikosteroidrezeptoren identifiziert werden: der Glukokortikoid- (GR) und der Mineralokortikoid- (MR) Rezeptor.

GR finden sich über das gesamte Gehirn verteilt (vor allem in CRH-exprimierenden Neuronen des PVN) und am Hypophysenvorderlappen, MR hauptsächlich im Hippocampus und ferner im Hypothalamus, wo sie zur Regulation des Salzhaushaltes beitragen (Reul & De Kloet, 1985; De Kloet & Reul, 1987).

Kortikosteron besitzt eine zehnfach höhere Affinität zu MR als zu GR, so dass unter geringen Stresshormonkonzentrationen hauptsächlich MR, unter hohen allerdings sowohl MR als auch GR besetzt sind.

Dies führte zu der Arbeitshypothese, dass der tonische, „proaktive“ Effekt durch hippocampale MR (von hier existieren Projektionen zum PVN via BNST) vermittelt wird, während die zusätzliche Besetzung der GR bei starker HPA-Aktivierung für den negativen Feedback-Mechanismus, den „reaktiven“ Effekt verantwortlich ist (De Kloet *et al.*, 1998; Joels, 2001).

Das Gleichgewicht zwischen den Wirkungen, die die einzelnen Rezeptoren vermitteln, setzt einen Schwellenwert: Es hat sowohl Auswirkungen auf die Aufrechterhaltung der basalen HPA-Aktivität, als auch auf die Beendigung der Stressreaktion (De Kloet, 1991; De Kloet *et al.*, 1997).

### **1.3 Die Funktion von CRHR1: Befunde von Mausmutanten mit einer hirnarealspezifischen Inaktivierung des Rezeptors**

1998 wurden unabhängig voneinander zwei Mauslinien mit einem „konventionellen“ Knockout für CRHR1, das heißt einer Inaktivierung von CRHR1 im gesamten Organismus, entwickelt, um die Bedeutung dieses Rezeptors für angstassoziiertes Verhalten einerseits und die HPA-Regulation andererseits zu untersuchen (Timpl *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998). Die Nullmutanten zeigten auf endokrinologischer Ebene einen ausgeprägten

Glukokortikoidmangel und eine schwer beeinträchtigte Aktivierbarkeit der HPA-Achse durch Stress. In Verhaltenstests ließ sich ein deutlich reduziertes angstassoziiertes Verhalten nachweisen.

Mittels dieses „konventionellen“ Knockouts konnte allerdings nicht geklärt werden, in wie weit die Verhaltenseffekte durch den endokrinen Phänotyp mitbedingt beziehungsweise durch diesen überlagert sind. Um nun neuronale CRH/CRHR1-Signalwege, die für die Verhaltenseffekte verantwortlich sind, von denen, die die endokrine HPA-Regulation vermitteln, zu trennen, bietet es sich an, „konditionale“ Mutanten, das sind Mutanten mit hirnregionspezifischem CRHR1-Knockout, zu entwickeln.

Hierfür kann das sogenannte „Cre/loxP-System“ verwendet werden (Kühn *et al.*, 1995) (zur Übersicht: Nagy, 2000; Van Pett *et al.*, 2000):

Das Enzym Cre-Recombinase des Bakteriophagen P1 katalysiert die Rekombination von DNA zwischen zwei spezifischen Erkennungsstellen, den „loxP-sites“. Hierbei wird der DNA-Abschnitt, der zwischen diesen „loxP-sites“ liegt, herausgeschnitten und zerstört.

Für die Entwicklung eines „konditionalen“, regionspezifischen Knockouts ist die Kreuzung zweier Mauslinien erforderlich: Bei einer Mauslinie ist ein funktionell wichtiger Teil des Zielgens durch zwei loxP-Abschnitte flankiert („floxed“). Die andere Linie trägt ein Cre-Transgen unter der Kontrolle eines gewebsspezifischen Promotors, der dafür sorgt, dass das Enzym Cre-Recombinase nur in bestimmten Geweben exprimiert wird. Werden beide Mauslinien gekreuzt, zerstört die Cre-Recombinase bei den Nachkommen das Zielgen folglich nur in Geweben, die durch den dem Cre-Transgen vorgeschalteten Promotor gewählt werden können, siehe Abbildung 1.2.

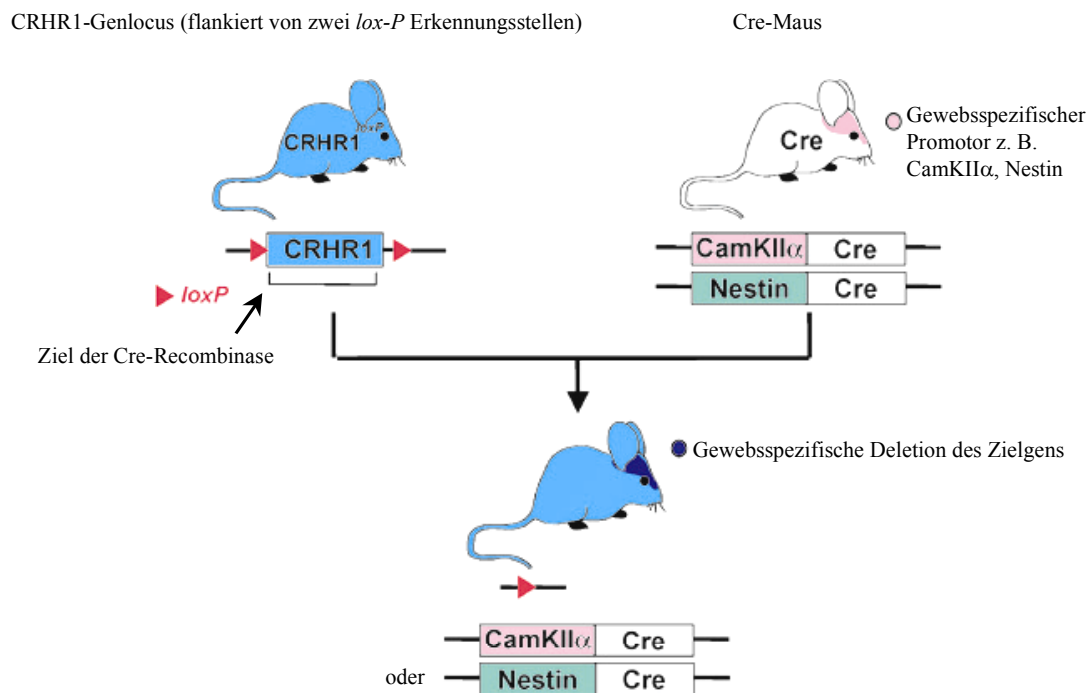


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des Cre/*loxP*-Systems. Eine Mauslinie, deren CRHR1-Genlocus von zwei *loxP* Erkennungsstellen flankiert ist, wird mit einer Mauslinie, die das Gen für die Cre-Recombinase unter der Kontrolle eines gewebsspezifischen Promotors trägt, gekreuzt. Bei den Nachkommen führt dies zur gewebsspezifischen Deletion des CRHR1-Gens.

Als gewebsspezifischer Promotor steht beispielsweise die Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase II $\alpha$  (*CaMKII $\alpha$* , spezifisch für das limbische System und frontale Kortexanteile) zur Verfügung. Erst kürzlich wurde eine solche *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>CaMKII $\alpha$ Cre*-Mauslinie erstcharakterisiert (Müller *et al.*, 2003).

Ein Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse konditionaler Mutanten: Es werden *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mausmutanten untersucht, bei denen das Cre-Gen unter die Kontrolle des Promotors und des im zweiten Intron befindlichen, für das Nervensystem spezifischen Enhancers des Nestin-Gens gestellt wurde (Tronche *et al.*, 1999). Nestin ist ein Intermediärfilament, welches bei der Maus in der Embryonalentwicklung ab dem 9. Tag in neuronalen, glialen und muskulären Vorläuferzellen exprimiert wird; der Enhancer im zweiten Intron des Nestin-Gens ist allerdings nur in den Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) aktiv (Zimmerman *et al.*, 1994). Diesen *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten fehlt CRHR1 im gesamten ZNS, siehe Abbildung 1.3. In peripheren Geweben (vor allem auch an der Hypophyse) hingegen ist CRHR1 noch vorhanden.

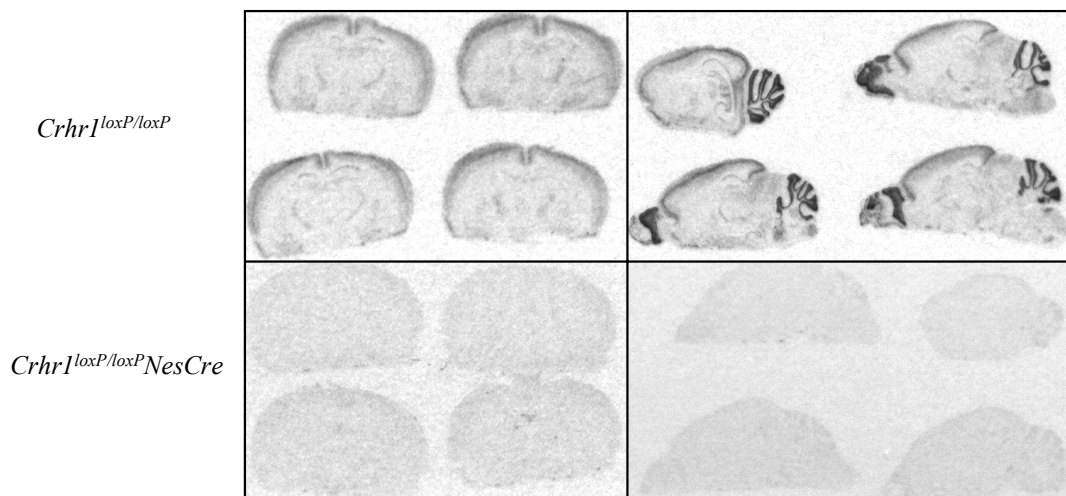


Abbildung 1.3 *In situ*-Hybridisierung der CRHR1-mRNA bei  $Crhr1^{loxP/loxP}$ -Wildtypen und  $Crhr1^{loxP/loxP}NesCre$ -Mutanten. Im Gegensatz zu  $Crhr1^{loxP/loxP}$ -Wildtypen wird bei  $Crhr1^{loxP/loxP}NesCre$ -Mutanten CRHR1 im gesamten ZNS nicht exprimiert.

#### 1.4 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit verfolgt nun zwei Ziele:

Die Datenlage zur Physiologie der HPA-Achse bei „gewöhnlichen“ Wildtyp-Mäusen stellt sich trotz der wachsenden Bedeutung „transgener“ Mäuse noch immer recht karg dar. Es existiert zwar eine große Anzahl von Studien an Ratten; aufgrund bestehender Interspezies-Unterschiede ist es aber zweifelhaft, ob Befunde an Ratten ohne weiteres auf Mäuse übertragen werden können. Zur Einbettung der an transgenen Mäusen erzielten Erkenntnisse in einen größeren Bezugsrahmen sind folglich Daten über die HPA-Regulation bei Wildtyp-Mäusen unabdingbar. Vor diesem Hintergrund soll zunächst mittels *in situ*-Hybridisierung von CRH-, CRHR1, CRHR2, AVP- und MR-mRNA mit anschließender semiquantitativer Expressionsanalyse bei genetisch nicht modifizierten C57/B16-Mäusen die Reaktion des HPA-Systems auf Stress im Zeitverlauf systematisch untersucht werden, um die Literatur in diesem Punkt zu ergänzen.

Zweitens soll ebenfalls mittels *in situ*-Hybridisierung analysiert werden, welchen Einfluss das Fehlen von CRHR1 im ZNS bei oben beschriebenen konditionalen  $Crhr1^{loxP/loxP}NesCre$ -Mutanten auf die Regulation HPA-assoziiierter Gene hat, und welche Hinweise auf Ursachen der gestörten Regulationsmechanismen hierbei zu finden sind. Hierdurch soll die Funktion von CRHR1 im ZNS weiter aufgeklärt werden.



---

Beide experimentellen Ansätze zielen darauf ab, eine detailliertere Einsicht in die Mechanismen der zentralen Regulation des HPA-Systems zu erlangen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tiere

Für den ersten Teil der Arbeit, die Untersuchung der zentralen Stresshormonregulation bei Wildtyp-Mäusen im Zeitverlauf, wurden C57/Bl6-Mäuse verwendet.

Die Untersuchung der Rolle von CRHR1 im ZNS erfolgte an konditionalen CRHR1-knockout Mäusen ( $Crhr1^{loxP/loxP}NesCre$ ) und entsprechenden Kontrolltieren ( $Crhr1^{loxP/loxP}$ ). Mutanten und Kontrolltiere entstammten als Geschwister derselben Zucht, so dass beide Gruppen denselben genetischen Hintergrund aufwiesen.

Für beide Experimente wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet, die zum Zeitpunkt der Versuche zwischen 8 und 12 Wochen alt waren und zwischen 25 und 35g wogen.

Alle Tiere wurden zu viert bis sechst in Käfigen im Tierhaus des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie, München, unter Standardbedingungen gehalten: 12 Stunden Licht (06-18h)/ 12 Stunden Dunkelheit (18-06h), Temperatur  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 40-60% Luftfeuchtigkeit, standardisiertes Futter und Wasser *ad libitum*.

### 2.2 Aufbau der Stress-Experimente

Alle Tiere wurden 14 Tage vor den Experimenten in ein abgeschirmtes Verhaltenslabor überführt und dort einzeln gehalten.

#### 2.2.1 Aufbau des Experiments mit C57/Bl6-Mäusen

Eine Gruppe (n=6) der insgesamt 25 Tiere wurden unter Basalbedingungen am Morgen (9.00h) mit Halothan narkotisiert und durch schnelles Dekapitieren getötet. Anschließend wurden für das Stress-Paradigma die verbleibenden Tiere für dreißig Minuten in ein 50ml-Falcon-Gefäß mit entferntem Boden so positioniert, dass sie sich nicht bewegen konnten (hierfür soll der Klarheit halber im Weiteren der in der Literatur verbreitete englische Terminus „restraint stress“ verwendet werden). Die Tiere wurden in drei Gruppen (je n=6-7) zwei, vier und vierundzwanzig Stunden nach dieser Prozedur wie oben beschrieben getötet.

#### 2.2.2 Aufbau des Experiments mit $Crhr1^{loxP/loxP}NesCre$ -Mutanten

Für dieses Experiment wurden insgesamt zehn  $Crhr1^{loxP/loxP}$ -Kontrolltiere und acht  $Crhr1^{loxP/loxP}NesCre$ -Mutanten verwendet. Aus beiden Gruppen wurde jeweils die Hälfte der

Tiere (*Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>*: n=5; *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*: n=4) unter Basalbedingungen oder nach Stress getötet.

Das Stressexperiment und das Töten der Tiere erfolgte ebenfalls am Morgen (9.00h) wie oben beschrieben: Hier wurden die Stress-exponierten Tiere vier Stunden nach „restraint stress“ gemeinsam mit den nicht gestressten mit Halothan narkotisiert und dekapitiert.

### 2.3 Gehirnpriparation und Gefrierschneiden

Nach dem Töten der Tiere wurden die Gehirne sofort präpariert und auf Trockeneis gefroren. Danach lagerten sie bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Mittels eines Kryostaten wurden von jedem Gehirn parallele koronare Schnitte in einer Dicke von  $18\ \mu\text{m}$  gefertigt (von Bregma 1.70 mm bis Bregma -2.70 mm (The Mouse Brain Atlas, 2<sup>nd</sup> Edition, Academic Press)), um den Abschnitt zwischen PVN und Hippocampus einzuschließen. Die Schnitte wurden auf beschichtete Objektträger (SuperFrost Plus, Menzel Gläser, Braunschweig) gezogen, wobei jeder fünfte Schnitt auf denselben Objektträger positioniert wurde. Pro Tier resultierten sieben bis acht parallele Serien à fünf Objektträgern mit je sieben Schnitten.

Die Schnitte wurden, nachdem sie getrocknet waren, bei  $-20\ ^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.4 In situ-Hybridisierung

#### 2.4.1 In situ-Hybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotidproben

Eine *in situ*-Hybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotidproben kam beim Nachweis der AVP mRNA zu Anwendung.

Es wurde folgende Oligonukleotid-DNA-Probe (48 bp) verwendet: 5'-GCA GAA GGC CCC GGC CGG CCC GTC CAG CTG CGT GGC GTT GCT CCG GTC-3'; diese ist gegen die letzten 16 Aminosäuren von AVP gerichtet (Ivell & Richter, 1984). Die Spezifität dieses Oligonukleotids wurde bereits gezeigt (Villar *et al.*, 1994), und es fand bereits in weiteren Studien Verwendung (Müller *et al.*, 2000).

##### 2.4.1.1 Radioaktive Markierung der Oligosonde

Die Sonde wurde mittels einer terminalen Desoxynukleotidyltransferase (Terminale Transferase, Roche, Mannheim) mit  $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]$  deoxy-ATP (NEN Life Sciences, Boston, MA, USA) radioaktiv markiert.

Hierfür wurde folgender Ansatz pipettiert:

Ampuwa	4 $\mu\text{l}$
--------	-----------------

Oligonukleotidprobe (40 ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
[ $\alpha$ - <sup>35</sup> S] deoxy-ATP	6 $\mu$ l
Kaliumkakodylat/Tris-Puffer pH 6,6	4 $\mu$ l
CoCl <sub>2</sub> -Lösung (5 mM)	2 $\mu$ l

Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren wurde

Terminale Transferase (50 U/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
---------------------------------------	-----------

hinzugefügt.

Die Mischung wurde 30 min bei 37°C inkubiert.

Sie wurde auf Eis gebracht und kurz abzentrifugiert. Zur Präzipitation der Probe wurde zupipettiert:

Ampuwa	30 $\mu$ l
tRNA	3,5 $\mu$ l
Ammoniumacetat 7,5 M	165 $\mu$ l
100% Ethanol (-20°C)	700 $\mu$ l

Nach Mischung wurde die Lösung 2 Stunden bei -80°C präzipitiert.

Hierauf wurde 30 min zentrifugiert (14.000 U/min, 4°C) und der Überstand abgegossen. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l 100% Ethanol wurde wiederum 15 min zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das verbleibende Pellet wurde getrocknet.

Nach der Trocknung wurde es durch Zugabe von 50  $\mu$ l Ampuwa rekonstituiert.

Zur Erfolgskontrolle wurde die Probe in einem Szintillationsmesser gemessen. Hierzu wurden 2  $\mu$ l der im Hybridisierungsmix verdünnten Sonde mit 2 ml wasserlöslicher Szintillationsflüssigkeit gemischt. Die Messwerte lagen im Bereich zwischen  $1 \times 10^6$  und  $4 \times 10^6$  cpm / 2  $\mu$ l.

#### 2.4.1.2 Prähybridisierungsbehandlung der Schnitte

Die bei Raumtemperatur aufgetauten Schnitte wurden durch folgende Alkoholreihe gezogen

70% Ethanol	1 min
80% Ethanol	1 min
95% Ethanol	2 min
100% Ethanol	1 min
Chloroform	5 min
100% Ethanol	1 min
95% Ethanol	2 min

Hierauf wurden die Objektträger luftgetrocknet.

#### 2.4.1.3 Hybridisierung

Pro 1 ml Hybridisierungs-Mix (5x SSPE, 5x Denhardts, 0,1% SDS, 1% Rinderserumalbumin (BSA)) wurde

ssDNA (salmon testes DNA, denaturiert)	50 µl
Dithiothreitol 5M	40 µl

zugefügt.

Es wurde soviel radioaktiv markierte Probe zugegeben, dass  $10^6$  cpm im 90 µl Hybridisierungs-Mix pro Objektträger verfügbar waren. Diese 90 µl wurden auf einen Objektträger aufgebracht. Mit einem Deckglas abgedeckt inkubierten die Schnitte bei 45°C für 18-22 Stunden mit der radioaktiv markierten Probe.

#### 2.4.1.4 Waschen der Schnitte

Die Schnitte wurden wie folgt gewaschen:

1x SSC (55°C)	4 x 15 min
1x SSC (55°C, dann auf Raumtemperatur abkühlen lassen)	30 min
Aqua dest.	10 sec
65% Ethanol	1 min
95% Ethanol	1 min

(20x SSC-Puffer: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, 1ml/l Diethylpyrocarbonat (DEPC), 2x autoklaviert)

Hierauf wurden die Schnitte luftgetrocknet.

#### 2.4.2 *In situ*-Hybridisierung mit radioaktiv markierten Ribonukleotidproben

Diese Technik kam beim Nachweis der CRH-, CRHR1-, CRHR2- und der MR-mRNA zur Anwendung. Die Ribonukleotidsonden wurden mittels *In vitro*-Transkription mit einem entsprechend markierten Nukleotid hergestellt. Folgende Sonden fanden Verwendung:

Sonde	Vektor	Insert (bp)	RNA-Polymerase (Antisense/Sense)	Linearisierung (Antisense/Sense)
CRH	pCR II TOPO	356	SP6/T7	XbaI/BamHI
CRHR1	pBluescript II KS	~ 700	T7/T3	XbaI/XhoI
CRHR2	pBluescript II KS	2617	SP6/T7	NotI/Asp718
MR	pGEM4	513	SP6/T7	BamHI/NheI

Die Sonden wurden sequenziert. Ihre Spezifität ist überprüft.

#### 2.4.2.1 Markierung der Ribosonden mit <sup>35</sup>S-thio-rUTP

Die Ribosonden wurden mit <sup>35</sup>S-thio-rUTP (Amersham Biosciences, Freiburg) radioaktiv markiert. In folgendem 30 µl-Ansatz wurde die *In vitro*-Transkription durchgeführt.

linearisierte Matrizen-DNA (1,5 µg)	je nach Konzentration der DNA
10x Transkriptionspuffer	3 µl
NTP-Mix (rATP/rCTP/rGTP je 10 mM)	3 µl
Dithiothreitol (0,5 M)	1 µl
RNasin (40 U/µl)	1 µl
<sup>35</sup> S-thio-rUTP	10 µl
RNA Polymerase (20 U/µl)	2 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 30 µl

Nach kurzem Zentrifugieren wurde die Mischung 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Darauf wurden 2 µl RNase-freie DNase I zur Entfernung der Template-DNA zugefügt (15 min bei 37°C). Nach Zugabe von 200 µl tRNA (0,5 mg/ml) und 250 µl Ammoniumacetat (4 M) wurde die RNA mit 1 ml 100%igem Ethanol für 5 min auf Eis gefällt. Anschließend wurde zentrifugiert (7 min bei 13 000 g); das Pellet wurde in 200 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Es wurden 200 µl Ammoniumacetat (4M) zugegeben; die RNA wurde wiederum mit 1 ml 100%igem Ethanol auf Eis gefällt (5 min). Es wurde wie oben zentrifugiert; das getrocknete Pellet wurde in 0,1 M DTT gelöst. Die markierte RNA wurde mit 100 µl Hybridisierungsmix verdünnt.

In einem Szintillationsmesser wurde anschließend die Aktivität der Sonde bestimmt. Hierzu wurden 2 µl der im Hybridisierungsmix verdünnten Sonde mit 2 ml wasserlöslicher Szintillationsflüssigkeit gemischt. Die Messwerte lagen im Bereich zwischen 1x10<sup>6</sup> und 4x10<sup>6</sup> cpm / 2 µl.

Die Lagerung der Sonden bis zur Verwendung erfolgte bei -80°C.

#### 2.4.2.2 Prä-Hybridisierungsbehandlung der Schnitte und Hybridisierung

Die aufgetauten Objektträger wurden durch folgende Lösungen gezogen:

Eiskaltes (4°C) 4% PFA/PBS	10 min
PBS (DEPC-behandelt)	3 x 5 min
0,1 M Triethanolamin-HCl (pH 8,0; 250 ml), dabei 630 µl Essigsäureanhydrid (Endkonzentration 0,25 M)	10 min

2x SSC	2 x 5 min
60% Ethanol (mit DEPC-H <sub>2</sub> O angesetzt)	1 min
75% Ethanol (mit DEPC-H <sub>2</sub> O angesetzt)	1 min
95% Ethanol (mit DEPC-H <sub>2</sub> O angesetzt)	1 min
100% Ethanol	1 min
Chloroform	1 min
100% Ethanol	1 min
95% Ethanol (mit DEPC-H <sub>2</sub> O angesetzt)	1 min

(10x PBS-Puffer: 120 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 ml/l DEPC, 2x autoklaviert; DEPC = Diethylpyrocarbonat)

Hierauf wurden die Objektträger luftgetrocknet. Es wurden danach 90 µl Hybridisierungsmix, der 100.000 cpm/µl der <sup>35</sup>S-markierte Sonde enthielt, aufgebracht; die Objektträger wurden mit Deckgläschen abgedeckt. In einer am Boden mit Formamid (50%) und SSC (2x) in H<sub>2</sub>O bedeckten Kammer wurden die Objektträger über Nacht bei 65 °C inkubiert.

#### 2.4.2.3 Waschen und Nachbehandlung

Nach Entfernung der Deckgläschen wurden die Objektträger folgendermaßen behandelt:

	Zusatz	
4x SSC		4 x 5 min
NTE (37°C)	20 µg/ml RNase A	20 min
2x SSC	1 mM DTT	2 x 5 min
1x SSC	1 mM DTT	10 min
0,5x SSC	1 mM DTT	10 min
0,1 SSC (65°C)	1 mM DTT	2 x 30 min
0,1 SSC		2 x 10 min
30% Ethanol	300 mM NH <sub>4</sub> Oac	1 min
50% Ethanol	300 mM NH <sub>4</sub> Oac	1 min
70% Ethanol	300 mM NH <sub>4</sub> Oac	1 min
95% Ethanol		1 min
100% Ethanol		2 x 1 min

(NTE-Puffer: 40 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (mit 10 M NaOH auf pH 8,0); DTT = Dithiothreitol)

Die Objektträger wurden anschließend luftgetrocknet.

### 2.4.3 Autoradiographie

Zunächst wurde ein Standard-Röntgenfilm für ca. 24 Stunden auf die Objektträger aufgelegt und entwickelt, um den Erfolg der *in situ*-Hybridisierung kontrollieren zu können.

Die Objektträger wurden nachfolgend in ein 1:1-Gemisch aus Kodak NTB2-Photoemulsion (Kodak, New Haven, CT, USA) und Ampuwa-H<sub>2</sub>O eingetaucht. Die Objektträger wurden lichtgeschützt bei 4°C je nach Signalstärke für einige Tage bis Wochen inkubiert. Der optimale Zeitpunkt für die weitere Bearbeitung wurde anhand der Entwicklung von Testschnitten ermittelt.

Die Entwicklung der Schnitte wurde wie folgt durchgeführt:

Kodak D19 Developer (Kodak, New Haven, CT, USA)	3,5 min
Aqua dest.	30 sec
Kodak Fixierer	6 min
Fließendes Leitungswasser	20 min

Nach Trocknung wurden Rückstände der Photoemulsion auf der Rückseite der Objektträger entfernt.

### 2.4.4 Färben und Eindecken

Um die anatomische Orientierung auf den Präparaten zu vereinfachen, wurden die Schnitte schwach mit Kresylviolett gegengefärbt.

Dabei wurden die Objektträger nach der initialen Färbung mit dem Farbstoff zur Differenzierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe gezogen, bis die erwünschte Farbintensität erreicht war.

Kresylviolett
Reinstwasser
70% Ethanol
96% Ethanol mit wenig Eisessig
96% Ethanol
100% Ethanol
Xylol

Die Objektträger wurden mit ca. 300 µl Eindeckmedium (DPX) beschichtet und eingedeckt.



## **2.5 Auswertung: Messung der optischen Dichte**

Folgende Areale wurden mit einer am Mikroskop angeschlossenen Digitalkamera im Dunkelfeld aufgenommen: Der Nucleus paraventricularis hypothalami (PVN) im Falle der Untersuchung der CRH-, CRHR1- und der AVP-Expression, die Regionen CA (Cornu ammonis) 1, CA3 und DG (Gyrus dentatus) des Hippocampus für die Untersuchung der MR-, der CRHR1 und der CRHR2-Expression und ein Segment des Neocortex auf Höhe des Koronarschnitts, der für die Analyse des Hippocampus verwendet wurde, für die Untersuchung der CRHR1-Expression.

Es wurde auf exakt gleiche optische Bedingungen (Helligkeit, Kontrast, Objektiv, Filter, usw.) innerhalb einer Scanreihe geachtet. Ferner wurde bei der Analyse die Gruppenzugehörigkeit der Tiere durch ein Kodierungssystem gegenüber dem Auswerter verblindet.

Mittels des Programms Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) wurden die Bilder weiterbearbeitet (bei allen Bildern einheitliche Kontrastkorrektur, Invertierung).

Die weiteren Schritte wurden allesamt mit dem Programm ImageJ (frei erhältlich im Internet unter <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) durchgeführt; es handelt sich hierbei um das Java-basierte Pendant zu dem Programm NIH Image.

Zunächst wurde ein einheitlicher Schwellenwert für die Detektion des Signals gesetzt. Anschließend wurden binarisierte Schwarz-Weiß-Bilder generiert.

Schließlich wurde die optische Dichte von repräsentativen Anschnitten des PVN und des Hippocampus gemessen, wobei jeweils kreisförmige Messareale von identischer Größe so gesetzt wurden, dass die Stellen der stärksten Expression erfasst waren. Pro Tier gingen Messungen aus ca. 2-4 repräsentativen Anschnitten der zu untersuchenden Region in die Auswertung ein, siehe Abbildung 2.1.

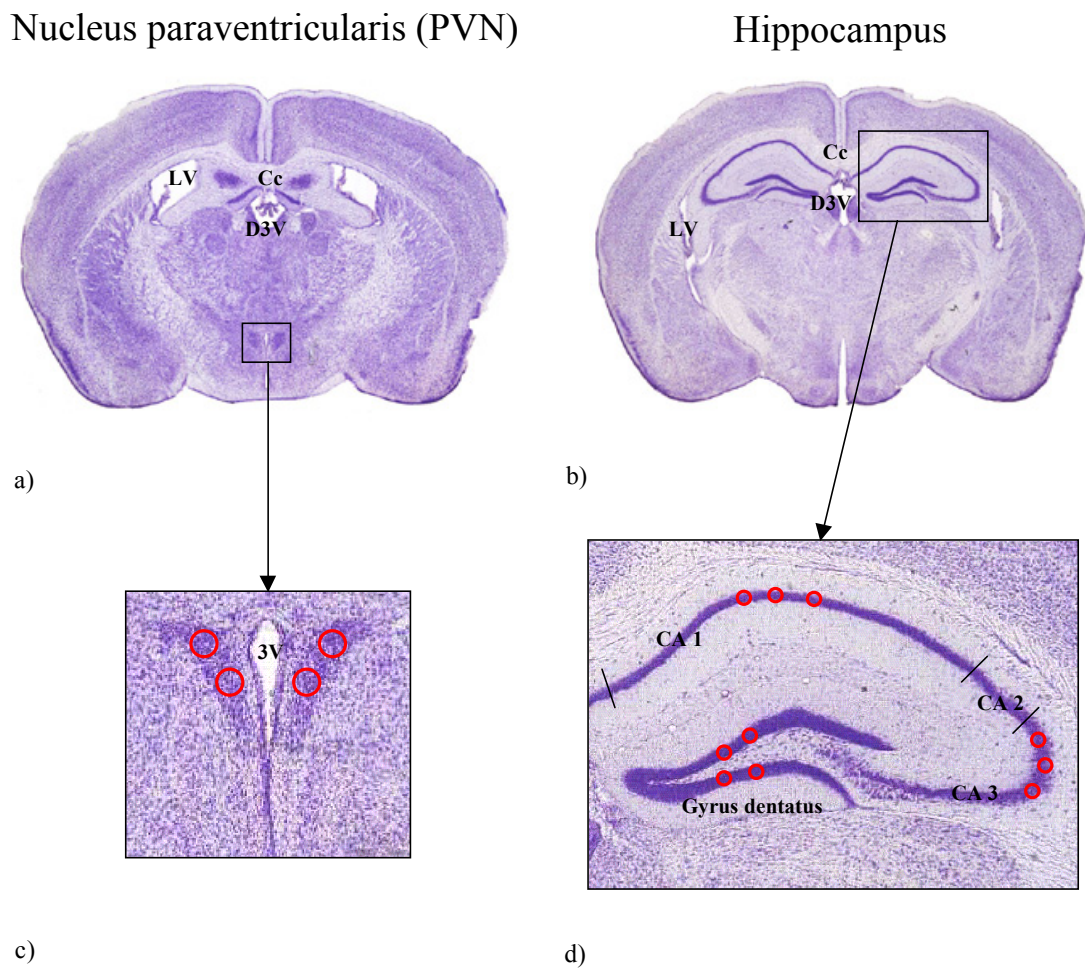


Abbildung 2.1 Ausgewertete Hirnregionen (PVN und Hippocampus) und jeweilige Lokalisation der Messareale. Die Abbildungen c) und d) sind Vergrößerungen der in a) und b) markierten Regionen. Die Lokalisation der Messareale ist schematisch durch rote Kreise dargestellt. Im PVN (a und c) wurde an vier Stellen gemessen. Im Hippocampus wurden in den Regionen CA 1 und CA 3 jeweils drei und im Gyrus dentatus vier Messungen durchgeführt. (Cc = Corpus callosum, LV = Ventriculus lateralis, D3V = dorsaler Ventriculus tertius, 3V = Ventriculus tertius, CA = Cornu ammonis)

Für die Analyse der CRHR1-Expression im Neocortex erfolgten die Messungen der optischen Dichte in den kortikalen Schichten II/III und IV mittels vier ebenfalls kreisförmiger Messareale, um die Stellen der stärksten Expression zu erfassen (Van Pett *et al.*, 2000), siehe Abbildung 2.2.

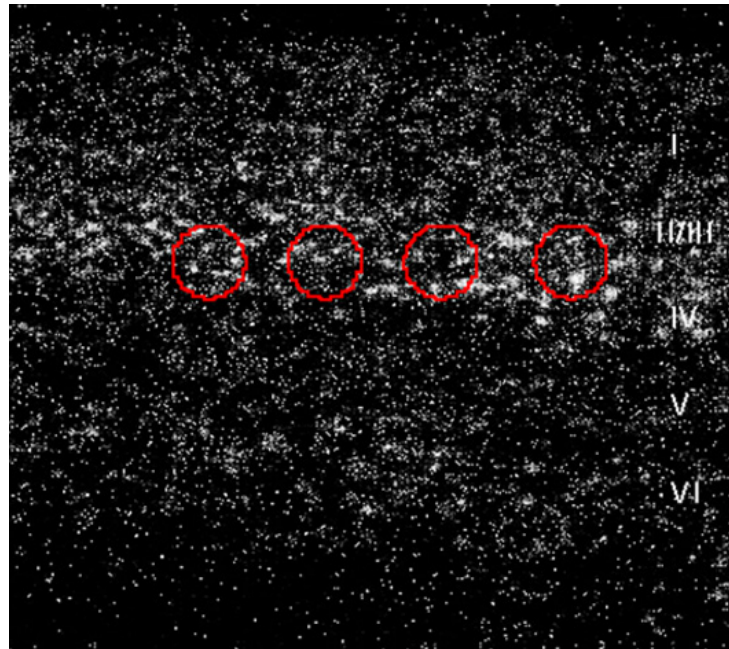


Abbildung 2.2 Dunkelfeldmikroskopische Aufnahme eines repräsentativen Anschnitts des Neocortex nach *in situ*-Hybridisierung von CRHR1 mRNA mit exemplarischer Markierung der vier Messareale in den kortikalen Schichten II/III und IV.

## 2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der semiquantitativen Expressionsanalysen erfolgte getrennt für jede einzelne *in situ*-Hybridisierung mittels des Programms SPSS v11.00 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Es wurde zunächst ein Mittelwert der für jedes Tier ermittelten Messwerte errechnet, um jedem einzelnen Tier einen „Mittleren Grauwert“ zuordnen zu können.

Im Falle der Untersuchung der C57/Bl6-Tiere wurden die Daten mittels univariater Varianzanalyse mit einem Faktor und, wo nötig, anschließenden *post hoc*-Tests unter Bonferroni-Adjustierung des Signifikanzniveaus analysiert.

Für die  $Crhr1^{loxP/loxP}NesCre$ -Mutanten und die  $Crhr1^{loxP/loxP}$ -Kontrolltiere erfolgte eine univariate Varianzanalyse mit zwei Faktoren (Faktor GENOTYP:  $Crhr1^{loxP/loxP}$  vs.  $Crhr1^{loxP/loxP}NesCre$ , Faktor BEHANDLUNG: *basal* vs. *restraint stress*, Interaktion der Faktoren: GENOTYP x BEHANDLUNG). Interaktionen wurden ebenfalls unter Bonferroni-Adjustierung des Signifikanzniveaus lokalisiert.

Ergebnisse von  $p < 0.05$  wurden als signifikant angesehen; als marginal signifikant wurden p-Werte, die knapp über dieser Schwelle lagen, bezeichnet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zeitverlauf der stressabhängigen Genregulation bei C57/Bl6-Mäusen

##### 3.1.1 mRNA-Expression im Nucleus paraventricularis hypothalami (PVN)

###### 3.1.1.1 Expression der CRH mRNA im PVN

Die dunkelfeldmikroskopische Betrachtung ließ deutliche Unterschiede der mRNA-Expression im Zeitverlauf erwarten, siehe Abbildung 3.1.

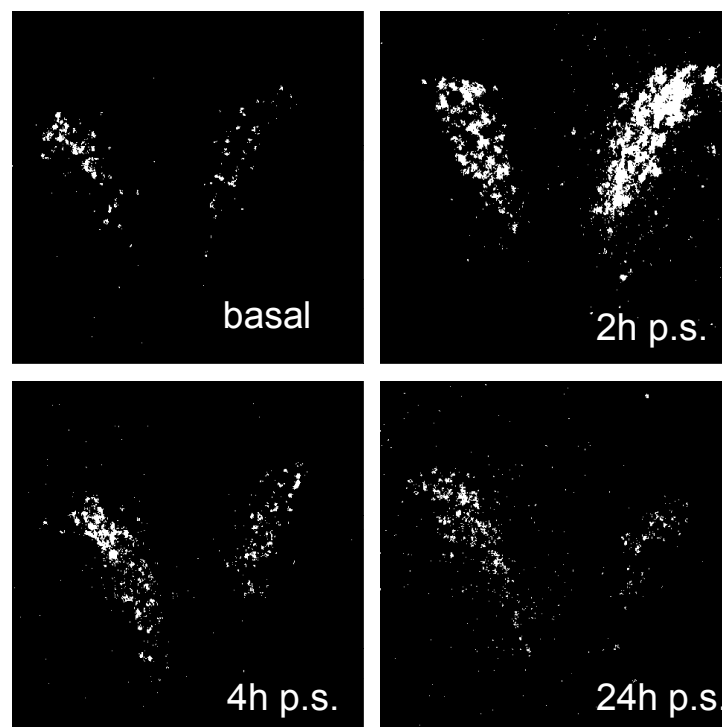


Abbildung 3.1 Dunkelfeldmikroskopische Darstellung des Signals der CRH mRNA *in situ*-Hybridisierung im PVN bei C57/Bl6-Tieren unter Basalbedingungen („basal“) und 2h, 4h und 24h nach Stressexposition (p. s.)

Die statistische Analyse zeigte einen signifikanten Anstieg der CRH mRNA-Expression zwei Stunden nach Stressexposition, dem ein Abfall auf ein basales Niveau nach weiteren zwei Stunden (4h p. s.) folgte, siehe Diagramm 3.1.

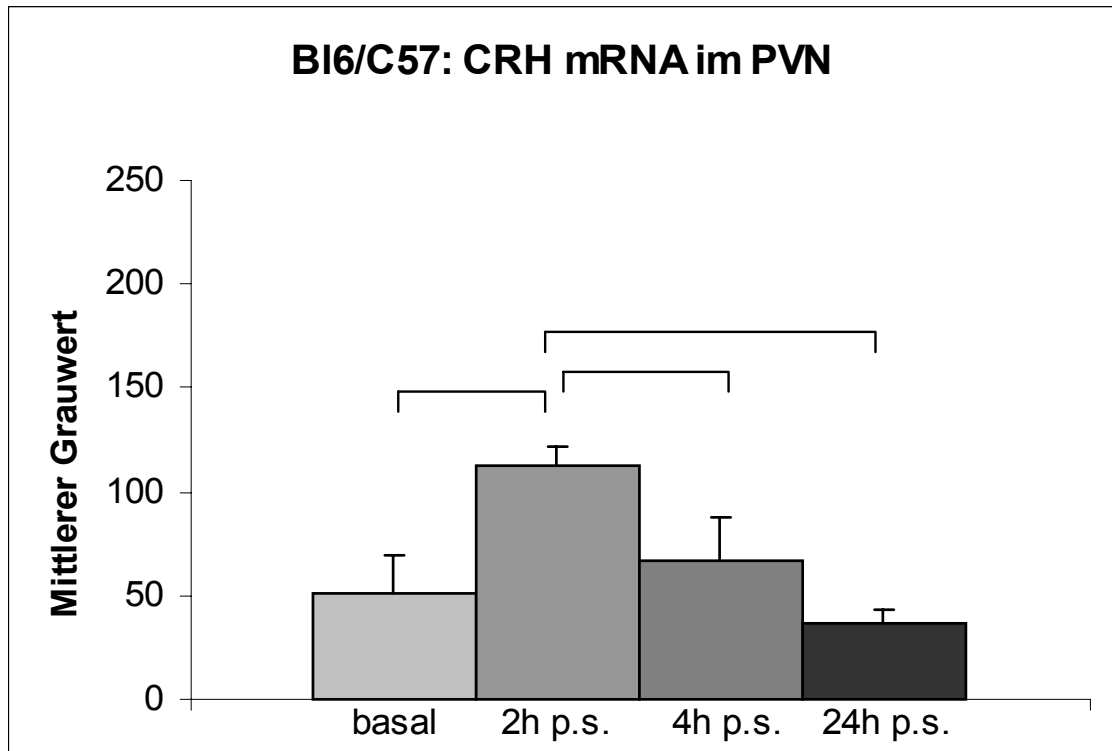


Diagramm 3.1 Expression der CRH mRNA im PVN bei C57/BI6-Tieren unter Basalbedingungen („*basal*“) und 2h, 4h und 24h nach Stressexposition. Dargestellt sind die Werte der durchschnittlichen optischen Dichte (Mittlerer Grauwert)  $\pm$  SEM (n=6-7 pro Gruppe). Die Klammern symbolisieren signifikante Ergebnisse der *post hoc*-Tests ( $p < 0.05$ ).

Im Detail ergab die Analyse: Es bestanden signifikante Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen ( $F=16.167$ ,  $p < 0.001$ ). Die Mehrfachvergleiche zeigten signifikante Unterschiede zwischen folgenden Gruppen: basal vs. 2h post stress (p. s.) ( $p < 0.001$ ), 2h p. s. vs. 4h p. s. ( $p=0.006$ ) und 2h p. s. vs. 24h p. s. ( $p < 0.001$ ).

### 3.1.1.2 Expression der CRHR1 mRNA im PVN

Ein schwaches Signal der *in situ*-Hybridisierung der CRHR1 mRNA konnte unter Basalbedingungen im PVN detektiert werden. Auch nach Stressexposition fand sich zu keinem untersuchten Zeitpunkt eine Veränderung der schwachen mRNA-Expression.

Das erhaltene Signal war für die Durchführung einer aussagekräftigen semiquantitativen Expressionsanalyse zu schwach, so dass das genannte Ergebnis nicht weiter statistisch untermauert werden konnte.

### 3.1.1.3 Expression der AVP mRNA im PVN

Die Dunkelfeldmikroskopie zeigte eine stark unterschiedliche mRNA-Expression bei den einzelnen Tieren unabhängig vom Tötungszeitpunkt.

Die Expression von AVP mRNA war in den experimentellen Gruppen im Zeitverlauf nicht signifikant unterschiedlich; die statistische Analyse konnte keine Unterschiede zwischen den Gruppen belegen ( $F=1.033$ ,  $p=0.400$ ), siehe Diagramm 3.2.

Es ist zu bemerken, dass die einzelnen Gruppen sehr inhomogen zusammengesetzt waren.

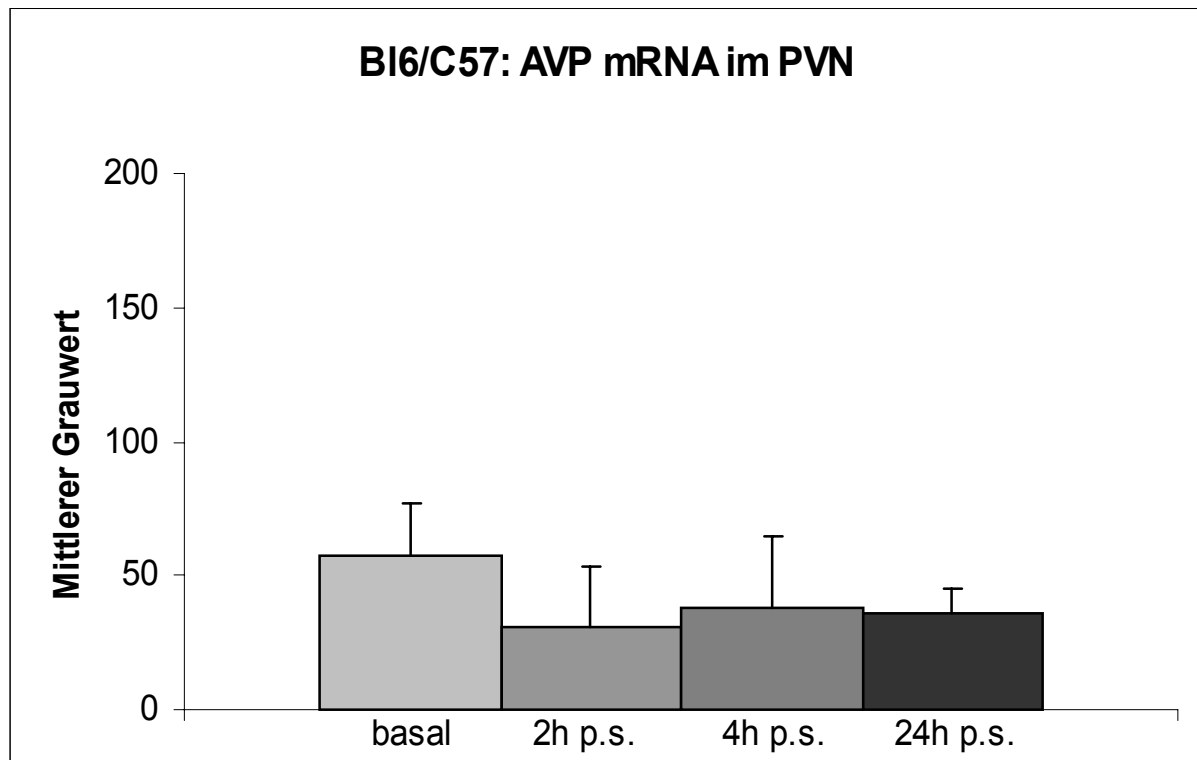


Diagramm 3.2 Expression der AVP mRNA im PVN bei C57/B16-Tieren unter Basalbedingungen („*basal*“) und 2h, 4h und 24h nach Stressexposition. Dargestellt sind die Werte der durchschnittlichen optischen Dichte (Mittlerer Grauwert)  $\pm$  SEM ( $n=6-7$  pro Gruppe).

### 3.1.2 mRNA-Expression im Hippocampus

#### 3.1.2.1 Expression der CRHR1 mRNA im Hippocampus

Dunkelfeldmikroskopisch zeigte sich ein kräftiges Signal der *in situ*-Hybridisierung in den Regionen CA1 und CA3, welches nach Stressexposition an Intensität abnahm. Im DG hingegen war das Signal allgemein sehr schwach, siehe Abbildung 3.2.

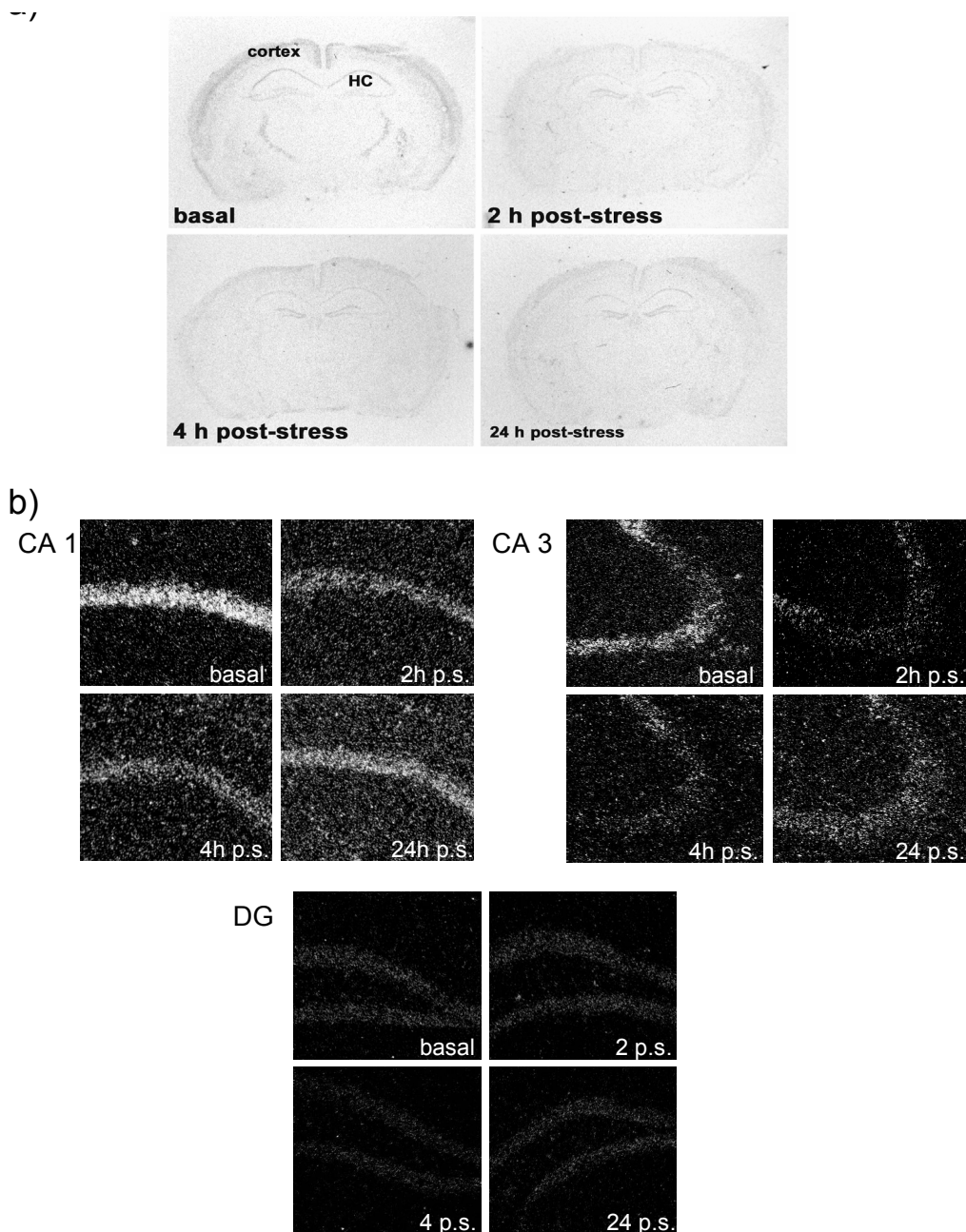


Abbildung 3.2 Mikroskopische Darstellung des Signals der CRHR1 mRNA *in situ*-Hybridisierung im Hippocampus bei C57/Bl6-Tieren unter Basalbedingungen („basal“) und 2h, 4h und 24h nach Stressexposition (p. s.) auf (a) coronaren Gehirnschnitten im Hellfeld und (b) getrennt nach den hippocampalen Arealen CA1, CA3 und DG im Dunkelfeld

Die statistische Analyse zeigte einen signifikanten Abfall der CRHR1-Expression in den Regionen CA1 und CA3 des Hippocampus 2h, 4h und (im Falle von CA1) auch 24 Stunden nach Stressexposition, während sich das Expressionsverhalten im DG nicht änderte, siehe Diagramm 3.3.

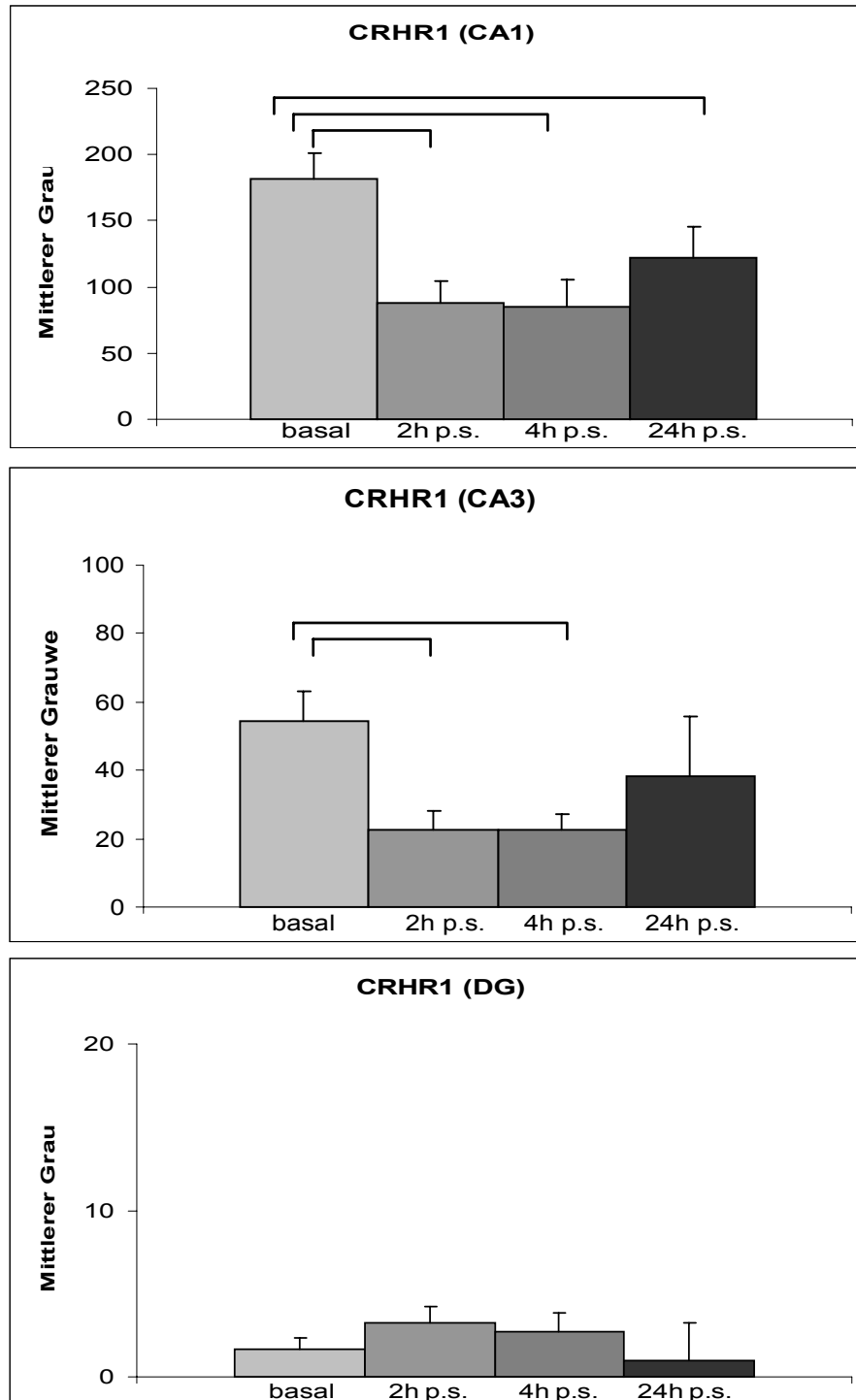


Diagramm 3.3 Expression der CRHR1 mRNA im Hippocampus bei C57/Bl6-Tieren unter Basalbedingungen („basal“) und 2h, 4h und 24h nach Stressexposition getrennt nach den hippocampalen Arealen CA1, CA2 und CA3. Dargestellt sind die Werte der durchschnittlichen optischen Dichte (Mittlerer Grauwert)  $\pm$  SEM (n=6-7 pro Gruppe). Die Klammern symbolisieren signifikante Ergebnisse der *post hoc*-Tests ( $p < 0.05$ ).



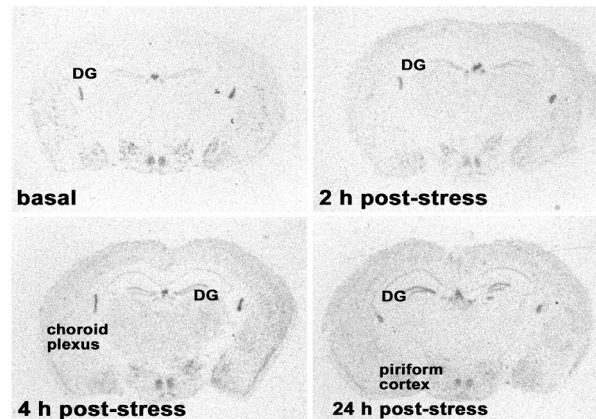
---

Im Detail ergab die statistische Analyse signifikante Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen in CA1 ( $F=16.482$ ,  $p<0.001$ ) und in CA3 ( $F=7.733$ ,  $p=0.001$ ), nicht aber im DG ( $F=1.325$ ,  $p=0.294$ ). Die Mehrfachvergleiche zeigten signifikante Unterschiede zwischen folgenden Gruppen: CA1: basal vs. 2h p. s. ( $p<0.001$ ), basal vs. 4h p. s. ( $p<0.001$ ) und basal vs. 24h p. s. ( $p=0.004$ ); CA3: basal vs. 2h p. s. ( $p=0.003$ ) und basal vs. 4h p. s. ( $p<0.003$ ).

### 3.1.2.2 Expression der CRHR2 mRNA im Hippocampus

Die Dunkelfeldmikroskopie zeigte ein schwaches Signal in CA1 und CA3, während sich im DG 24 Stunden nach Stressexposition eine Zunahme der Signalintensität beobachten ließ, siehe Abbildung 3.3.

a)



b)

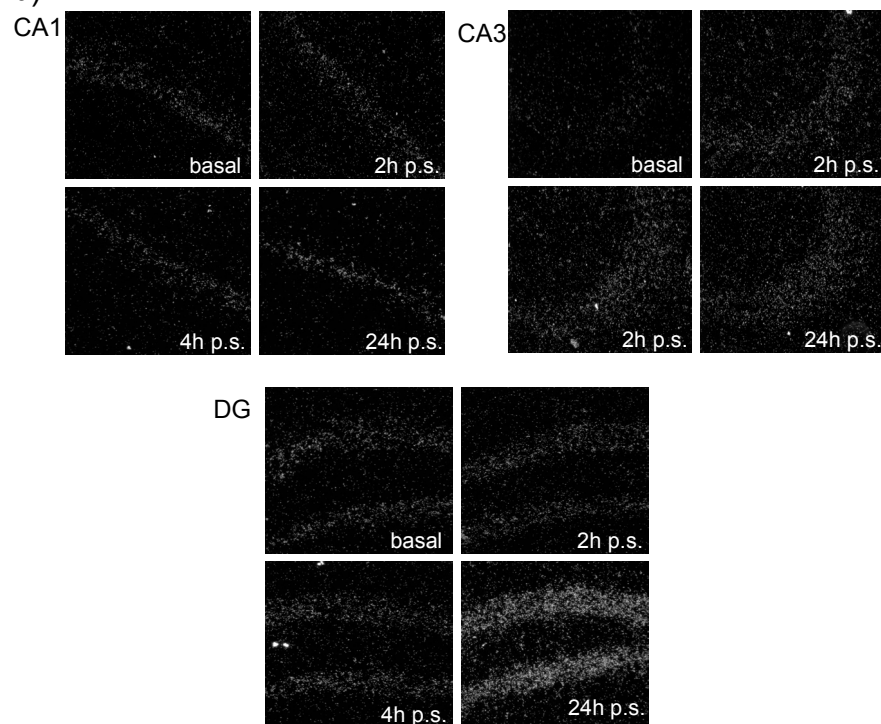


Abbildung 3.3 Mikroskopische Darstellung des Signals der CRHR2 mRNA in situ-Hybridisierung im Hippocampus bei C57/Bl6-Tieren unter Basalbedingungen („basal“) und 2h, 4h und 24h nach Stressexposition (p. s.) auf (a) coronaren Gehirnschnitten im Hellfeld und (b) getrennt nach den hippocampalen Arealen CA1, CA3 und DG im Dunkelfeld

Die statistische Analyse ergab einen signifikanten Anstieg der CRHR2-Expression im DG 24 Stunden nach Stressexposition, der zu früheren Zeitpunkten noch nicht nachweisbar war.

In den Regionen CA1 und CA3 blieb die Expression hingegen unverändert schwach, siehe Diagramm 3.4.

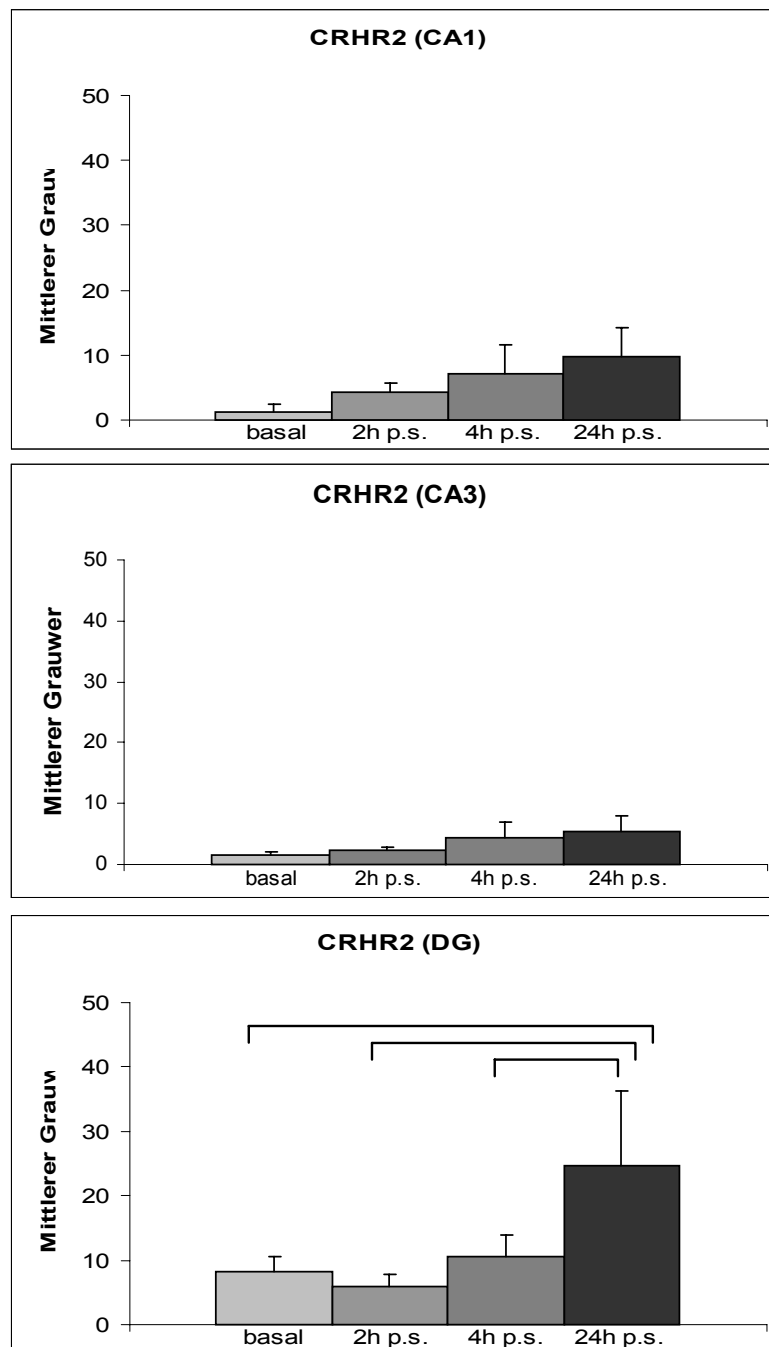


Diagramm 3.4 Expression der CRHR2 mRNA im Hippocampus bei C57/B16-Tieren unter Basalbedingungen („basal“) und 2h, 4h und 24h nach Stressexposition getrennt nach den hippocampalen Arealen CA1, CA2 und CA3. Dargestellt sind die Werte der durchschnittlichen optischen Dichte (Mittlerer Grauwert)  $\pm$  SEM (n=6-7 pro Gruppe). Die Klammern symbolisieren signifikante Ergebnisse der *post hoc*-Tests ( $p < 0.05$ ).

Im Detail lauten die Ergebnisse der statistischen Analyse: In CA3 ( $F=3.530$ ,  $p=0.036$ ) und im DG ( $F=6.863$ ,  $p=0.003$ ) bestanden signifikante Unterschiede zwischen den

---

experimentellen Gruppen, in CA1 hingegen nicht ( $F=2.750$ ,  $p=0.073$ ). Die Mehrfachvergleiche konnten in CA3 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen belegen; im DG zeigten sich hingegen folgende signifikante Unterschiede: basal vs. 24h p. s. ( $p=0.009$ ), 2h p. s. vs. 24h p. s. ( $p=0.004$ ) und 4h p. s. vs. 24h p. s. ( $p=0.028$ ).

### 3.1.2.3 Expression der MR mRNA im Hippocampus

Dunkelfeldmikroskopisch zeigte sich über dem gesamten Hippocampus ein Anstieg des Hybridisierungssignals nach Stressexposition, siehe Abbildung 3.4.

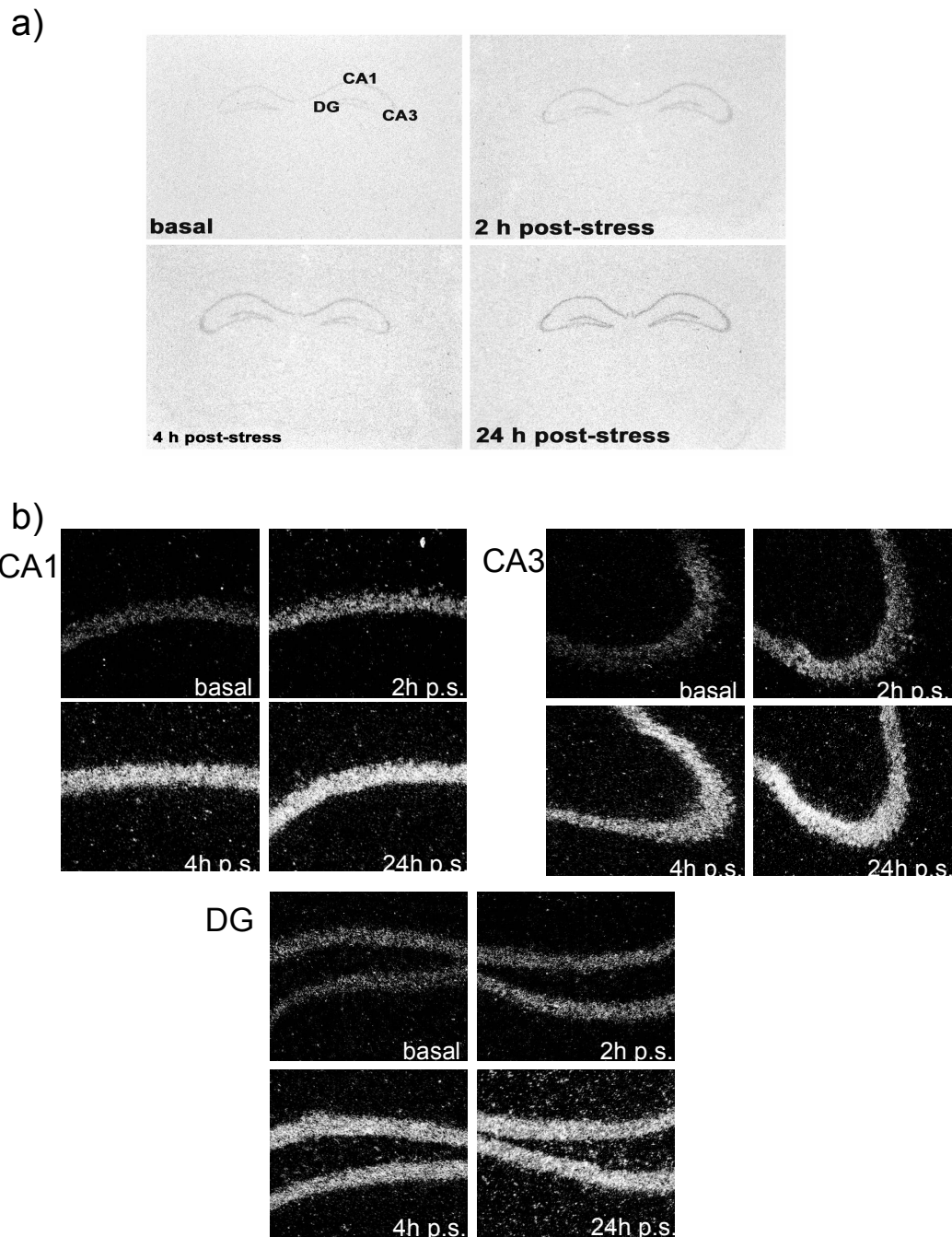


Abbildung 3.4 Mikroskopische Darstellung des Signals der MR mRNA *in situ*-Hybridisierung im Hippocampus bei C57/Bl6-Tieren unter Basalbedingungen („basal“) und 2h, 4h und 24h nach Stressexposition (p. s.) auf (a) coronaren Gehirnschnitten im Hellfeld und (b) getrennt nach den hippocampalen Arealen CA1, CA3 und DG im Dunkelfeld

Die statistische Analyse zeigte einen signifikanten Anstieg der MR mRNA-Expression in allen Hippocampusarealen beginnend vier Stunden nach Stressexposition, der bis zum Ende des Beobachtungszeitraums nachweisbar war, siehe Diagramm 3.5.

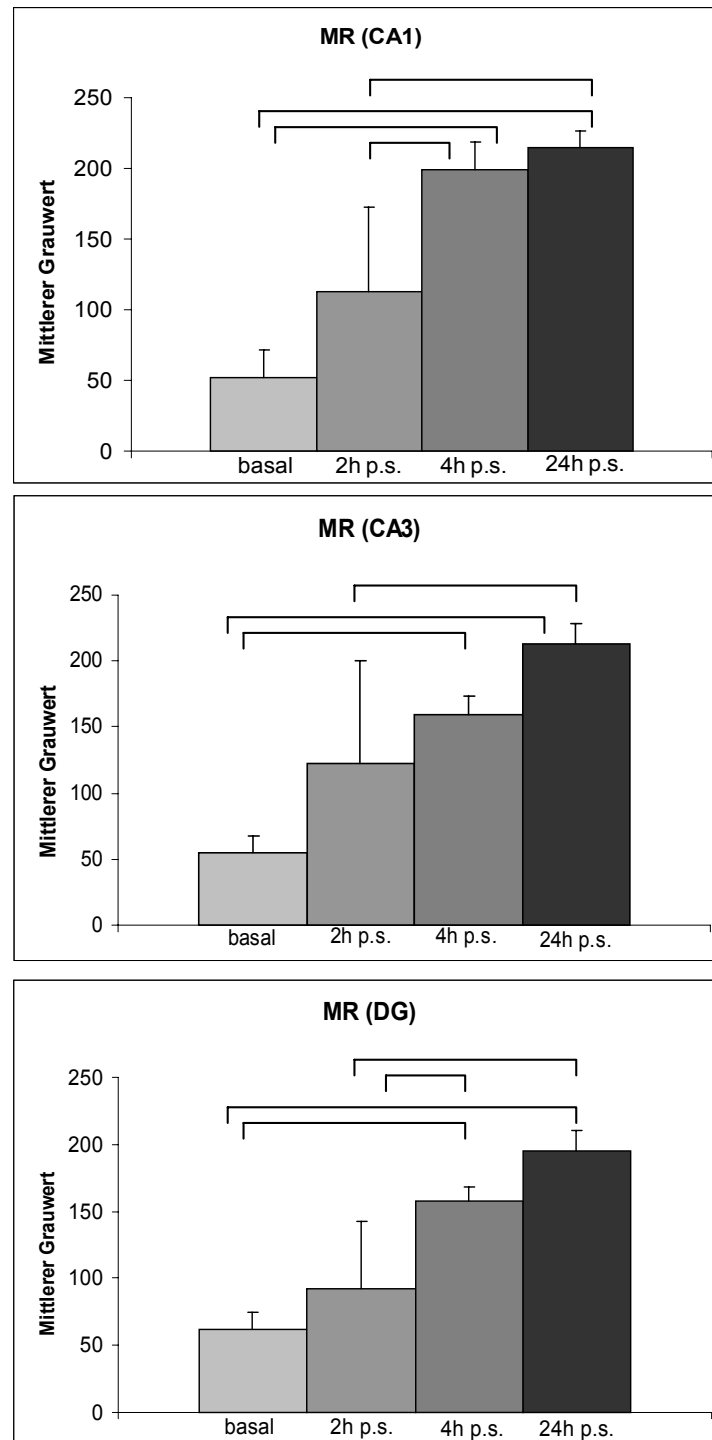


Diagramm 3.5 Expression der MR mRNA im Hippocampus bei C57/Bl6-Tieren unter Basalbedingungen („basal“) und 2h, 4h und 24h nach Stressexposition getrennt nach den hippocampalen Arealen CA1, CA2 und CA3. Dargestellt sind die Werte der durchschnittlichen optischen Dichte (Mittlerer Grauwert)  $\pm$  SEM (n=6-7 pro Gruppe). Die Klammern symbolisieren signifikante Ergebnisse der *post hoc*-Tests ( $p < 0.05$ ).

Im Detail lauten die Ergebnisse: In allen untersuchten Hippocampusarealen bestanden signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen (CA1:  $F=25.155$ ,  $p<0.001$ ; CA2:  $F=14.111$ ,  $p<0.001$ ; DG:  $F=24.035$ ,  $p<0.001$ ). Die Mehrfachvergleiche zeigten folgende signifikante Unterschiede: CA1: basal vs. 4h p. s. ( $p<0.001$ ), basal vs. 24h p. s. ( $p<0,001$ ), 2h p. s. vs. 4h p. s. ( $p=0.004$ ), 2h vs. 24h p. s. ( $p=0.001$ ); CA3: basal vs. 4h p. s. ( $p=0.004$ ), basal vs. 24h p. s. ( $p<0,001$ ), 2h p. s. vs. 24h p. s. ( $p=0.009$ ); DG: basal vs. 4h p. s. ( $p<0.001$ ), basal vs. 24h p. s. ( $p<0,001$ ), 2h p. s. vs. 4h p. s. ( $p=0.010$ ), 2h vs. 24h p. s. ( $p<0.001$ ).

### 3.1.3 mRNA-Expression im Cortex

#### 3.1.3.1 Expression der CRHR1 mRNA im Cortex

Die Dunkelfeldmikroskopie erbrachte einen starken und nachhaltigen Abfall der Expression von CRHR1 im Cortex nach Stressexposition, siehe Abbildung 3.5.

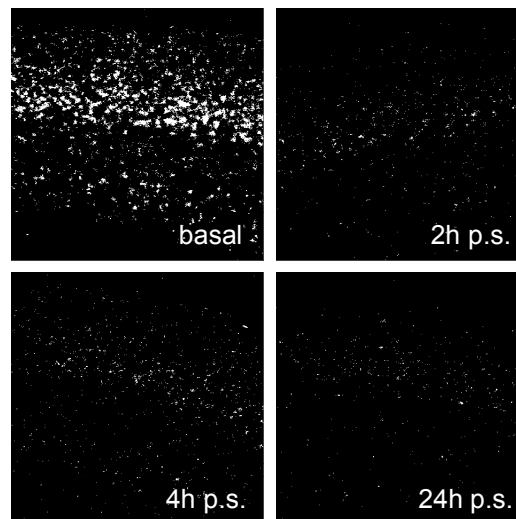


Abbildung 3.5 Dunkelfeldmikroskopische Darstellung des Signals der CRHR1 mRNA *in situ*-Hybridisierung im Cortex bei C57/Bl6-Tieren unter Basalbedingungen („basal“) und 2h, 4h und 24h nach Stressexposition (p. s.)

Es fand sich in der statistischen Analyse eine signifikante Verminderung der CRHR1-Expression im Cortex nach Stressexposition, die zu allen gemessenen Zeitpunkten gleichermaßen nachweisbar war, siehe Diagramm 3.6.

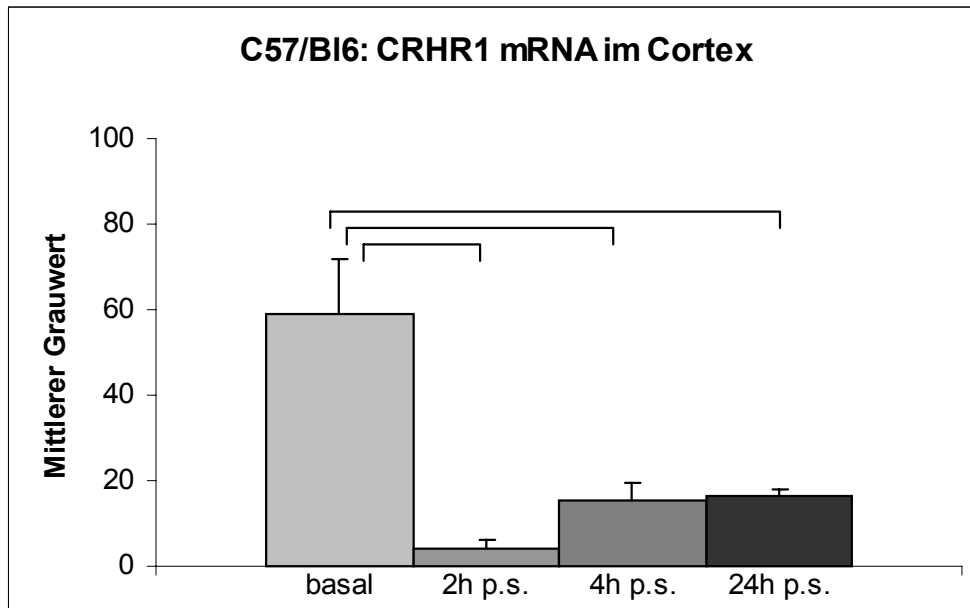


Diagramm 3.6 Expression der CRHR1 mRNA im Cortex bei C57/BI6-Tieren unter Basalbedingungen („basal“) und 2h, 4h und 24h nach Stressexposition. Dargestellt sind die Werte der durchschnittlichen optischen Dichte (Mittlerer Grauwert)  $\pm$  SEM (n=6-7 pro Gruppe). Die Klammern symbolisieren signifikante Ergebnisse der *post hoc*-Tests ( $p < 0.05$ ).

Im Detail ergab die statistische Auswertung: Es bestanden signifikante Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen ( $F=40.210$ ,  $p < 0.001$ ). Die Mehrfachvergleiche zeigten signifikante Unterschiede zwischen folgenden Gruppen: basal vs. 2h p. s. ( $p < 0.001$ ), basal vs. 4h p. s. ( $p < 0.001$ ) und basal vs. 24h p. s. ( $p = 0.004$ ).



### 3.2 Untersuchung der $Crhr1^{loxP/loxP}$ *NesCre*-Mutanten

#### 3.2.1 mRNA-Expression im Nucleus paraventricularis hypothalami (PVN)

##### 3.2.1.1 Expression der CRH mRNA im PVN

Die mikroskopische Untersuchung im Dunkelfeld zeigte deutliche Unterschiede hinsichtlich des CRH mRNA-Hybridisierungssignals im PVN zwischen Tieren, die unter Basalbedingungen und nach Stressexposition getötet wurden, siehe Abbildung 3.6.

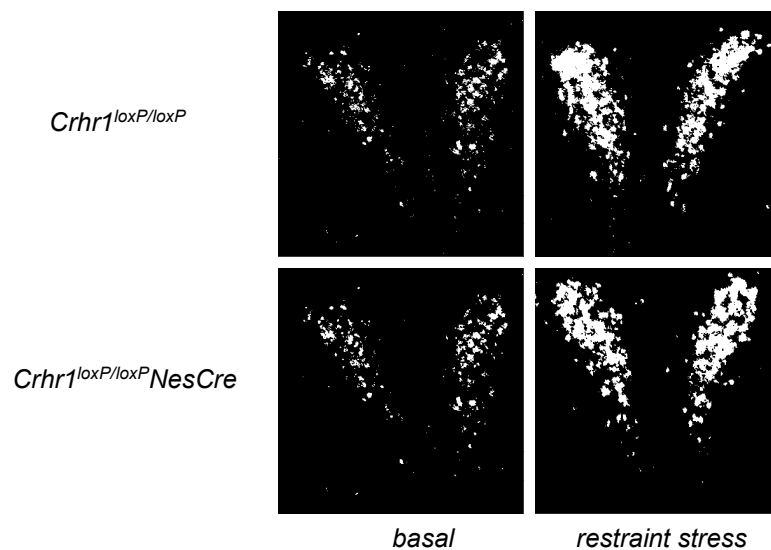


Abbildung 3.6 Dunkelfeldmikroskopische Darstellung des Signals der CRH mRNA *in situ*-Hybridisierung im PVN bei Wildtypen ( $Crhr1^{loxP/loxP}$ ) und bei konditionalen Mutanten ( $Crhr1^{loxP/loxP}$  *NesCre*) unter Basalbedingungen („*basal*“) und nach „*restraint stress*“

Dieser Unterschied ließ sich auch durch die semiquantitative Expressionsanalyse verifizieren: Die univariate Varianzanalyse ergab einen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Faktors „Behandlung“ („*basal*“ und „*restraint stress*“), aber keinen Unterschied hinsichtlich des Faktors „Genotyp“. Es findet sich folglich sowohl bei Wildtypen, als auch bei  $Crhr1^{loxP/loxP}$  *NesCre*-Mutanten ein signifikanter Anstieg der CRH mRNA-Expression nach „*restraint stress*“; hierbei verhalten sich die beiden untersuchten Genotypen identisch, siehe Diagramm 3.7.

Die Ergebnisse der Varianzanalyse sind im Detail: Effekt des Genotyps  $F=0.004$ ,  $p=0.949$ , Effekt der Behandlung  $F=14.792$ ,  $p=0.002$ , Genotyp x Behandlung  $F=0,863$ ,  $p=0.370$ .

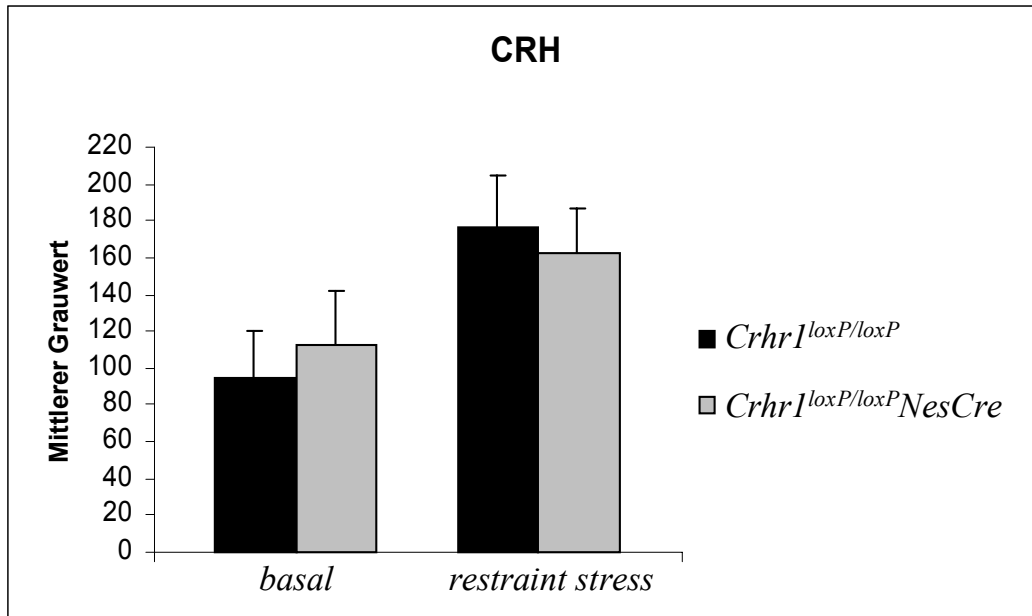


Diagramm 3.7 Expression der CRH mRNA im PVN bei Wildtypen ( $Crhr1^{loxP/loxP}$ ) und bei konditionalen Mutanten ( $Crhr1^{loxP/loxP}NesCre$ ) unter Basalbedingungen („basal“) und nach „restraint stress“. Dargestellt sind die Werte der durchschnittlichen optischen Dichte (Mittlerer Grauwert)  $\pm$  SEM (n=4-5 pro Gruppe).

### 3.2.1.2 Expression der AVP mRNA im PVN

Die Dunkelfeld-mikroskopische Untersuchung des Hybridisierungssignals im PVN ließ keine Unterschiede innerhalb der experimentellen Gruppen erwarten, siehe Abbildung 3.7.

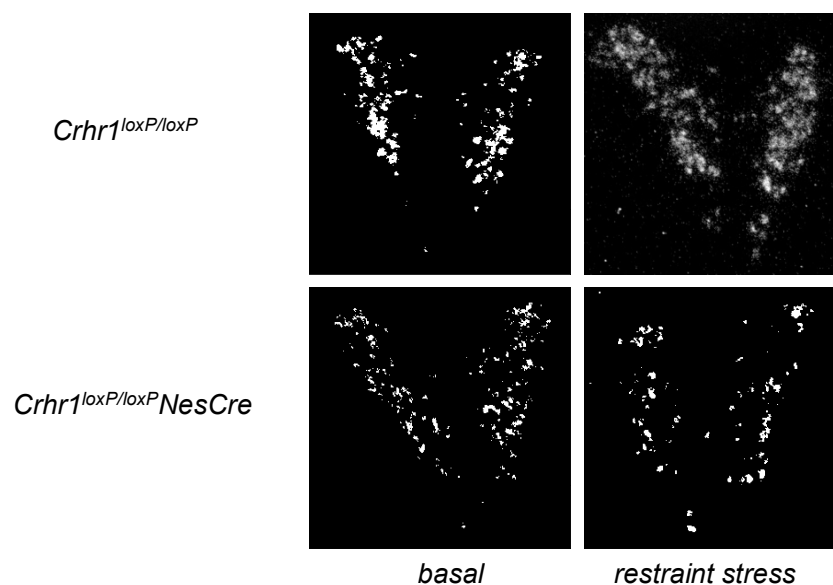


Abbildung 3.7 Dunkelfeldmikroskopische Darstellung des Signals der AVP mRNA *in situ*-Hybridisierung im PVN bei Wildtypen ( $Crhr1^{loxP/loxP}$ ) und bei konditionalen Mutanten ( $Crhr1^{loxP/loxP}NesCre$ ) unter Basalbedingungen („basal“) und nach „restraint stress“

Dies bestätigte auch die semiquantitative Expressionsanalyse der AVP mRNA-Expression im PVN. Die univariate Varianzanalyse ergab weder hinsichtlich des Genotyps noch hinsichtlich der Behandlung der Tiere einen signifikanten Unterschied, siehe Diagramm 3.8.

Die Ergebnisse der Varianzanalyse sind im Detail: Effekt des Genotyps  $F=0.141$ ,  $p=0.713$ , Effekt der Behandlung  $F=0.097$ ,  $p=0.761$ , Genotyp x Behandlung  $F=0.005$ ,  $p=0.943$ ).

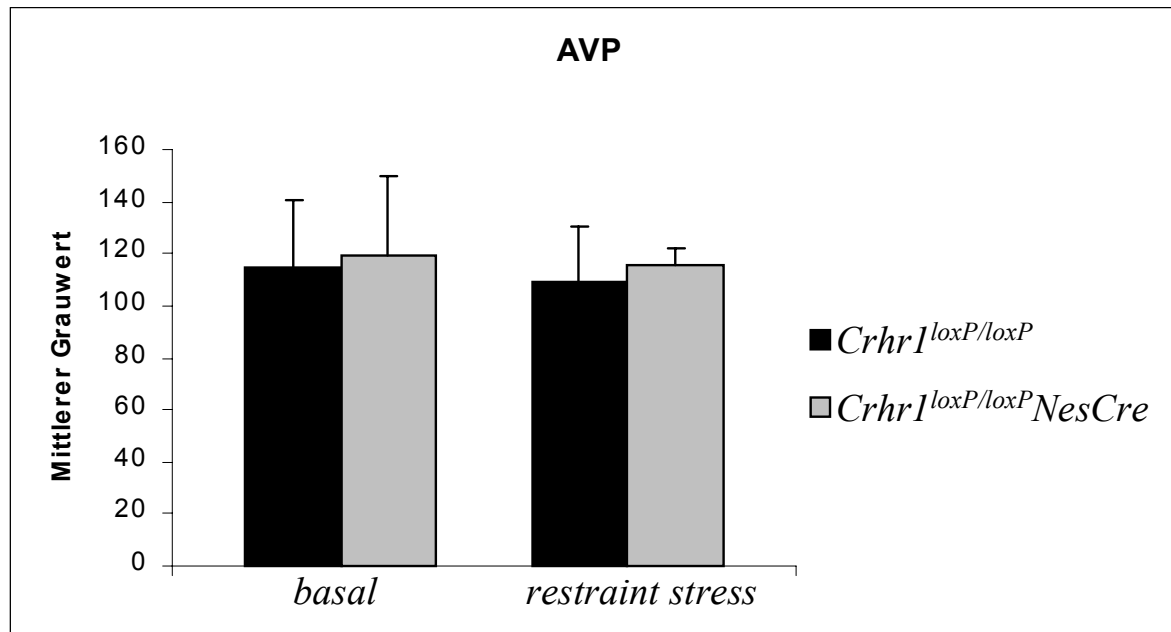


Diagramm 3.8 Expression der AVP mRNA im PVN bei Wildtypen ( $Crhr1^{loxP/loxP}$ ) und bei konditionalen Mutanten ( $Crhr1^{loxP/loxP}NesCre$ ) unter Basalbedingungen („basal“) und nach „restraint stress“. Dargestellt sind die Werte der durchschnittlichen optischen Dichte (Mittlerer Grauwert)  $\pm$  SEM (n=4-5 pro Gruppe).

### 3.2.2 mRNA-Expression im Hippocampus

#### 3.2.2.1 Expression der MR mRNA im Hippocampus

Die dunkelfeldmikroskopische Untersuchung ließ Unterschiede hinsichtlich der Expression der MR mRNA innerhalb der experimentellen Gruppen erwarten, siehe Abbildung 3.8.

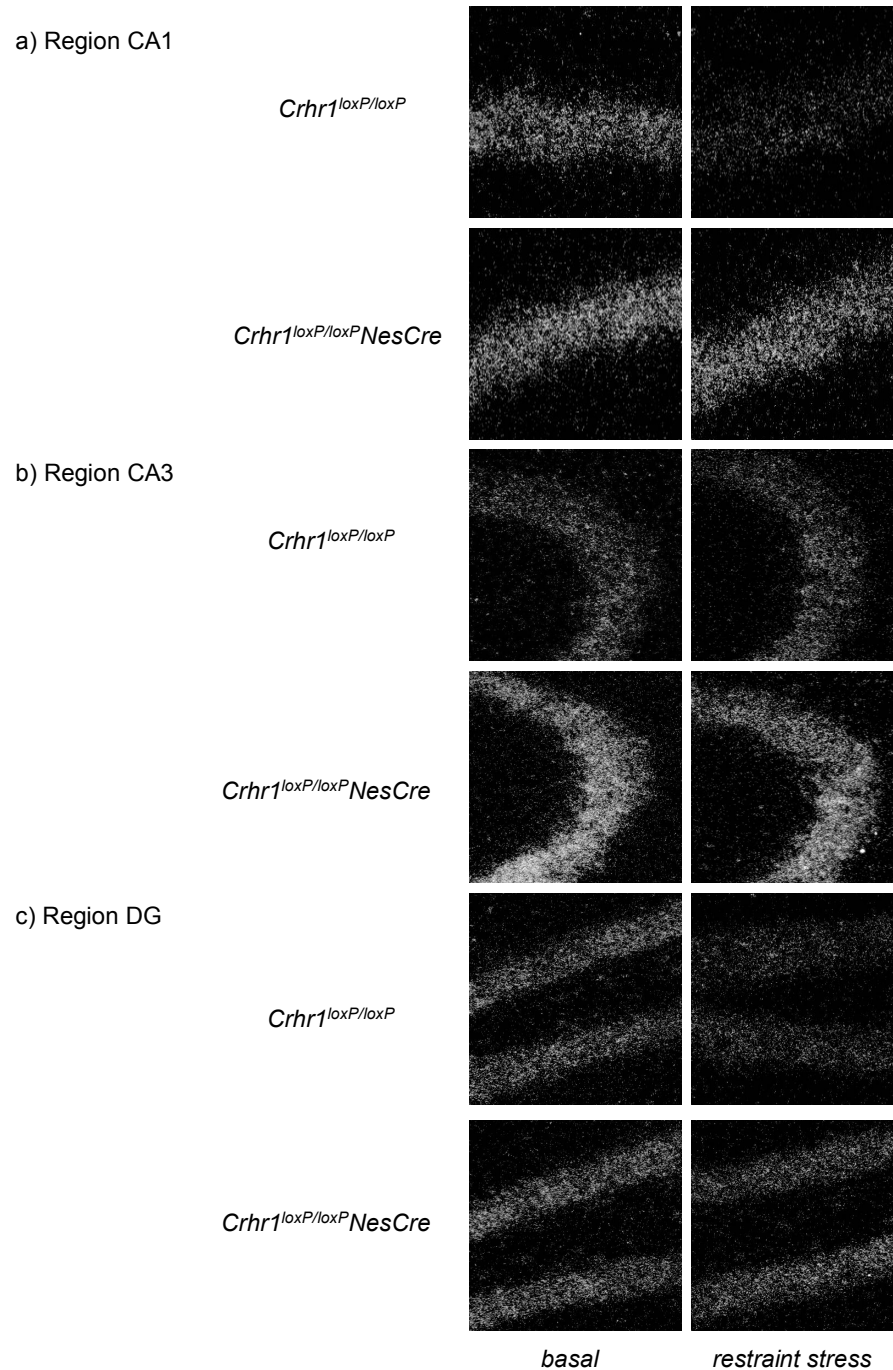


Abbildung 3.8 Dunkelfeldmikroskopische Darstellung des Signals der MR mRNA *in situ*-Hybridisierung in den Regionen CA 1, CA 3 und DG des Hippocampus bei Wildtypen ( $Crhr1^{loxP/loxP}$ ) und bei konditionalen Mutanten ( $Crhr1^{loxP/loxP}NesCre$ ) unter Basalbedingungen („basal“) und nach „restraint stress“.

Die semiquantitative Expressionsanalyse ergab für die ausgewerteten Hippocampusareale (CA 1, CA 3, DG) unterschiedliche Ergebnisse. Die Ergebnisse der univariaten Varianzanalyse waren für die jeweils untersuchten Hippocampusareale wie folgt, siehe Diagramm 3.9:

In der Region CA 3 ergab sich hinsichtlich des Faktors „Genotyp“ ein signifikanter Unterschied; bezüglich des Faktors „Behandlung“ ließ sich dies nicht nachweisen. (Effekt des Genotyps  $F=11.776$ ,  $P=0.005$ , Effekt der Behandlung  $F=0.638$ ,  $P=0.440$ , Genotyp x Behandlung  $F=0.145$ ,  $P=0.710$ ).

In der Region DG konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied für den Faktor „Genotyp“ nachgewiesen werden. Der Faktor „Behandlung“ verfehlte nur knapp das Signifikanzniveau. Eine Interaktion der beiden Faktoren konnte wohl aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs nicht nachgewiesen werden (Effekt des Genotyps  $F=7.293$ ,  $P=0.019$ , Effekt der Behandlung  $F=4.638$ ,  $P=0.052$ , Genotyp x Behandlung  $F=1.928$ ,  $P=0.190$ ).

Die Untersuchung der Region CA 1 weist große Ähnlichkeiten mit den Ergebnissen der Region DG auf: Hier finden sich allerdings signifikante Unterschiede sowohl hinsichtlich des Faktors „Genotyp“ als auch hinsichtlich des Faktors „Behandlung“. Die Interaktion der beiden Faktoren verfehlte nur knapp das Signifikanzniveau. Eine aufgrund der marginalen Signifikanz der Interaktion im Anschluss durchgeführte Untersuchung der Lokalisation der Interaktionen mittels T-Test unter Bonferroni-Adjustierung des Signifikanzniveaus ergab einen Behandlungseffekt nur beim Wildtyp und einen Genotypeneffekt nur unter Stressbedingungen (Effekt des Genotyps  $F=10.809$ ,  $P=0.006$ , Effekt der Behandlung  $F=7.663$ ,  $P=0.017$ , Genotyp x Behandlung  $F=3.886$ ,  $P=0.072$ , Behandlungseffekt bei Wildtyp  $P=0.005$ , Genotypeneffekt bei Stress  $P=0.007$ ).

Obwohl bei der Untersuchung der Regionen CA 1 und DG für einzelne Faktoren aufgrund des geringen Stichprobenumfangs nur marginal signifikante Unterschiede verifizierbar waren, zeigen beide Untersuchungen deutlich eine tendenziell verminderte MR-Expression bei Wildtypen nach „restraint stress“ und unter Stressbedingungen eine tendenziell höhere MR-Expression bei *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten im Vergleich zu Kontrolltieren.

Folglich lässt sich in diesen Regionen eine Tendenz zu verminderter MR mRNA-Expression bei *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>*-Kontrolltieren unter Stresseinfluss feststellen, während sich bei den *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten das Expressionsniveau nach Stressexposition nicht ändert.

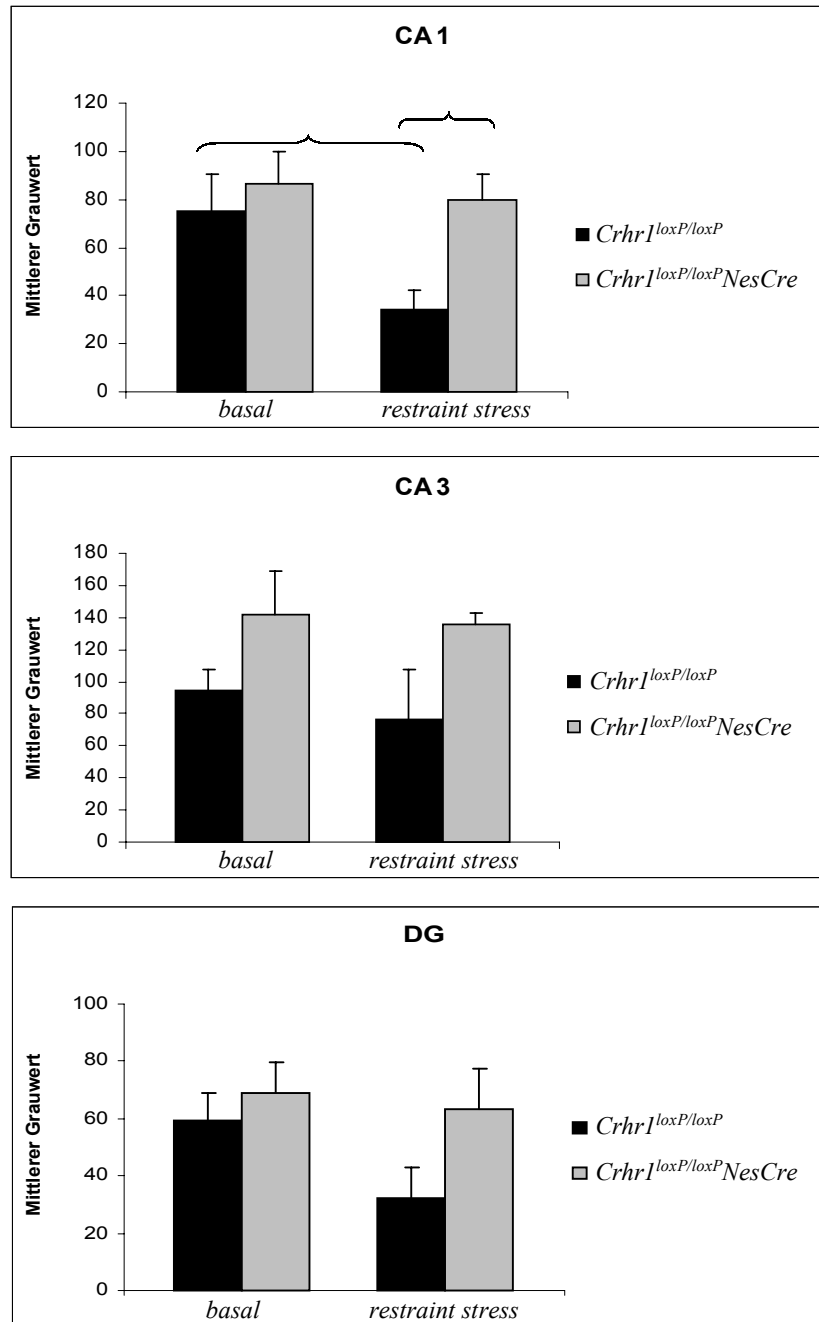


Diagramm 3.9 Expression der MR mRNA in den Regionen CA 1, CA 3 und DG des Hippocampus bei Wildtypen ( $Crhr1^{loxP/loxP}$ ) und bei konditionalen Mutanten ( $Crhr1^{loxP/loxP}NesCre$ ) unter Basalbedingungen („basal“) und nach „restraint stress“. Dargestellt sind die Werte der durchschnittlichen optischen Dichte (Mittlerer Grauwert)  $\pm$  SEM (n=4-5 pro Gruppe); die geschweiften Klammern ({} symbolisieren signifikante Ergebnisse der *post hoc*-Tests ( $p < 0.05$ ; berechnet aufgrund der marginalen Signifikanz der Interaktion Genotyp x Behandlung, siehe Text)

## 4 Diskussion

### 4.1 Einführung

Auf der Suche nach neuen, kausalen Therapiemöglichkeiten zur Behandlung affektiver Störungen kristallisiert sich das HPA-System zunehmend als viel versprechender Angriffspunkt für Pharmaka heraus (Holsboer, 2003). Zur Entwicklung neuer Medikamente ist es allerdings unabdingbar, genaue Kenntnis über die Funktion der an der Stresshormonregulation beteiligten Hormone und Rezeptoren unter physiologischen, wie auch unter pathophysiologischen Bedingungen zu erlangen.

Mausmutanten mit distinkten genetischen Modifikationen kommt auf diesem Weg eine wachsende Bedeutung zu: Diese gezielten Veränderungen erlauben weiter reichende Aussagen über die Funktion der beteiligten Regelkreise. Die Anzahl der Arbeiten, die sich mit solchen Tieren beschäftigt, nimmt seit Entwicklung der nötigen molekularbiologischen Techniken stetig zu (zur Übersicht: Müller & Keck, 2002).

Um allerdings die an solchen Mausmutanten erzielten Ergebnisse in einen größeren Bezugsrahmen integrieren zu können, sind Daten über die Stresshormonregulation bei Wildtyp-Mäusen unentbehrlich. Diese fehlen in der Literatur hingegen noch fast vollständig, da in der Vergangenheit vor allem Ratten Gegenstand der Untersuchungen waren.

Die vorliegende Arbeit hatte sich vor diesem Hintergrund zunächst zur Aufgabe gemacht, C57/Bl6-Wildtyp-Mäuse unter Basalbedingungen und im Zeitverlauf nach Stressexposition im Hinblick auf Veränderungen der mRNA-Expression zu untersuchen, um die Vergleichsmöglichkeiten für die an Mausmutanten erhobenen Befunde zu erweitern.

In einem zweiten Teil beschäftigt sich die Arbeit selbst mit genetisch modifizierten Mäusen: Es wurden Mäuse mit einem konditionalen Knockout für CRHR1 im ZNS (*Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*) unter Basalbedingungen und nach Stressexposition ebenfalls auf Ebene der Transkription untersucht, um Hinweise darauf zu finden, welche Auswirkungen das Fehlen des Rezeptors im ZNS auf die Anpassungsvorgänge an Stress hat.

In dieser Arbeit wurde der so genannte „restraint stress“ als Stressor gewählt. Er vereint als komplexer Stressor unterschiedliche Qualitäten in sich: Die Tiere werden daran gehindert, sich zu bewegen, sie werden von ihrem gewohnten Umfeld getrennt und von normaler Wasser- und Nahrungsaufnahme abgehalten, ferner führen die Umstände zu leichter Hypothermie (Michajlovskij *et al.*, 1988). „Restraint stress“ eignet sich, um einen definierten und standardisiert reproduzierbaren Stressor zu setzen.

Um möglichst umfassende Daten zu erlangen, wurden bei den C57/Bl6-Tieren der PVN, der Hippocampus und der Neocortex untersucht; neben der mRNA der wesentlichen Hormone CRH und AVP richtete sich das Augenmerk auch auf die Hormonrezeptoren CRHR1, CRHR2 und MR.

Auch weil bei den *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten eine Untersuchung der CRHR1-mRNA aufgrund des Fehlens dieses Rezeptors im ZNS nicht möglich ist, beschränkte sich die Studie bei diesen Tieren auf die Beschreibung von Veränderungen der CRH- und AVP-Transkription im PVN und der MR-Transkription im Hippocampus.

Während bei den C57/Bl6-Mäusen die kommerzielle Verfügbarkeit der Tiere eine systematische Untersuchung im Zeitverlauf erlaubte, war diese Untersuchung, die eine große Anzahl von Versuchstieren erforderlich macht, bei den *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit der Tiere nicht möglich.

Im Folgenden sollen die erzielten Ergebnisse nun abschnittsweise diskutiert werden. In der Abhandlung über die C57/Bl6-Tiere wird zunächst ein Überblick über die Datenlage bei Ratten gegeben, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede der beiden Spezies aufzuzeigen. Um die Funktion des CRHR1 im ZNS weiter zu beleuchten, werden dann die an *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten erzielten Ergebnisse mit denjenigen der zugehörigen Kontrolltiere verglichen und weitere Befunde anderer Mutanten mit Veränderungen im CRHR1-System integriert. Zuletzt folgen eine abschließende Synopse der erhobenen Befunde und ein klinischer Ausblick.

## **4.2 Untersuchung der C57/Bl6-Tiere**

### **4.2.1 mRNA-Expression im PVN**

Aufgrund der großen Anzahl an in der Literatur vorhandenen Befunden zu Veränderungen der Transkription im PVN nach Stressexposition, wurde in diesem Abschnitt Wert darauf gelegt, zu vorliegender Arbeit ausschließlich vergleichbare Studien auszuwählen, um einen Überblick über den Kenntnisstand bei Ratten zu ermöglichen. Es wurden deshalb –soweit im Text nicht anders genannt– Arbeiten, die „restraint stress“ als Stressor wählten, und solche, die sich mit maturer, Exon-kodierender mRNA (und nicht mit frühen Transkriptionsprodukten wie heteronuklärer RNA) beschäftigen, selektiert.



#### 4.2.1.1 *Rascher, reversibler Anstieg der CRH mRNA-Expression im PVN nach „restraint stress“*

CRH ist der maßgebliche Stimulus der ACTH-Freisetzung am Hypophysenvorderlappen; die Aktivität der HPA-Achse wird in erster Linie durch dieses Hormon reguliert. Während der Reaktion des Organismus auf Bedrohungen im weitesten Sinne vermittelt CRH darüber hinaus die Integration endokriner (z. B. Stresshormonanstieg), autonomer (z. B. Interaktionen mit dem sympathischen Nervensystem), immunologischer (z. B. Veränderungen bezüglich der Aktivität von Immunzellen) und das Verhalten modulierender Gegenregulationsmechanismen (zur Übersicht: Dunn & Berridge, 1990; Owens & Nemeroff, 1991).

Tierexperimentelle Arbeiten weisen auf eine Beteiligung von CRH an etlichen pathophysiologischen Prozessen hin: Stressexposition unterschiedlichster Art hat stets messbare Auswirkungen auf CRH. Osmotische Stressoren wie intraperitoneale Applikation von hypertoner NaCl-Lösung (Ma & Aguilera, 1999), Schmerzreize wie Elektroschocks an den Pfoten (Imaki *et al.*, 1991) oder immunologischer Stress wie die Gabe von Lipopolysaccharid (LPS) (Rivest & Laflamme, 1995) stimulieren allesamt die Biosynthese und Freisetzung von CRH. Auch der komplexe, aus psychischen sowie physischen Komponenten bestehende „restraint stress“ reiht sich hier ein.

Aufgrund der beschriebenen zentralen Rolle bei der Stresshormonregulation wurde die Veränderung der CRH mRNA-Expression im PVN nach „restraint stress“ im Zeitverlauf bei C57/Bl6-Mäusen untersucht.

Es zeigte sich ein rascher Anstieg der CRH mRNA-Expression bereits zwei Stunden nach einmaliger Stressexposition. Weitere zwei Stunden danach (4h p. s.) unterschied sich das mRNA-Expressionsniveau bereits nicht mehr signifikant von Tieren, die unter Basalbedingungen getötet wurden; das basale Niveau war auch 24 Stunden nach Stressexposition nachweisbar.

In der hauptsächlich aus Untersuchungen an Ratten bestehenden Literatur ist der Anstieg der CRH mRNA-Expression im PVN nach Stressexposition ein unbestrittener Befund. Es existiert eine große Anzahl an Daten aus Experimenten, die, so wie auch in der vorliegenden Arbeit, „restraint stress“ als Stressor wählten. Doch auch innerhalb dieser Studien lassen sich völlig übereinstimmende Ergebnisse über den zeitlichen Verlauf der Änderung der CRH mRNA-Expression nur schwer finden, da in den einzelnen Arbeiten Variablen wie beispielsweise die Dauer des Stressors unterschiedlich gewählt wurden.

Teilweise konnte ein Anstieg der CRH mRNA-Expression bereits eine Stunde nach Stressexposition festgestellt werden (Imaki *et al.*, 1995); zu diesem frühen Zeitpunkt gelang dies aber noch nicht in allen Arbeiten (Ma *et al.*, 1997b). Der Großteil der Studien belegte einen mRNA-Expressionsanstieg zwei bis vier Stunden nach Stressexposition (Makino *et al.*, 1995b; Ma *et al.*, 1997b; Aubry *et al.*, 1999; Givalois *et al.*, 2000). Unterschiede zwischen einzelnen Rattenstämmen scheinen bei diesem Befund keine wesentliche Rolle zu spielen, wie eine Vergleichsstudie zwischen Sprague-Dawley-, Wistar- und CFY-Ratten zeigte (Harbuz *et al.*, 1994). Nur wenige Arbeiten untersuchten eine so lange Zeitspanne, dass eine genaue Aussage über die Dauer der gesteigerten mRNA-Expression getroffen werden könnte: in einer Arbeit beispielsweise konnte ein positiver Befund noch vier Tage nach Stressexposition erhoben werden; nach sieben Tagen gelang dies nicht mehr (Aubry *et al.*, 1999).

An dieser Stelle reihen sich die in vorliegender Arbeit erzielten Ergebnisse in die Literatur ein und ergänzen sie um Befunde an Mäusen. Es fand sich hier ein Beleg für einen raschen, transienten Anstieg der CRH mRNA-Expression im PVN nach Stressexposition bei C57/Bl6-Mäusen. Die Untersuchung im Zeitverlauf zeigte, dass bei C57/Bl6-Tieren wirksame Feedback-Mechanismen zur Limitierung der Stressreaktion existieren, die einen im Vergleich zu anderen Studien schnellen Rückgang der CRH mRNA-Expression bewirken.

Ferner spricht die große Menge an Literatur, die die hier erzielten Ergebnisse stützt, für die Aussagekraft der in dieser Arbeit angewendeten *in situ*-Hybridisierungstechnik und Auswertungsmethode.

#### 4.2.1.2 Keine Änderung der CRHR1 mRNA-Expression im PVN nach „restraint stress“

Die physiologische Rolle von CRHR1 im PVN ist bislang nicht vollständig geklärt. Wie bereits erwähnt, ist die Ratte bezüglich der Stresshormonregulation die am besten untersuchte Spezies; an ihr wurden Hypothesen zur Funktion von CRHR1 im PVN entwickelt:

1985 postulierten Ono *et al.* erstmals eine extrem kurze positive Feedback-Schleife („ultra short positive feedback loop“) oberhalb der Hypophyse, in der CRH seine Wirkung auf die ACTH-Freisetzung mittels positiver Rückkopplungsmechanismen verstärkt (Ono *et al.*, 1985). Etliche hierauf folgende tierexperimentelle Arbeiten an Ratten zeigten, dass sowohl die Gabe von CRH selbst, als auch eine Stressexposition stimulierende Effekte auf die CRHR1 mRNA-Expression im PVN haben, die mehrere (vier bis neun) Stunden anhalten (Luo *et al.*, 1994; Rivest *et al.*, 1995; Makino *et al.*, 1995a; Imaki *et al.*, 1996; Mansi *et al.*, 1996).

Die Interpretation dieser Befunde zusammen mit dem bekannten Anstieg der CRH mRNA-Expression nach Stress führten zur Hypothese, dass CRH im Hypothalamus in einer kurzen Feedback-Schleife über CRHR1 seine eigene Expression stimulieren könnte.

Diese Hypothese wurde vor allem durch eine Arbeit von *Jezova et al.* gestützt: Die intrazerebroventrikuläre Applikation eines (allerdings unselektiven) CRH-Rezeptorantagonisten schwächte den Anstieg der CRH mRNA-Expression nach Stressexposition im Vergleich zur Placeboinjektion signifikant ab. Dies wurde als Beleg dafür gewertet, dass der physiologische CRH-Expressionsanstieg im PVN während Stress zumindest partiell durch CRHR1 vermittelt wird (*Jezova et al.*, 1999). Welche funktionelle Rolle der postulierte „ultra short positive feedback loop“ bei der Ratte jedoch unter physiologischen Bedingungen spielt, ist bislang nicht klar. Denn eine *In vitro*-Untersuchung einer hypothalamischen Organkultur konnte beispielsweise nachweisen, dass die Stimulation von CRHR1 die Freisetzung von CRH hemmt (*Calogero et al.*, 1988).

Die Veränderung der mRNA-Expression von CRHR1 im PVN nach Stressexposition wurde vor oben beschriebenem Hintergrund auch bei den C57/Bl6-Tieren untersucht. Dies erfolgte insbesondere auch im Hinblick darauf, ob sich die an Ratten erhobenen Befunde ebenfalls bei Mäusen finden.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung konnte eine sehr schwache, jedoch noch erkennbare mRNA-Expression von CRHR1 im PVN unter Basalbedingungen nachweisen. Ein Anstieg oder eine andersgeartete Veränderung dieser schwachen mRNA-Expression ließ sich zu keinem untersuchten Zeitpunkt nach Stressexposition belegen; vielmehr war kein Unterschied zu dem unter Basalbedingungen erhaltenen, schwachen Signal erkennbar.

Dieses Ergebnis belegt, dass die bei Ratten nachgewiesene dynamische Regulation von CRHR1 im PVN bei Mäusen nicht nachvollzogen werden kann. Eine unabhängige zweite, unlängst publizierte Arbeit bestätigte dies: *Imaki et al.* untersuchten im direkten Vergleich C57/Bl6-Mäuse und Wistar-Ratten. Im Gegensatz zu Ratten bewirkte weder „restraint stress“ noch siebentägige Gabe von hypertoner Kochsalzlösung bei Mäusen einen Anstieg der CRHR1 mRNA-Expression im PVN (*Imaki et al.*, 2003).

Weitere Untersuchungen sind nötig, um zu klären, welche funktionelle Relevanz die dynamische Regulation der CRHR1-Expression im PVN bei Ratten hat, und ob die Beobachtung, dass bei Mäusen ein statisches System vorliegt, zur Aufdeckung weiterer Unterschiede in der HPA-Regulation zwischen den Spezies führt.

Allgemein gesprochen unterstreicht dieser Befund die Bedeutung von Interspezies-Unterschieden bei der HPA-Regulation.

#### 4.2.1.3 Keine Regulation der AVP mRNA-Expression im PVN nach akutem „restraint stress“

Neben seiner bedeutsamen Rolle für die Regulation des Wasserhaushalts stimuliert AVP in überadditivem Synergismus mit CRH die ACTH-Freisetzung am Hypophysenvorderlappen (Gillies *et al.*, 1982). Dieser Mechanismus spielt unter physiologischen Bedingungen eine große Rolle für die Regulation des HPA-Systems (Rivier & Vale, 1983).

AVP ist darüber hinaus an diversen pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Beispielsweise scheint AVP für die im Alter beobachtete Erhöhung der Stresshormonspiegel verantwortlich zu sein (Hatzinger *et al.*, 2000). Außerdem konnte bei gealterten Ratten mittels *In vivo*-Mikrodialyse eine erhöhte AVP-Freisetzung aus dem PVN nachgewiesen werden (Keck *et al.*, 2000).

Die wichtigste Rolle spielt AVP allerdings bei der Anpassungsreaktion des Organismus an chronischen Stress. Erhöhungen der AVP-Immunoreaktivität im PVN können nach chronischem „restraint stress“ nachgewiesen werden (de Goeij *et al.*, 1992b). Ergebnisse einer Untersuchung über Veränderungen unter psychosozialen Stress ergänzen diese Befunde (de Goeij *et al.*, 1992a). Andauernde Stresseinwirkung zeigt auch Effekte auf der Ebene der Transkription: Wiederholter „restraint stress“ steigert die Expression von AVP mRNA im PVN (Bartanusz *et al.*, 1993); für diesen Effekt scheint eine Stressdauer von mindestens zwei Wochen nötig zu sein (Ma *et al.*, 1997a). Die AVP mRNA-Expressionslevel steigen umso mehr an, je länger und häufiger die Tiere dem Stressor ausgesetzt werden (Ma & Lightman, 1998). Untersuchungen mittels *In vivo*-Mikrodialyse können darüber hinaus auch die tatsächliche Freisetzung von AVP aus dem PVN nach chronischem psychosozialen Stress nachweisen (Wotjak *et al.*, 1996). Arbeiten, die neben den Veränderungen der AVP mRNA auch Auswirkungen auf die CRH mRNA untersuchen, zeigten, dass unter chronischem Stresseinfluss CRH in seiner tragenden Rolle für die Stresshormonregulation von AVP abgelöst wird: Es finden sich steigende AVP mRNA-Level bei fortschreitender Abnahme der CRH mRNA-Expression. Man spricht von einem „*gene switch*“ unter chronischem Stresseinfluss (Ma & Lightman, 1998; Pinnock & Herbert, 2001).

Da AVP durch seine zu CRH synergistische Funktion eine wesentliche Rolle für die Regulation des Stresshormonsystems innehat, wurde auch bei den C57/Bl6-Tieren die AVP mRNA-Expression im PVN nach einmaligem „restraint stress“ im Zeitverlauf untersucht.

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression zwischen den unter Basalbedingungen und den zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Stressexposition getöteten

Tieren nachgewiesen werden. Anzumerken ist, dass sich in den einzelnen experimentellen Gruppen zum Teil eine deutliche interindividuelle Varianz zeigte.

Die Einbettung der erzielten Ergebnisse in die Literatur wird hier wiederum dadurch erschwert, dass entsprechende Untersuchungen des vasopressinergen Systems bislang vornehmlich an Ratten erfolgten. Ein grundlegendes Problem bezüglich der Vergleichbarkeit liegt hier beispielsweise bereits in neuroanatomischen Unterschieden zwischen Maus und Ratte begründet: jedes parvozelluläre CRH-exprimierende Neuron im PVN der Maus exprimiert im Gegensatz zu dem der Ratte auch AVP (Antoni, 1993).

Dennoch seien die an Ratten erhobenen Befunde mitsamt der teilweise konträren Schlussfolgerungen der Autoren über die Regulation der AVP-Expression nach Stressexposition hier dargestellt:

Auf der einen Seite finden sich Studien mit ähnlichen Versuchsanordnungen, die zu dieser Arbeit im Widerspruch stehende Ergebnisse liefern. Sie belegen beispielsweise einen Anstieg der AVP mRNA-Expression ein bis zwei Stunden nach „restraint stress“ (Herman & Sherman, 1993; Herman, 1995; Ma *et al.*, 1997b).

Weiterhin liefert eine systematische Analyse der AVP mRNA-Expression nach einmaligem kurzem „restraint stress“ bei drei unterschiedlichen Rattenstämmen Evidenz für den Einfluss des gewählten Tierstamms auf die erzielten Daten. Nur bei einem Rattenstamm findet sich eine signifikante Erhöhung der AVP-Transkription (CFY), bei den zwei anderen (Sprague Dawley und Wistar) lässt sich dies nicht nachweisen (Harbuz *et al.*, 1994).

Auf der anderen Seite stehen nun Studien, die die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen. Beispielsweise reichten weder zwei Stunden „restraint stress“ bei sofortigem Dekapitieren der Tiere (Makino *et al.*, 1995b), noch eine Stunde bei sechsstündiger Wartezeit bis zum Töten aus (Pinnock & Herbert, 2001), um die Expression der AVP mRNA im PVN zu erhöhen. Besonders zu betonen ist, dass in diesen Arbeiten praktisch identische Auswertungsmethoden im Vergleich zur vorliegenden Untersuchung verwendet wurden, und in so fern trotz der Interspezies-Unterschiede am ehesten Vergleichbarkeit gegeben ist.

Hier reihen sich nun die in vorliegender Arbeit erzielten Ergebnisse der Untersuchungen an den C57/Bl6-Tieren in die Literatur ein und ergänzen sie um Befunde an Mäusen. Diese Daten stützen die weithin akzeptierte Annahme, dass Veränderungen der AVP mRNA-Expression mit chronischem, nicht aber mit akutem Stress assoziiert sind.

#### 4.2.2 mRNA-Expression im Hippocampus

In der Literatur findet sich eine große Menge an Daten, die sich mit Veränderungen der mRNA-Expression nach Stressexposition im PVN auseinandersetzt; Arbeiten aus nunmehr

zwanzig Jahren führten zu einer fundierten Kenntnis der Regulationsmechanismen in diesem Kerngebiet.

In Kontrast dazu existieren nur äußerst wenige Arbeiten zu anderen Hirnregionen wie zum Beispiel dem Hippocampus, dem eine wichtige Rolle in der Modulation des zentralen Feedbacks innerhalb des HPA-Systems zugeschrieben wird.

Während für die Diskussion der Ergebnisse aus dem PVN Wert darauf gelegt wurde, zur Einbettung in die Literatur möglichst vergleichbare Studien auszuwählen, müssen im Folgenden in Ermangelung entsprechender Befunde auch Studien herangezogen werden, die sich in methodischer Hinsicht von vorliegender Arbeit deutlich unterscheiden (zum Beispiel bezüglich des eingesetzten Stressors oder der gewählten Analysetechnik). Hierdurch soll ein allgemeiner Überblick über den aktuellen Kenntnisstand im Hinblick auf die Regulationsmechanismen nach Stress geschaffen werden. Aufgrund der beschriebenen kargen Datenlage stehen dennoch die meisten hier erzielten Befunde als primäre Daten für sich.

#### *4.2.2.1 Rascher Abfall der CRHR1 mRNA-Expression in CA1 und CA3, und verzögerter Anstieg der CRHR2 mRNA-Expression im DG nach „restraint stress“*

Über die Regulation und Funktion der CRH-Rezeptoren im Hippocampus ist bislang wenig bekannt. Neuere Arbeiten belegen, dass im Hippocampus über CRHR1 Verbindungen des Stresshormonsystems zum serotonergen System bestehen; dies könnte eine Schnittstelle zwischen jenen beiden Systemen darstellen, denen eine Beteiligung an der Pathophysiologie affektiver Störungen zugesprochen wird. Belege hierfür finden sich beispielsweise in einer Studie über *In vivo*-Mikrodialyse im Hippocampus (Penalava *et al.*, 2002). Ferner häufen sich Hinweise darauf, dass CRHR1 wesentlich an der dynamischen Regulation der MR-Expression im Hippocampus beteiligt ist, und somit eine besondere Bedeutung für zentrale Feedback-Effekte des HPA-Systems innehat (siehe Diskussionsabschnitte zur MR-Expression). Bezüglich CRHR2 kann bislang nur spekuliert werden. Es existieren Hinweise auf eine Beteiligung auf die Modulation stressbedingter Effekte auf die Konsolidierung von Erinnerungen (Sananbenesi *et al.*, 2003).

Da der Hippocampus eine wichtige an der HPA-Regulation beteiligte Hirnregion ist, und das Vorhandensein von CRH-Rezeptoren auf CRH-vermittelte Regulationsmechanismen schließen lässt, wurde in dieser Arbeit die Expression von CRHR1- und CRHR2 mRNA nach Stressexposition im Zeitverlauf bei den C57/Bl6-Mäusen untersucht.

Während die CRHR1 mRNA im DG generell sehr schwach exprimiert war, zeigte sich ein rascher Abfall der CRHR1 mRNA-Expression in CA1 und CA3 bereits zwei Stunden nach

Stressexposition; erst 24 Stunden später fand sich eine Tendenz zu einem Wiederanstieg. Für CRHR2 ließ sich in den Regionen CA1 und CA3 nur ein sehr schwaches Signal darstellen; in den Körnerzellen des DG fand sich hingegen ein Anstieg der mRNA-Expression 24 Stunden nach Stressexposition.

Hinweise auf eine dynamische Regulation der CRH-Rezeptoren nach Stressexposition finden sich auch in den wenigen einschlägigen Arbeiten, die allesamt an Ratten durchgeführt wurden.

Eine Arbeit belegte einen Anstieg der CRHR1 mRNA-Expression im Hippocampus nach zehntägigem „chronischen unvorhersehbaren Stress“ (hier wurden abwechselnd unterschiedlichste Stressoren zur Vermeidung von Habituation eingesetzt) (Iredale *et al.*, 1996). Intrazerebroventrikuläre Gabe von CRH, nicht Stressexposition, verursachte in einer anderen Arbeit ebenfalls einen Anstieg der mRNA-Expression in CA3 (Brunson *et al.*, 2002).

Die einzige Untersuchung über die Regulation von CRHR2 im Hippocampus stammt aus einer Arbeit, in der immature Ratten von ihren Müttern getrennt wurden („maternal deprivation“): Hier fand sich ein Anstieg der mRNA-Expression in hippocampalen Pyramidenzellen (Vazquez *et al.*, 2003).

Bei den hier erzielten Ergebnissen handelt es sich also um die ersten Befunde über die dynamische Regulation der CRHR1- und CRHR2-mRNA im Hippocampus nach akutem „restraint stress“ bei Mäusen. Besonders interessant ist, dass sich die Veränderungen der mRNA-Expression von CRHR1 und CRHR2 nicht nur gegensätzlich verhalten und einen anderen Zeitverlauf nehmen, sondern auch in unterschiedlichen hippocampalen Regionen lokalisiert sind: Für CRHR1 finden sich die Regulationsvorgänge in CA1 und CA3, für CRHR2 im DG.

Zunächst wäre von besonderer Wichtigkeit, die vorliegenden Befunde durch weitere, ähnliche Untersuchungen an anderen Mäusestämmen und anderen Versuchstierarten zu untermauern. Aufgrund der geringen Kenntnis über die Funktion der CRH-Rezeptoren im Hippocampus und des Konsenses darüber, dass diese Hirnregion eine zentrale Funktion in der HPA-Regulation einnimmt, wird es Aufgabe zukünftiger Studien sein, die dortige Rolle von CRHR1 und CRHR2 zu klären.

#### **4.2.2.2 Nachhaltiger Anstieg der MR mRNA-Expression in allen hippocampalen Regionen nach „restraint stress“**

Die Glukokortikoide als Endhormone der Stresshormonkaskade üben ihrerseits Rückkopplungseffekte auf die Aktivität der HPA-Achse aus. Diese Effekte werden hauptsächlich durch zwei Steroidrezeptoren vermittelt: Der niedrig affine

Glukokortikoidrezeptor (GR), der im ZNS ubiquitär, insbesondere an Hypothalamus und Hypophyse exprimiert ist, vermittelt hauptsächlich in „reaktiver“ Art und Weise einen negativen Feedback-Effekt bei hohen Glukokortikoidspiegeln. Der hoch affine Mineralokortikoidrezeptor (MR), der bereits bei niedrigen Glukokortikoidspiegeln besetzt ist, ist vornehmlich im Hippocampus lokalisiert und kontrolliert in „proaktiver“ Weise tonisch-inhibitorische Einflüsse auf das HPA-System. Diese tonisch-inhibitorischen Einflüsse werden über Projektionen zu GABA-ergen Neuronen im ventrolateralen Septum und im BNST vermittelt, die ihrerseits eine inhibitorische Wirkung auf den PVN haben (zur Übersicht: De Kloet *et al.*, 1998; Reul *et al.*, 2000). Belege für die Beteiligung des MR an diesen tonisch-inhibitorischen Einflüsse liefern beispielsweise Arbeiten, die nach lokaler MR-Antagonistenapplikation in den Hippocampus gesteigerte Stresshormonspiegel nachweisen können (Ratka *et al.*, 1989; Oitzl *et al.*, 1995).

Der MR scheint auch an einigen pathophysiologischen Prozessen beteiligt zu sein. Beispielsweise geht die bei gealterten Ratten beobachtete gesteigerte HPA-Aktivität mit einer reduzierten Anzahl dieses Rezeptors im Hippocampus einher (Van Eekelen *et al.*, 1991; Van Eekelen *et al.*, 1995). Darüber hinaus bewirken trizyklische Antidepressiva neben der bekannten Dämpfung einer HPA-Überaktivität eine Steigerung der MR-Expression im Hippocampus (Reul *et al.*, 1993; Holsboer & Barden, 1996).

Obwohl die MR schon bei Glukokortikoidkonzentrationen, wie man sie ohne die Einwirkung von Stress findet, praktisch stets besetzt sind, sind sie nicht Teil eines statischen, sondern vielmehr eines dynamischen Systems. Sie sind durch die beschriebene tonisch-inhibitorische Wirkung an der Schwellenwertsetzung für die Aktivierbarkeit des HPA-Systems und somit an der Stresshormonregulation wesentlich beteiligt. Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit die MR mRNA-Expression im Hippocampus bei C57/Bl6-Mäusen untersucht, um den Einfluss von Stressexposition auf die mRNA-Expression dieses Rezeptors insbesondere im Zeitverlauf darstellen zu können.

Es wurde bei den C56/Bl6-Mäusen ein signifikanter Anstieg der MR mRNA-Expression in allen untersuchten hippocampalen Regionen (CA1, CA3, DG) beginnend 4h nach Stressexposition nachgewiesen, der bis zum Ende des Beobachtungszeitraums 24 Stunden nach Stressexposition dokumentiert werden konnte.

Wie in den beiden vorangegangenen Abschnitten der Diskussion, muss auch hier die Auswahl der einschlägigen Literatur, in die die erzielten Ergebnisse eingebettet werden sollen, erweitert getroffen werden, da sich bei den wenigen Arbeiten zur MR-Expression keine zu dieser Arbeit analogen Versuchsaufbauten finden. Trotz der unterschiedlichen



methodischen Herangehensweisen sind die Ergebnisse dieser Arbeiten als Hinweise auf mögliche Regulationsmechanismen zu werten und werden somit im Folgenden kurz zusammengefasst.

Teilweise finden sich Anhaltspunkte für einen Abfall von MR- heteronukleärer (hn) RNA im Hippocampus ein bis zwei Stunden nach akutem „restraint stress“; zu diesen Zeitpunkten konnten diese Arbeiten allerdings keine Veränderungen maturer RNA nachweisen (Herman & Watson, 1995; Paskitti *et al.*, 2000). Auch zweieinhalb Stunden nach „restraint stress“ war dies in einer weiteren Studie nicht möglich (Yau *et al.*, 2001). Eine Arbeit von *Karandrea et al.* konnte nach „forced swim stress“ eine verminderte MR mRNA-Expression mittels Northern Blot nachweisen (*Karandrea et al.*, 2002); der selben Gruppe gelang dies aber nach einmaligem „restraint stress“ nicht (*Karandrea et al.*, 2000). Eine weitere Arbeit postuliert einen Zeitverlauf für die MR mRNA-Expression während Stressexposition: Während siebenstündigem „restraint stress“ im Wasser konnte nach dreißig Minuten ein Abfall, nach zwei und vier Stunden ein Anstieg und nach sieben Stunden wieder eine unveränderte MR mRNA-Expression gemessen werden (*Fujikawa et al.*, 2000).

Besonders hinzuweisen ist hier auf Ergebnisse aus einer Arbeit, die sich eigentlich mit der Untersuchung der Rolle von CRHR1 im Hippocampus an konditionalen Mausmutanten beschäftigt: Die dort untersuchten Kontrolltiere, die Wildtyp-Tieren nahe kommen, zeigten wie die C57/Bl6-Mäuse einen Anstieg der MR mRNA-Expression vier Stunden nach „restraint stress“; hierbei handelt es sich um die am ehesten vergleichbare Arbeit (*Müller et al.*, 2003).

Die Untersuchung der Auswirkungen von chronischem Stress liefert nicht minder divergente Ergebnisse. Täglicher „restraint stress“ über zwei Wochen senkt die MR-Expression bei männlichen Ratten, bei weiblichen Tieren findet sich der komplett entgegengesetzte Effekt (*Karandrea et al.*, 2000), intermittierende Stressoren zeigen in einer anderen Arbeit keinen Einfluss auf die MR-Expression (*Herman et al.*, 1999).

Nur wenige Arbeiten haben bislang den Einfluss von akutem Stress auf die MR-Expression systematisch untersucht; die in dieser Arbeit an C57/Bl6-Mäusen erzielten Befunde reihen sich in diese sehr inhomogene Datenlage ein und ergänzen sie vor allem auch in Hinsicht auf den zeitlichen Verlauf der Veränderungen. Weitere Arbeiten sind nötig, um die Veränderungen bei Ratten, Mäusen und auch bei verschiedenen Stämmen dieser Spezies zu untersuchen. Interessant wäre, wie sich der Verlauf der Expressionsveränderungen über den in dieser Arbeit untersuchten Zeitraum hinaus darstellt. Nicht zuletzt sind die funktionelle Relevanz des Befundes und die mögliche Beteiligung an Feedback-Effekten zu klären.

### 4.2.3 mRNA-Expression im Cortex

#### 4.2.3.1 *Rascher und nachhaltiger Abfall der CRHR1 mRNA-Expression im Neocortex nach einmaligem „restraint stress“*

Bei der Maus ist CRHR1 am stärksten in den Schichten II/III und IV des Neocortex exprimiert (Van Pett *et al.*, 2000); allerdings ist nur wenig über die Funktion und Regulation des Rezeptors in der Hirnrinde bekannt.

Eine Beteiligung des kortikalen CRHR1 an der Pathophysiologie bestimmter Krankheiten wird diskutiert: Während Untersuchungen an depressiven Patienten und an Suizidopfern keine richtungsweisenden Befunde lieferten (Hucks *et al.*, 1997), konnte bei Patienten mit einer senilen Demenz vom Alzheimer-Typ in *post mortem*-Untersuchungen eine erhöhte Anzahl von CRH-Rezeptoren im Neocortex nachgewiesen werden (Leake *et al.*, 1990).

Die Untersuchung der CRHR1 mRNA-Expression im Cortex erfolgte in dieser Arbeit vor allem zur Klärung der Frage, ob bei C57/B16-Mäusen eine dynamische Regulation des CRHR1 nach Stressexposition vorliegt, und welchen zeitlichen Verlauf eine solche Regulation nimmt.

Es zeigte sich bei den C57/B16-Tieren eine rasche, starke und nachhaltige Verminderung der CRHR1 mRNA-Expression im Cortex nach Stressexposition, die zu allen gemessenen Zeitpunkten gleichermaßen nachweisbar war.

Wie schon erwähnt, existieren in der Literatur äußerst wenige Daten zu dieser Fragestellung; ausnehmend spärlich ist die Datenlage zu den Auswirkungen eines akuten Stress-Ereignisses wie in dieser Arbeit. Die Studien unterscheiden sich ferner maßgeblich in der methodischen Herangehensweise.

Drei Autoren wählten Ratten als Versuchstiere; zwei davon beschäftigten sich mit immaturren Tieren: In der einen Arbeit wurden die jungen Versuchstiere von ihren Müttern getrennt („maternal deprivation“); dies bewirkte einen Anstieg der CRHR1 mRNA-Expression im Cortex (Vazquez *et al.*, 2003). Ähnliche Ergebnisse lieferte die andere Studie, die den direkten Einfluss von intrazerebroventrikulärer CRH-Gabe untersuchte: hier fand sich ein Anstieg der CRHR1 mRNA in den Schichten II und III zwei und vier Stunden nach CRH-Gabe; die ebenfalls untersuchte CRHR1-Bindungskapazität fiel im Gegensatz zu diesem Befund allerdings ab (Brunson *et al.*, 2002). Die dritte Arbeit untersuchte die Menge an CRHR1 mRNA im Cortex adulter Sprague-Dawley-Ratten: hier fand sich eine Verminderung der CRHR1 mRNA-Expression nach zehntägigem chronischen „unvorhersehbaren Stress“.

---

Interessant ist, dass weder nach akutem Stress, noch nach „restraint stress“ über zehn Tage ein solcher Abfall belegt werden konnte (Iredale *et al.*, 1996).

Nur eine Arbeit verwendete bislang die Maus als Versuchstier. Über zehn Tage täglich wiederholter „restraint stress“ verursachte bei C57/Bl6-Mäusen einen Anstieg der CRHR1 mRNA-Expression im Cortex; bei einem anderen Mäusestamm (DBA) ließ sich dies allerdings nicht nachweisen (Giardino *et al.*, 1996).

Das in dieser Arbeit erzielte Ergebnis stellt den ersten Befund über die Regulation der kortikalen CRHR1 nach akutem „restraint stress“ dar. Der Abfall der CRHR1 mRNA-Expression ist rasch und nachhaltig. In erster Linie stellt sich die Frage, ob der kräftige Abfall auf Transkriptionsebene auch auf Proteinebene nachweisbar ist. Sollte dies der Fall sein, müsste weiter nach der funktionellen Relevanz dieses Befundes geforscht werden: Stellt dieser Mechanismus etwa eine Antwort auf die erhöhte Verfügbarkeit des Liganden CRH nach Stressexposition dar? Welche Einflüsse hat diese Veränderung auf die Modulation des Verhaltens?

### 4.3 Untersuchung der $Crhr1^{loxP/loxP}$ NesCre-Mutanten

#### 4.3.1 mRNA-Expression im PVN

##### 4.3.1.1 Analoger Anstieg der CRH mRNA-Expression im PVN nach „restraint stress“ bei $Crhr1^{loxP/loxP}$ -Kontrolltieren und $Crhr1^{loxP/loxP}$ NesCre-Mutanten

Untersuchungen an genetisch veränderten Mäusen ermöglichten genauere Einblicke in die die HPA-Regulation. Beispielsweise lieferten Mausmutanten mit einem kompletten Knockout für CRH weitere Hinweise auf die essentielle Notwendigkeit dieses Hormons für den physiologischen Ablauf der Stressreaktion: Trotz anderer, noch intakter Kompensationsmechanismen (wie beispielsweise dem vasopressinergen System) zeigten diese Mutanten im Vergleich zu Wildtypen einen stark abgeschwächten Kortisolanstieg nach Stressexposition (Muglia *et al.*, 1995; Jacobson *et al.*, 2000).

Aufgrund der zentralen Rolle des CRH für die HPA-Regulation und vor dem Hintergrund der auffälligen endokrinen Befunde, die an den  $Crhr1^{loxP/loxP}$  NesCre-Mutanten erhoben wurden (siehe unten), wurde die Expression der CRH mRNA im PVN unter Basalbedingungen und nach „restraint stress“ auch bei den Mutanten im Vergleich zu  $Crhr1^{loxP/loxP}$ -Kontrolltieren analysiert.

Es konnte sowohl bei  $Crhr1^{loxP/loxP}$ -Kontrolltieren, als auch bei  $Crhr1^{loxP/loxP}$  NesCre-Mutanten ein signifikanter Anstieg der CRH mRNA-Expression nach Stressexposition nachgewiesen werden; Unterschiede hinsichtlich der Genotypen ergaben sich nicht.

Die Abwesenheit des CRHR1 im ZNS bewirkt folglich weder unter Basalbedingungen noch nach Stressexposition einen Unterschied zwischen Mutanten und Kontrolltieren. Dies unterstreicht die hohe funktionelle Relevanz der peripheren, insbesondere hypophysären CRHR1 für die Regulation des HPA-Systems und zeigt, dass bei den  $Crhr1^{loxP/loxP}$  NesCre-Mutanten wesentliche Teile des HPA-Systems intakt sind.

Im Vergleich zu den 1998 generierten Mausmutanten mit einem konventionellen Knockout für CRHR1 werden die unterschiedlichen Auswirkungen des alleinigen Fehlens des CRHR1 im ZNS bei den  $Crhr1^{loxP/loxP}$  NesCre-Mutanten und des kompletten Knockouts dieses Rezeptors im gesamten Organismus bei den konventionellen Mutanten noch deutlicher: Die konventionellen Knockout-Tiere zeigten eine bereits unter Basalbedingungen erhöhte CRH mRNA-Expression im PVN im Vergleich zu Kontrolltieren. Dieser Befund wurde einem gestörten Glukokortikoid-Feedback aufgrund der niedrigen Kortikosteronspiegel bei diesen Mutanten zugeschrieben (Timpl *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998). Allerdings existieren auch

Hinweise dafür, dass der Glukokortikoidmangel bei den konventionellen Knockout-Tieren nicht ausschließlich für die erhöhte CRH mRNA-Expression verantwortlich ist: Der Befund einer im Vergleich zu Wildtypen erhöhten CRH mRNA-Expression ist schon bei sehr jungen (neun Tage alten) konventionellen Knockout-Tieren zu erheben, obwohl sich in diesem Alter die Glukokortikoidspiegel zwischen Mutanten und Wildtypen noch nicht unterscheiden (Schmidt *et al.*, 2003).

Da die *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten in den endokrinen Untersuchungen keinen Glukokortikoidmangel aufwiesen, ließe sich die bei diesen Tieren mit den *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>*-Kontrolltieren vergleichbare CRH mRNA-Expression unter Basalbedingungen als Argument für die erste Hypothese werten; andernfalls müsste der Unterschied in der unterschiedlichen Verteilung der CRHR1-Rezeptoren bei konventionellen und konditionalen Mutanten liegen.

Bezüglich der weiter oben diskutierten mutmaßlichen Rolle von CRHR1 im PVN in einem so genannten „ultra short positive feedback loop“ kommt den an den *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten erhobenen Befunden eine besondere Bedeutung zu. Die Untersuchung der C57/Bl6-Tiere zeigte, dass im Gegensatz zur Ratte bei der Maus kein Anstieg der CRHR1 mRNA-Expression nach Stressexposition zu beobachten ist. Die an den Mutanten erhobenen Ergebnisse erlauben es, noch einen Schritt weiter zu gehen: Verfechter des „ultra short positive feedback loop“ forderten, ein intakter CRHR1 sei für einen normalen Anstieg der CRH-Expression nach Stress nötig (Jezova *et al.*, 1999). Bei den *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten, denen CRHR1 im gesamten ZNS fehlt, fand sich allerdings eine normale, mit *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>*-Kontrolltieren vergleichbare CRH mRNA-Expression im PVN nach Stressexposition. Unter der Annahme einer kurzen positiven Feedback-Schleife via CRHR1, die bei den konditionalen Mutanten gestört sein müsste, wäre hingegen eine abgeschwächte oder unveränderte CRH mRNA-Expression zu erwarten gewesen. Hieraus folgt, dass bei Mäusen weder eine dynamische Regulation von CRHR1 im PVN nach Stressexposition vorliegt, noch dass CRHR1 für den physiologischen Anstieg der CRH-Expression nach Stress nötig ist.

Ein weiteres Ziel der Expressionsanalyse war zu untersuchen, ob sich auf mRNA-Ebene Korrelate für die in den neuroendokrinen Untersuchungen gewonnenen Befunde finden.

Die neuroendokrinen Experimente wurden in einer von vorliegender Arbeit unabhängigen Untersuchung durchgeführt; die Ergebnisse seien hier kurz zusammengefasst: Die Bestimmung von ACTH und Kortikosteron im Blut erfolgte unter Basalbedingungen und nach zwei-, fünf- und zehnminütigem „restraint stress“. Um Feedback-Effekte erfassen zu können wurde eine weitere Messung eineinhalb Stunden nach fünfminütigem „restraint

stress“ durchgeführt. Die *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten zeigten unter Basalbedingungen höhere Kortikosteronspiegel im Blut als *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>*-Wildtypen, für ACTH verfehlten die Ergebnisse knapp die Signifikanzschwelle. Zu den untersuchten Zeitpunkten nach Stressexposition fand sich durchwegs eine signifikant erhöhte ACTH- und Kortikosteronkonzentration bei *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten im Vergleich zu *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>*-Kontrolltieren. Besonders hervorzuheben ist der gestörte Feedback-Mechanismus: 90 Minuten nach Stressexposition waren ACTH- und Kortikosteronkonzentration im Blut bei *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten immer noch um ein mehrfaches erhöht, während bei Kontrolltieren bereits wieder basale Werte erreicht waren.

Die unter Basalbedingungen leicht erhöhten Kortikosteronspiegel bei *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten bildeten sich nicht im Sinne einer signifikant erhöhten CRH-Expression auf mRNA Ebene ab. Allerdings ist der Gruppenmittelwert der unter Basalbedingungen getöteten Mutanten geringfügig höher als der der Wildtyp-Tiere. Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der CRH mRNA-Expression wäre in Anbetracht der Sensitivität der *in situ*-Hybridisierung und der anschließenden semiquantitativen Expressionsanalyse bei derartigen absoluten Unterschieden der Endhormonkonzentration auch nicht zu erwarten gewesen.

Hinsichtlich der Untersuchungen nach Stressexposition ergeben sich methodische Bedenken, ob ein Abbild der neuroendokrinen Befunde auf mRNA-Ebene erwartet werden kann. Zunächst weist das experimentelle Design der neuroendokrinen Untersuchungen und der vorliegenden Expressionsanalyse Unterschiede auf (fünfminütiger vs. dreißigminütiger „restraint stress“, Messzeitpunkte im Minutenbereich vs. Tötung nach vier Stunden). Insbesondere durch die unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkte könnten sich in den Experimenten verschiedene Phänomene abbilden: die neuroendokrinen Untersuchungen zu den sehr frühen Zeitpunkten messen eher die Freisetzung von bereits vorhandenem, gespeicherten CRH (Inoue *et al.*, 1993), darüber hinaus könnten diese Befunde beispielsweise auch auf einer gesteigerten Empfindlichkeit von Hypophyse und Nebennierenrinde beruhen. Die Expressionsanalyse nach vier Stunden hingegen bildet womöglich späte Phänomene wie das Wiederauffüllen der entleerten CRH-Speicher ab. Die Freisetzungskinetik der Endhormone muss sich folglich nicht zwangsläufig im Expressionsverhalten auf Ebene der CRH mRNA widerspiegeln. Darüber hinaus könnten andere Einflüsse wie beispielsweise die geringere Stabilität und Halbwertszeit von mRNA unter hohen Kortikosteroidspiegeln (Ma *et al.*, 2001) die Ergebnisse konfundieren. Da die Beziehungen zwischen CRH mRNA-Expression, seiner Speicherung und Freisetzung noch wenig aufgeklärt sind und weiterer, funktionell relevanter Untersuchung bedürfen, sind die hier erzielten Ergebnisse der

Expressionsanalyse nach Stressexposition eher als eigenständiger Befund hinsichtlich der zentralen HPA-Regulation bei *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten zu werten.

Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse der Untersuchung der CRH mRNA-Expression an *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten die Bedeutung eines intakten hypophysären CRHR1 für die HPA-Regulation. Sie liefern einen neuen Befund hinsichtlich der Diskussion über die Funktion des CRHR1 in Hinblick auf dessen mutmaßliche Rolle in einem „ultra short positive feedback loop“ im Hypothalamus und weisen auf Interspezies-Unterschiede zwischen Ratten und Mäusen hin.

#### 4.3.1.2 *Kein Unterschied der AVP mRNA-Expression im PVN zwischen *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>*-Kontrolltieren und *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten unter Basalbedingungen und nach „restraint stress“*

Mausmutanten mit einem konventionellen Knockout für CRHR1 lieferten einen weiteren Hinweis auf die Rolle des vasopressinergen Systems: Wie bereits erwähnt, zeigen diese Tiere unter Ruhebedingungen trotz beeinträchtigter Aktivierbarkeit der HPA-Achse durch das Fehlen des CRH/CRHR1-Signalwegs normale ACTH- und Cortisolspiegel. Es stellte sich heraus, dass der Grund für diese Beobachtung in einer kompensatorischen Aktivierung des vasopressinergen Systems liegt: Bei den konventionellen Mutanten wird AVP zur maßgeblichen Triebkraft des HPA-Systems (Müller *et al.*, 2000).

Aufgrund dieses Befundes lag es nahe, auch die in dieser Arbeit behandelten *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten hinsichtlich der Expression der AVP mRNA im PVN zu untersuchen, um zu klären, welche Bedeutung dem vasopressinergen System bei diesen konditionalen Mutanten zukommt.

Die Expressionsanalyse der AVP mRNA im PVN der *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>*-Kontrolltiere und der *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten unter Basalbedingungen und nach Stressexposition ergab weder signifikante Unterschiede hinsichtlich des Genotyps noch hinsichtlich der experimentellen Bedingungen.

Wie bei den C57/Bl6-Tieren zeigten weder die *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>*-Kontrolltiere noch die *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten Veränderungen der AVP mRNA-Expression nach einmaligem Stress: es handelt sich um einen weiteren Beleg dafür, dass chronischer Stress für Veränderungen der AVP mRNA-Expression nötig ist.

Die Beobachtungen an den konditionalen Mutanten zeigen darüber hinaus, dass bei *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten im Gegensatz zu den konventionellen CRHR1-Knockout-Tieren kein kompensatorischer Anstieg des vasopressinergen Systems zu finden ist. Dieser Befund entspricht den Erwartungen, da bei den konditionalen *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten

das HPA-System, insbesondere der CRH/CRHR1-Signalweg vom Hypothalamus zur Hypophyse, überwiegend intakt ist: CRH kann hier seine Funktion als maßgeblicher Aktivator des HPA-Systems weiterhin ausüben.

#### 4.3.2 mRNA-Expression im Hippocampus

##### 4.3.2.1 Keine Regulation der MR mRNA in Abwesenheit von CRHR1

Den an den *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten erhobenen Befunden kommt hinsichtlich der Diskussion über die Beteiligung des CRHR1 an der Regulation der MR-Expression eine besondere Bedeutung zu. Erste Hinweise auf eine solche Interaktion stammen aus einer Arbeit von *Gesing et al.*: „Forced swim stress“ erhöhte die MR-Immunoreaktivität in allen Regionen des Hippocampus nach 24 Stunden. Diese Veränderung ließ sich auch durch intrazerebroventrikuläre Applikation von CRH hervorrufen; ein intrazerebroventrikulär applizierter (allerdings unselektiver) CRHR-Antagonist verhinderte allerdings diesen Anstieg. CRHR spielt folglich für die mittels Immunhistochemie beobachtete Veränderung der Proteinexpression eine Rolle (*Gesing et al.*, 2001).

Der bedeutendste Hinweis auf eine funktionelle Interaktion zwischen CRHR1 und MR im Hippocampus wurde durch die Untersuchung konditionaler Mausmutanten, denen CRHR1 selektiv im limbischen System fehlt, erarbeitet: Bei den Mutanten blieb im Gegensatz zu den Kontrolltieren die dynamische Regulation der MR nach Stressexposition aus (*Müller et al.*, 2003).

In eine ähnliche Richtung weist eine Arbeit von *Schmidt et al.*: Konventionelle CRHR1-Knockout-Mäuse zeigten im Gegensatz zu Kontrolltieren keine Veränderung der MR mRNA-Expression nach „maternal deprivation“. Einschränkend ist anzumerken, dass diese Arbeit neun Tage alte Mäuse untersucht, die mit adulten Tieren bezüglich der HPA-Regulation nur eingeschränkt vergleichbar sind (*Schmidt et al.*, 2003).

Vor diesem Hintergrund wurde die Veränderung der MR mRNA-Expression im Hippocampus nach Stressexposition auch bei den *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten untersucht. Es stellte sich die Frage, welche Auswirkungen das Fehlen des CRHR1 im gesamten ZNS auf die Transkription dieses Rezeptors hat.

Es zeigte sich, dass sich in keiner der drei untersuchten Regionen des Hippocampus die MR mRNA-Expression bei den *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*-Mutanten unter Basalbedingungen und nach „restraint stress“ unterschied, während bei *Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>*-Kontrolltieren zumindest tendenziell in den Regionen CA1 und DG ein Rückgang der MR mRNA-Expression nachweisbar war.



Anzumerken ist, dass der an den *Crhr1*<sup>loxP/loxP</sup>-Kontrolltieren erhobene Befund dem erwarteten Ergebnis widerspricht: Während C57/B16-„Wildtyp“-Mäuse einen kräftigen Anstieg der MR mRNA-Expression nach Stressexposition aufwiesen, der länger als 24 Stunden anhielt, ergab die Untersuchung der *Crhr1*<sup>loxP/loxP</sup>-Kontrolltiere, die Wildtyp-Tieren möglichst entsprechen sollten, die beschriebene Tendenz zu einem Abfall der MR mRNA-Expression nach Stressexposition. Gründe hierfür könnten Unterschiede zwischen den verwendeten Mäusestämmen sein; die inhomogene Datenlage in der Literatur weist in eine ähnliche Richtung. Nicht zuletzt sind Unterschiede zwischen *Crhr1*<sup>loxP/loxP</sup>-Kontrolltieren und Wildtyp-Tieren auch durch die genetischen Manipulationen, die erstgenannte aufweisen (beispielsweise das „gefloxt“ CRHR1-Gen), denkbar; diese sind jedoch zur Generierung regelrechter Kontrolltiere unabdingbar, um genetische Unterschiede zur Mutante zu minimieren.

Zusammenfassend gesprochen stellen die an *Crhr1*<sup>loxP/loxP</sup>*NesCre*-Mutanten erhobenen Befunde weitere Evidenz für die funktionelle Interaktion zwischen CRHR1 und MR dar; hierfür gab es in jüngster Zeit einige Hinweise. Die funktionelle Relevanz dieses Befundes bedarf weiterer Untersuchungen; diese werden zeigen, an welche Stelle in der Kaskade der Stresshormonregulation und der zugehörigen Feedback-Effekte die Interaktion zwischen CRHR1 und MR im Hippocampus einzuordnen ist. Es könnte spekuliert werden, dass sich der Organismus über die Modulation der MR-Expression und somit auch der Schwellenwertsetzung für das gesamte System gegen neue Stresseinflüsse wappnet.

#### **4.4 Kernaussagen und klinischer Ausblick**

Neben den in vielen Arbeiten bereits reproduzierten Standardbefunden über die Regulation von CRH und AVP nach akuter Stressexposition liefert vorliegende Arbeit folgende Kernaussagen:

Bei C57/B16-Mäusen findet sich im Gegensatz zu Ratten kein Anstieg der CRHR1 mRNA-Expression im PVN nach Stressexposition. Darüber hinaus ist ein intakter CRHR1 im ZNS für den physiologischen Anstieg der CRH mRNA in diesem hypothalamischen Kerngebiet nicht notwendig. Ein Regelkreis im Sinne eines „ultra short positive feedback loop“ -wie bei Ratten postuliert- lässt sich bei den untersuchten Mäusen folglich nicht nachweisen.

Sowohl CRHR1 als auch CRHR2 unterliegen im Hippocampus nach akuter Stressexposition dynamischen Regulationsprozessen. Diese verhalten sich in mehrfacher Hinsicht reziprok: Für CRHR1 findet sich ein rascher Abfall der mRNA-Expression in den hippocampalen Regionen CA1 und CA3, für CRHR2 ein verzögerter Anstieg im DG.

Im Neocortex wird CRHR1 nach Stressexposition auf Transkriptionsebene stark herunterreguliert. Dieser Effekt tritt rasch ein und hält über 24 Stunden an.

Der tonisch-inhibitorischen Einfluss auf die HPA-Achse ausübende MR wird im Hippocampus von C57/B16-Mäusen stressabhängig ebenfalls dynamisch reguliert: Es findet sich ein nachhaltiger Anstieg der mRNA-Expression nach Stressexposition. Die untersuchten konditionalen Mausmutanten belegen, dass für diesen Regulationsmechanismus ein intakter CRHR1 im ZNS vorhanden sein muss. Eine Interaktion zwischen CRHR1 und MR ist somit sehr wahrscheinlich; ferner fällt auf, dass die Transkriptionsveränderungen nach Stressexposition für beide Hormonrezeptoren im Hippocampus gegenläufig sind.

Diese Kernaussagen ergänzen als neue Befunde den bisherigen Kenntnisstand über die Stresshormonregulation, insbesondere in Hinsicht auf Speziesunterschiede zwischen Ratte und Maus und die Rolle von CRHR1 im ZNS. Sie erlauben es weiteren Arbeiten hier anzuknüpfen und in neuen Versuchsansätzen die funktionelle Relevanz der einzelnen Beobachtungen aufzuklären.

Je mehr über die molekularen Mechanismen der physiologischen Stresshormonregulation bekannt sein wird, in desto größere Nähe wird die Möglichkeit zur Entwicklung wirksamer Pharmaka für die Behandlung pathophysiologischer Zustände gelangen. Dieses Wissen dient dann nicht nur zur genauen Definition von Zielorten für Pharmaka, sondern auch zur Gewährleistung möglichst hoher Arzneimittelsicherheit.

---

Erste klinische Erfahrungen mit Medikamenten, die am Stresshormonsystem ansetzen, liegen bereits vor: die Behandlung von Patienten, die an einer depressiven Störung litten, mit dem CRHR1-Antagonisten R121919 lieferte viel versprechende Ergebnisse (Zobel *et al.*, 2000).

Nicht nur für die Vielzahl an betroffenen Patienten wäre die Entwicklung derartiger Pharmaka zur Behandlung affektiver Störungen ein immenser Fortschritt, sondern auch für die Psychiatrie selbst: Es würde sich bei Medikamenten, die an der Stresshormonregulation ansetzen, um die ersten, aufgrund hypothesenbasierter Überlegungen entwickelten Pharmaka zur Behandlung einer komplexen psychischen Erkrankung handeln. Dies wäre ein Meilenstein für die Psychiatrie.

## 5 Zusammenfassung

Die bei Patienten mit affektiven Störungen beobachtbare Dysregulation im Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindensystem (engl. HPA-System) stellt ein in der Literatur umfassend belegtes neurobiologisches, ätiopathogenetisch bedeutsames Merkmal dieser Erkrankungen dar. Die an der Stresshormonregulation beteiligten Hormone und Rezeptoren erweisen sich als viel versprechende Ansatzpunkte zur Entwicklung neuer, kausaler pharmakotherapeutischer Strategien.

Zur Entwicklung solcher Pharmaka ist allerdings eine genaue Kenntnis über die zugrunde liegenden Regulationsmechanismen des HPA-Systems unabdingbar; diese ist nur durch präklinische, tierexperimentelle Untersuchungen zu erreichen. Mausmutanten mit distinkten genetischen Modifikationen mit Auswirkungen auf die beteiligten Hormone und Rezeptoren kommt auf diesem Weg eine wachsende Bedeutung zu.

Vorliegende Arbeit gliedert sich nun in zwei Teile:

Zur umfassenderen Einordnung der bei Mausmutanten erhobenen Befunde sind Daten über die zentrale Stresshormonregulation bei Wildtyp-Mäusen unentbehrlich. Da in der Literatur mit wenigen Ausnahmen nur Untersuchungen an Ratten zu finden sind, wurden in dieser Arbeit C57/Bl6-Wildtyp-Mäuse unter Basalbedingungen und im Zeitverlauf nach Stressexposition auf eine Veränderung der Expression von Corticotropin-Releasing Hormon (CRH)-, Arginin-Vasopressin (AVP)-, CRH-Rezeptor 1 (CRHR1)-, CRH-Rezeptor 2 (CRHR2)- und Mineralokortikoid-Rezeptor (MR)- mRNA im Nucleus paraventricularis hypothalami (PVN), im Hippocampus und im Neocortex untersucht.

Im zweiten Teil wurde an transgenen Mäusen der Einfluss des konditionalen Knockouts von CRHR1 im zentralen Nervensystem (ZNS) (*Crhr1<sup>loxP/loxP</sup>NesCre*) ebenfalls auf die basale und die stressinduzierte CRH, AVP und MR mRNA-Expression untersucht, um weitere Erkenntnisse über die Funktion des CRHR1 zu erlangen.

Die Untersuchungen der C57/Bl6-Wildtyp-Mäuse zeigten im PVN einen raschen, transienten Anstieg der CRH mRNA-Expression nach Stressexposition; die AVP mRNA- und die CRHR1 mRNA-Expression änderte sich unter akutem, einmaligem Stresseinfluss nicht. Im Hippocampus fanden sich Hinweise auf eine dynamische Regulation der CRHR1 mRNA-, der CRHR2 mRNA und der MR mRNA-Expression. Im Neocortex konnte ein rascher und nachhaltiger Abfall der CRHR1 mRNA-Expression nach Stressexposition nachgewiesen werden.

Die Untersuchung der konditionalen Mutanten ergab im PVN einen zu Kontrolltieren analogen Anstieg der CRH mRNA-Expression nach Stressexposition; bezüglich der AVP mRNA-Expression zeigten sich weder Effekte des Genotyps noch der Behandlung. Im Hippocampus war bei den Mutanten keine dynamische Regulation der MR mRNA-Expression zu finden.

Zusammenfassend weisen die Untersuchungen an den C57/Bl6-Wildtyp-Mäusen neben Analogien zu den bereits an Ratten gut belegten Standardbefunden zur Regulation der CRH mRNA- und der AVP mRNA-Expression nach akutem Stress auch auf Unterschiede zwischen Ratte und Maus, besonders bezüglich der Regulation der CRHR1 mRNA-Expression im PVN, hin. Die Daten zur dynamischen Regulation der CRHR1 mRNA, der CRHR2 mRNA- und der MR mRNA-Expression nach akuter Stressexposition im Zeitverlauf –zum Teil als primäre Befunde an Mäusen– ergänzen die Literatur.

Die Untersuchungen an den konditionalen Mutanten belegen, dass für physiologische Veränderungen der CRH mRNA- und der AVP mRNA-Expression unter Stresseinfluss zentrale CRHR1 keine wesentliche Rolle spielen; dies stellt wiederum einen wesentlichen Unterschied zwischen Ratte und Maus dar. Ferner ergaben sich weitere Hinweise darauf, dass eine funktionelle Interaktion zwischen CRHR1 und MR im Hippocampus besteht; hierfür häuften sich in der Literatur in jüngster Zeit die Indizien. Besonders dieser Mechanismus könnte wesentliche Auswirkungen auf Feedback-Effekte innerhalb der Regulation der HPA-Achse haben.

## Danksagung

Ich danke *Frau Priv.-Doz. Dr. Marianne Müller* für die hervorragende Betreuung: Von ihr bekam ich nicht nur umfassende wissenschaftliche Anleitung für diese Arbeit; sie förderte auch bereits während der Studienzeit mein aufkeimendes Interesse für die Psychiatrie und beeinflusste meinen Weg wesentlich.

Herrn *Prof. Dr. Axel Steiger* sei für die anfängliche Betreuung der Arbeit ebenfalls vielmals gedankt.

Herzlicher Dank gilt auch *Frau Stephanie Alam*; ohne ihr Zutun wäre die Durchführung der Experimente nicht möglich gewesen. Ihre Hilfsbereitschaft bleibt unerreicht.

Weiter möchte ich auch den Mitgliedern der *AG Müller*, vor allem *Frau Karin Meinhold* danken. Der wissenschaftlich produktive und freundschaftliche Umgang in der Arbeitsgruppe ließ vorliegende Arbeit erst gedeihen.

Ganz besonderer Dank gilt *Herrn Dipl. Stat. Klaus Hechenbichler*, AG Statistik, für die Unterstützung bei den statistischen Berechnungen. Er scheute keine Mühe, mir in ausführlichen Gesprächen sein Fachgebiet näher zu bringen.

Ich danke *Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wurst*, in dessen Arbeitsgruppe vorliegende Arbeit begonnen wurde, für die Unterstützung des Projekts.

Selbstverständlich danke ich auch *Herrn Prof. Dr. Dr. Florian Holsboer*. Ohne seine Förderung als Direktor des Instituts wären sämtliche Forschungsprojekte undenkbar.

Abschließender Dank gilt *meiner Familie*: Von meinen Eltern und Afra bekam ich die kostbarste Unterstützung.

---

## Literaturverzeichnis

- Altuvia S, Wagner EG (2000) Switching on and off with RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 9824-9826.
- Antoni FA (1993) Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. *Frontiers in Neuroendocrinology* 14: 76-122.
- Aubry JM, Bartanusz V, Jezova D, Belin D, Kiss JZ (1999) Single stress induces long-lasting elevations in vasopressin mRNA levels in CRF hypophysiotrophic neurones, but repeated stress is required to modify AVP immunoreactivity. *Journal of Neuroendocrinology* 11: 377-384.
- Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE, Koob GF, Vale WW, Lee KF (2000) Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nature Genetics* 24: 410-414.
- Bartanusz V, Jezova D, Bertini LT, Tilders FJ, Aubry JM, Kiss JZ (1993) Stress-induced increase in vasopressin and corticotropin-releasing factor expression in hypophysiotrophic paraventricular neurons. *Endocrinology* 132: 895-902.
- Board F, Wadeson R, Persky H (1957) Depressive Affect and Endocrine Functions - Blood levels of Adrenal Cortex and Thyroid Hormones in Patients Suffering form Depressive Reactions. *Archives of Neurology and Psychiatry* 78: 612-620.
- Britton DR, Koob GF, Rivier J, Vale W (1982) Intraventricular corticotropin-releasing factor enhances behavioral effects of novelty. *Life Sciences* 31: 363-367.
- Brunson KL, Grigoriadis DE, Lorang MT, Baram TZ (2002) Corticotropin-releasing hormone (CRH) downregulates the function of its receptor (CRF1) and induces CRF1 expression in hippocampal and cortical regions of the immature rat brain. *Experimental Neurology* 176: 75-86.
- Calogero AE, Gallucci WT, Gold PW, Chrousos GP (1988) Multiple feedback regulatory loops upon rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion. Potential clinical implications. *Journal of Clinical Investigation* 82: 767-774.
- Carroll BJ (1982) The dexamethasone suppression test for melancholia. *British Journal of Psychiatry* 140: 292-304.
- Carroll BJ, Curtis GC, Davies BM, Mendels J, Sugerman AA (1976) Urinary free cortisol excretion in depression. *Psychological Medicine* 6: 43-50.
- Chalmers DT, Lovenberg TW, De Souza EB (1995) Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *Journal of Neuroscience* 15: 6340-6350.
- Chang CP, Pearse RV, O'Connell S, Rosenfeld MG (1993) Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain. *Neuron* 11: 1187-1195.

- 
- Chen R, Lewis KA, Perrin MH, Vale WW (1993) Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 8967-8971.
- Chen Y, Brunson KL, Müller MB, Cariaga W, Baram TZ (2000) Immunocytochemical distribution of corticotropin-releasing hormone receptor type-1 (CRF (1))-like immunoreactivity in the mouse brain: light microscopy analysis using an antibody directed against the C-terminus. *Journal of Comparative Neurology* 420: 305-323.
- Coste SC, Kesterson RA, Heldwein KA, Stevens SL, Heard AD, Hollis JH, Murray SE, Hill JK, Pantely GA, Hohimer AR, Hatton DC, Phillips TJ, Finn DA, Low MJ, Rittenberg MB, Stenzel P, Stenzel-Poore MP (2000) Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nature Genetics* 24: 403-409.
- de Goeij DC, Dijkstra H, Tilders FJ (1992a) Chronic psychosocial stress enhances vasopressin, but not corticotropin-releasing factor, in the external zone of the median eminence of male rats: relationship to subordinate status. *Endocrinology* 131: 847-853.
- de Goeij DC, Jezova D, Tilders FJ (1992b) Repeated stress enhances vasopressin synthesis in corticotropin releasing factor neurons in the paraventricular nucleus. *Brain Research* 577: 165-168.
- De Kloet ER (1991) Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. *Frontiers in Neuroendocrinology* 12: 95-164.
- De Kloet ER, Reul JM (1987) Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. *Psychoneuroendocrinology* 12: 83-105.
- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M (1997) Glucocorticoid feedback resistance. *Trend in Endocrinology and Metabolism* 8: 26-33.
- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews* 19: 269-301.
- De Souza EB (1995) Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinology* 20: 789-819.
- Delgado PL (2000) Depression: the case for a monoamine deficiency. *Journal of Clinical Psychiatry* 61 Suppl 6: 7-11.
- Dunn AJ, Berridge CW (1990) Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Research - Brain Research Reviews* 15: 71-100.
- Dunn AJ, File SE (1987) Corticotropin-releasing factor has an anxiogenic action in the social interaction test. *Hormones & Behavior* 21: 193-202.
- Engelmann M, Wotjak CT, Neumann I, Ludwig M, Landgraf R (1996) Behavioral consequences of intracerebral vasopressin and oxytocin: focus on learning and memory. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 20: 341-358.



- 
- Fujikawa T, Soya H, Fukuoka H, Alam KS, Yoshizato H, McEwen BS, Nakashima K (2000) A biphasic regulation of receptor mRNA expressions for growth hormone, glucocorticoid and mineralocorticoid in the rat dentate gyrus during acute stress. *Brain Research* 874: 186-193.
- Gesing A, Bilanz-Bleuel A, Droste SK, Linthorst AC, Holsboer F, Reul JM (2001) Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels: involvement of corticotropin-releasing hormone. *Journal of Neuroscience* 21: 4822-4829.
- Giardino L, Puglisi-Allegra S, Ceccatelli S (1996) CRH-R1 mRNA expression in two strains of inbred mice and its regulation after repeated restraint stress. *Brain Research Molecular Brain Research*. 40: 310-314.
- Gibbons JL (1964) Cortisol secretion rate in depressive illness. *Archives of General Psychiatry* 10: 572-575.
- Gillies GE, Linton EA, Lowry PJ (1982) Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature* 299: 355-357.
- Givalois L, Arancibia S, Tapia-Arancibia L (2000) Concomitant changes in CRH mRNA levels in rat hippocampus and hypothalamus following immobilization stress. *Brain Research Molecular Brain Research*. 75: 166-171.
- Gold PW, Loriaux DL, Roy A, Kling MA, Calabrese JR, Kellner CH, Nieman LK, Post RM, Pickar D, Gallucci W (1986) Responses to corticotropin-releasing hormone in the hypercortisolism of depression and Cushing's disease. Pathophysiologic and diagnostic implications. *New England Journal of Medicine* 314: 1329-1335.
- Griebel G, Perrault G, Sanger DJ (1998) Characterization of the behavioral profile of the non-peptide CRF receptor antagonist CP-154,526 in anxiety models in rodents. Comparison with diazepam and buspirone. *Psychopharmacologia* 138: 55-66.
- Harbuz MS, Jessop DS, Lightman SL, Chowdrey HS (1994) The effects of restraint or hypertonic saline stress on corticotrophin-releasing factor, arginine vasopressin, and proenkephalin A mRNAs in the CFY, Sprague-Dawley and Wistar strains of rat. *Brain Research* 667: 6-12.
- Hatzinger M, Wotjak CT, Naruo T, Simchen R, Keck ME, Landgraf R, Holsboer F, Neumann ID (2000) Endogenous vasopressin contributes to hypothalamic-pituitary-adrenocortical alterations in aged rats. *Journal of Endocrinology* 164: 197-205.
- Heinrichs SC, Richard D (1999) The role of corticotropin-releasing factor and urocortin in the modulation of ingestive behavior. *Neuropeptides* 33: 350-359.
- Herman JP (1995) In situ hybridization analysis of vasopressin gene transcription in the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat: regulation by stress and glucocorticoids. *Journal of Comparative Neurology* 363: 15-27.
- Herman JP, Sherman TG (1993) Acute stress upregulates vasopressin gene expression in parvocellular neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Annals of the New York Academy of Sciences* 689: 546-549.

- 
- Herman JP, Watson SJ (1995) Stress regulation of mineralocorticoid receptor heteronuclear RNA in rat hippocampus. *Brain Research* 677: 243-249.
- Herman JP, Watson SJ, Spencer RL (1999) Defense of adrenocorticosteroid receptor expression in rat hippocampus: effects of stress and strain. *Endocrinology* 140: 3981-3991.
- Heuser I, Yassouridis A, Holsboer F (1994) The combined dexamethasone/CRH test: a refined laboratory test for psychiatric disorders. *Journal of Psychiatric Research* 28: 341-356.
- Hirschfeld RM (2000) History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. *Journal of Clinical Psychiatry* 61 Suppl 6: 4-6.
- Holsboer F (2000) The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23: 477-501.
- Holsboer F (2003) High-quality antidepressant discovery by understanding stress hormone. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1007: 394-404.
- Holsboer F, Barden N (1996) Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocrine Reviews* 17: 187-205.
- Holsboer F, Gerken A, von Bardeleben U, Grimm W, Beyer H, Muller OA, Stalla GK (1986) Human corticotropin-releasing hormone in depression--correlation with thyrotropin secretion following thyrotropin-releasing hormone. *Biological Psychiatry* 21: 601-611.
- Holsboer F, Lauer CJ, Schreiber W, Krieg JC (1995) Altered hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation in healthy subjects at high familial risk for affective disorders. *Neuroendocrinology* 62: 340-347.
- Hucks D, Lowther S, Crompton MR, Katona CLE, Horton RW (1997) Corticotropin-releasing factor binding sites in cortex of depressed suicides. *Psychopharmacology* 134: 174-178.
- Imaki T, Katsumata H, Konishi S-I, Kasagi Y, Minami S (2003) Corticotropin-Releasing Factor Type-1 Receptor mRNA is Not Induced in Mouse Hypothalamus By Either Stress or Osmotic Stimulation. *Journal of Neuroendocrinology* 15: 916-924.
- Imaki T, Nahan JL, Rivier C, Sawchenko PE, Vale W (1991) Differential regulation of corticotropin-releasing factor mRNA in rat brain regions by glucocorticoids and stress. *Journal of Neuroscience* 11: 585-599.
- Imaki T, Naruse M, Harada S, Chikada N, Imaki J, Onodera H, Demura H, Vale W (1996) Corticotropin-releasing factor up-regulates its own receptor mRNA in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Research Molecular Brain Research*. 38: 166-170.
- Imaki T, Xiao-Quan W, Shibasaki T, Yamada K, Harada S, Chikada N, Naruse M, Demura H (1995) Stress-induced activation of neuronal activity and corticotropin-releasing factor gene expression in the paraventricular nucleus is modulated by glucocorticoids in rats. *Journal of Clinical Investigation* 96: 231-238.
- Inoue T, Koyama T, Muraki A, Yamashita I (1993) Effects of single and repeated immobilization stress on corticotropin-releasing factor concentrations in discrete rat brain regions. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 17: 161-170.

- 
- Iredale PA, Terwilliger R, Widnell KL, Nestler EJ, Duman RS (1996) Differential regulation of corticotropin-releasing factor 1 receptor expression by stress and agonist treatments in brain and cultured cells. *Molecular Pharmacology* 50: 1103-1110.
- Ivell R, Richter D (1984) Structure and comparison of the oxytocin and vasopressin genes from rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 2006-2010.
- Jacobson L, Muglia LJ, Weninger SC, Pacak K, Majzoub JA (2000) CRH deficiency impairs but does not block pituitary-adrenal responses to diverse stressors. *Neuroendocrinology* 71: 79-87.
- Jezova D, Ochedalski T, Glickman M, Kiss A, Aguilera G (1999) Central corticotropin-releasing hormone receptors modulate hypothalamic-pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity during stress. *Neuroscience* 94: 797-802.
- Joels M (2001) Corticosteroid actions in the hippocampus. *Journal of Neuroendocrinology* 13: 657-669.
- Karandrea D, Kittas C, Kitraki E (2000) Contribution of sex and cellular context in the regulation of brain corticosteroid receptors following restraint stress. *Neuroendocrinology* 71: 343-353.
- Karandrea D, Kittas C, Kitraki E (2002) Forced swimming differentially affects male and female brain corticosteroid receptors. *Neuroendocrinology* 75: 217-226.
- Keck ME, Hatzinger M, Wotjak CT, Landgraf R, Holsboer F, Neumann ID (2000) Ageing alters intrahypothalamic release patterns of vasopressin and oxytocin in rats. *European Journal of Neuroscience* 12: 1487-1494.
- Keegan CE, Herman JP, Karolyi IJ, O'Shea KS, Camper SA, Seasholtz AF (1994) Differential expression of corticotropin-releasing hormone in developing mouse embryos and adult brain. *Endocrinology* 134: 2547-2555.
- Kishimoto T, Pearse RV, Lin CR, Rosenfeld MG (1995) A sauvagine/corticotropin-releasing factor receptor expressed in heart and skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 1108-1112.
- Kishimoto T, Radulovic J, Radulovic M, Lin CR, Schrick C, Hooshmand F, Hermanson O, Rosenfeld MG, Spiess J (2000) Deletion of *crhr2* reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nature Genetics* 24: 415-419.
- Kühn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K (1995) Inducible gene targeting in mice. *Science* 269: 1427-1429.
- Landgraf R, Wotjak CT, Neumann ID, Engelmann M (1998) Release of vasopressin within the brain contributes to neuroendocrine and behavioral regulation. *Progress in Brain Research* 119: 201-220.
- Lauer CJ, Schreiber W, Modell S, Holsboer F, Krieg JC (1998) The Munich Vulnerability Study of Affective Disorders. Overview of the results at index study. *Nervenarzt* 69: 574-585.

- 
- Leake A, Perry EK, Perry RH, Fairbairn AF, Ferrier IN (1990) Cortical concentrations of corticotropin-releasing hormone and its receptor in Alzheimer type dementia and major depression. *Biological Psychiatry* 28: 603-608.
- Liebsch G, Landgraf R, Gerstberger R, Probst JC, Wotjak CT, Engelmann M, Holsboer F, Montkowski A (1995) Chronic infusion of a CRH1 receptor antisense oligodeoxynucleotide into the central nucleus of the amygdala reduced anxiety-related behavior in socially defeated rats. *Regulatory Peptides* 59: 229-239.
- Luo X, Kiss A, Makara G, Lolait SJ, Aguilera G (1994) Stress-specific regulation of corticotropin releasing hormone receptor expression in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *Journal of Neuroendocrinology* 6: 689-696.
- Ma XM, Aguilera G (1999) Transcriptional responses of the vasopressin and corticotropin-releasing hormone genes to acute and repeated intraperitoneal hypertonic saline injection in rats. *Brain Research Molecular Brain Research*. 68: 129-140.
- Ma XM, Camacho C, Aguilera G (2001) Regulation of corticotropin-releasing hormone (CRH) transcription and CRH mRNA stability by glucocorticoids. *Cellular & Molecular Neurobiology* 21: 465-475.
- Ma XM, Levy A, Lightman SL (1997a) Emergence of an isolated arginine vasopressin (AVP) response to stress after repeated restraint: a study of both AVP and corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid (RNA) and heteronuclear RNA. *Endocrinology* 138: 4351-4357.
- Ma XM, Levy A, Lightman SL (1997b) Rapid changes in heteronuclear RNA for corticotrophin-releasing hormone and arginine vasopressin in response to acute stress. *Journal of Endocrinology* 152: 81-89.
- Ma XM, Lightman SL (1998) The arginine vasopressin and corticotrophin-releasing hormone gene transcription responses to varied frequencies of repeated stress in rats. *Journal of Physiology* 510: 605-614.
- Makino S, Schulkin J, Smith MA, Pacak K, Palkovits M, Gold PW (1995a) Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain and pituitary by glucocorticoids and stress. *Endocrinology* 136: 4517-4525.
- Makino S, Smith MA, Gold PW (1995b) Increased expression of corticotropin-releasing hormone and vasopressin messenger ribonucleic acid (mRNA) in the hypothalamic paraventricular nucleus during repeated stress: association with reduction in glucocorticoid receptor mRNA levels. *Endocrinology* 136: 3299-3309.
- Mansi JA, Rivest S, Drolet G (1996) Regulation of corticotropin-releasing factor type 1 (CRF1) receptor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus of rat hypothalamus by exogenous CRF. *Endocrinology* 137: 4619-4629.
- Michajlovskij N, Lichardus B, Kvetnanski R, Ponec J (1988) Effect of acute and repeated immobilization stress on food and water intake, urine output and vasopressin changes in rats. *Endocrinol Exp* 22: 143-157.

- 
- Modell S, Lauer CJ, Schreiber W, Huber J, Krieg JC, Holsboer F (1998) Hormonal response pattern in the combined DEX-CRH test is stable over time in subjects at high familial risk for affective disorders. *Neuropsychopharmacology* 18: 253-262.
- Morley JE, Levine AS (1982) Corticotrophin releasing factor, grooming and ingestive behavior. *Life Sciences* 31: 1459-1464.
- Muglia L, Jacobson L, Dikkes P, Majzoub JA (1995) Corticotropin-releasing hormone deficiency reveals major fetal but not adult glucocorticoid need. *Nature* 373: 427-432.
- Müller MB, Keck ME (2002) Genetically engineered mice for studies of stress-related clinical conditions. *Journal of Psychiatric Research* 36: 53-76.
- Müller MB, Landgraf R, Preil J, Sillaber I, Kresse AE, Keck ME, Zimmermann S, Holsboer F, Wurst W (2000) Selective activation of the hypothalamic vasopressinergic system in mice deficient for the corticotropin-releasing hormone receptor 1 is dependent on glucocorticoids. *Endocrinology* 141: 4262-4269.
- Müller MB, Zimmermann S, Sillaber I, Hagemeyer TP, Deussing JM, Timpl P, Kormann MS, Droste S, Kuhn R, Reul JM, Holsboer F, Wurst W (2003) Limbic corticotropin-releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress. *Nature Neuroscience* 6: 1011-1012.
- Nagy A (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis: the Journal of Genetics & Development* 26: 99-109.
- Nemeroff CB, Owens MJ, Bissette G, Andorn AC, Stanley M (1988) Reduced corticotropin releasing factor binding sites in the frontal cortex of suicide victims. *Archives of General Psychiatry* 45: 577-579.
- Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, Vale W (1984) Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226: 1342-1344.
- Oitzl MS, van Haarst AD, Sutanto W, De Kloet ER (1995) Corticosterone, brain mineralocorticoid receptors (MRs) and the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis: the Lewis rat as an example of increased central MR capacity and a hyporesponsive HPA axis. *Psychoneuroendocrinology* 20: 655-675.
- Okuyama S, Chaki S, Kawashima N, Suzuki Y, Ogawa S, Nakazato A, Kumagai T, Okubo T, Tomisawa K (1999) Receptor binding, behavioral, and electrophysiological profiles of nonpeptide corticotropin-releasing factor subtype 1 receptor antagonists CRA1000 and CRA1001. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 289: 926-935.
- Ono N, Bedran de Castro JC, McCann SM (1985) Ultrashort-loop positive feedback of corticotropin (ACTH)-releasing factor to enhance ACTH release in stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82: 3528-3531.
- Owens MJ, Nemeroff CB (1991) Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacological Reviews* 43: 425-473.

- 
- Paskitti ME, McCreary BJ, Herman JP (2000) Stress regulation of adrenocorticosteroid receptor gene transcription and mRNA expression in rat hippocampus: time-course analysis. *Brain Research Molecular Brain Research*. 80: 142-152.
- Penalava RG, Flachskamm C, Zimmermann S, Wurst W, Holsboer F, Linthorst AC (2002) Corticotropin-releasing hormone receptor type 1-deficiency enhances hippocampal serotonergic neurotransmission: an in vivo microdialysis study in mutant mice. *Neuroscience* 109: 253-266.
- Perrin MH, Donaldson CJ, Chen R, Lewis KA, Vale WW (1993) Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor. *Endocrinology* 133: 3058-3061.
- Pinnock SB, Herbert J (2001) Corticosterone differentially modulates expression of corticotropin releasing factor and arginine vasopressin mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus following either acute or repeated restraint stress. *European Journal of Neuroscience* 13: 576-584.
- Purba JS, Hoogendijk WJ, Hofman MA, Swaab DF (1996) Increased number of vasopressin- and oxytocin-expressing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in depression. *Archives of General Psychiatry* 53: 137-143.
- Raadsheer FC, Hoogendijk WJ, Stam FC, Tilders FJ, Swaab DF (1994) Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology* 60: 436-444.
- Raadsheer FC, van Heerikhuizen JJ, Lucassen PJ, Hoogendijk WJ, Tilders FJ, Swaab DF (1995) Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in the paraventricular nucleus of patients with Alzheimer's disease and depression. *American Journal of Psychiatry* 152: 1372-1376.
- Ratka A, Sutanto W, Bloemers M, De Kloet ER (1989) On the role of brain mineralocorticoid (type I) and glucocorticoid (type II) receptors in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 50: 117-123.
- Reul JM, De Kloet ER (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117: 2505-2511.
- Reul JM, Gesing A, Droste S, Stec IS, Weber A, Bachmann C, Bilang-Bleuel A, Holsboer F, Linthorst AC (2000) The brain mineralocorticoid receptor: greedy for ligand, mysterious in function. *European Journal of Pharmacology* 405: 235-249.
- Reul JM, Stec I, Soder M, Holsboer F (1993) Chronic treatment of rats with the antidepressant amitriptyline attenuates the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Endocrinology* 133: 312-320.
- Rivest S, Laflamme N (1995) Neuronal activity and neuropeptide gene transcription in the brains of immune-challenged rats. *Journal of Neuroendocrinology* 7: 501-525.
- Rivest S, Laflamme N, Nappi RE (1995) Immune challenge and immobilization stress induce transcription of the gene encoding the CRF receptor in selective nuclei of the rat hypothalamus. *Journal of Neuroscience* 15: 2680-2695.

- 
- Rivier C, Vale W (1983) Interaction of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin on adrenocorticotropin secretion in vivo. *Endocrinology* 113: 939-942.
- Rubin RT, Poland RE, Lesser IM, Winston RA, Blodgett AL (1987) Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression. I. Cortisol secretory dynamics in patients and matched controls. *Archives of General Psychiatry* 44: 328-336.
- Sananbenesi F, Fischer A, Schrick C, Spiess J, Radulovic J (2003) Mitogen-activated protein kinase signaling in the hippocampus and its modulation by corticotropin-releasing factor receptor 2: a possible link between stress and fear memory. *Journal of Neuroscience* 23: 11436-11443.
- Schildkraut JJ (1995) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. 1965. *Journal of Neuropsychiatry & Clinical Neurosciences* 7: 524-533.
- Schmidt M, Oitzl MS, Müller MB, Ohl F, Wurst W, Holsboer F, Levine AS, De Kloet ER (2003) Regulation of the developing hypothalamic-pituitary-adrenal axis in CRH receptor 1 deficient mice. *Neuroscience* 119: 289-295.
- Schmidt RF, Thews G, Lang F (2000) Endokrinologie. In: *Physiologie des Menschen*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Sirinathsinghji DJ (1987) Inhibitory influence of corticotropin releasing factor on components of sexual behaviour in the male rat. *Brain Research* 407: 185-190.
- Skutella T, Probst JC, Renner U, Holsboer F, Behl C (1998) Corticotropin-releasing hormone receptor (type I) antisense targeting reduces anxiety. *Neuroscience* 85: 795-805.
- Smith GW, Aubry JM, Dellu F, Contarino A, Bilezikjian LM, Gold LH, Chen R, Marchuk Y, Hauser C, Bentley CA, Sawchenko PE, Koob GF, Vale W, Lee KF (1998) Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron* 20: 1093-1102.
- Stribley JM, Carter CS (1999) Developmental exposure to vasopressin increases aggression in adult prairie voles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 12601-12604.
- Sutton RE, Koob GF, Le Moal M, Rivier J, Vale W (1982) Corticotropin releasing factor produces behavioural activation in rats. *Nature* 297: 331-333.
- Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW (1983) Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 36: 165-186.
- Swerdlow NR, Geyer MA, Vale WW, Koob GF (1986) Corticotropin-releasing factor potentiates acoustic startle in rats: blockade by chlordiazepoxide. *Psychopharmacologia* 88: 147-152.
- Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK, Blanquet V, Steckler T, Holsboer F, Wurst W (1998) Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nature Genetics* 19: 162-166.

- 
- Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schutz G (1999) Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nature Genetics* 23: 99-103.
- Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213: 1394-1397.
- Van Eekelen JA, Oitzl MS, De Kloet ER (1995) Adrenocortical hyporesponsiveness and glucocorticoid feedback resistance in old male brown Norway rats. *Journals of Gerontology Series A-Biological Sciences & Medical Sciences* 50: B83-B89.
- Van Eekelen JA, Rots NY, Sutanto W, Oitzl MS, De Kloet ER (1991) Brain corticosteroid receptor gene expression and neuroendocrine dynamics during aging. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 40: 679-683.
- Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, Prins GS, Perrin M, Vale W, Sawchenko PE (2000) Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *Journal of Comparative Neurology* 428: 191-212.
- Vazquez DM, Eskandari R, Phelka A, Lopez JF (2003) Impact of maternal deprivation on brain corticotropin-releasing hormone circuits: prevention of CRH receptor-2 mRNA changes by desipramine treatment. *Neuropsychopharmacology* 28: 898-909.
- Villar MJ, Ceccatelli S, Ronnqvist M, Hokfelt T (1994) Nitric oxide synthase increases in hypothalamic magnocellular neurons after salt loading in the rat. An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Brain Research* 644: 273-281.
- Vita N, Laurent P, Lefort S, Chalon P, Lelias JM, Kaghad M, Le Fur G, Caput D, Ferrara P (1993) Primary structure and functional expression of mouse pituitary and human brain corticotrophin releasing factor receptors. *FEBS Letters* 335: 1-5.
- Wotjak CT, Kubota M, Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F, Neumann I, Landgraf R (1996) Release of vasopressin within the rat paraventricular nucleus in response to emotional stress: a novel mechanism of regulating adrenocorticotrophic hormone secretion? *Journal of Neuroscience* 16: 7725-7732.
- Yau JL, Noble J, Seckl JR (2001) Acute restraint stress increases 5-HT7 receptor mRNA expression in the rat hippocampus. *Neuroscience Letters* 309: 141-144.
- Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, Cunningham M, McKay R, Gavin B, Mann J, Vassileva G, McMahon A (1994) Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* 12: 11-24.
- Zobel AW, Nickel T, Kunzel HE, Ackl N, Sonntag A, Ising M, Holsboer F (2000) Effects of the high-affinity corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist R121919 in major depression: the first 20 patients treated. *Journal of Psychiatric Research* 34: 171-181.
- Zobel AW, Yassouridis A, Frieboes RM, Holsboer F (1999) Prediction of medium-term outcome by cortisol response to the combined dexamethasone-CRH test in patients with remitted depression. *American Journal of Psychiatry* 156: 949-951.



---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Geburtsdatum/-ort	02.03.1978 in München
Staatsangehörigkeit	deutsch
Anschrift	Blütenstraße 21a 80799 München
Derzeitige Tätigkeit	Arzt und Wissenschaftler am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München

### Schulbildung und Studium

06/1997	Abitur am Wilhelmsgymnasium München (humanistisches Gymnasium)
1997-2004	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
11/2001	Beginn der Arbeiten zur Dissertation am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München
2003/04	Ausbildung im Praktischen Jahr an Lehrkrankenhäusern der Ludwig- Maximilians-Universität München und an der Psychiatrischen Universitätsklinik „Burghölzli“, Zürich
04/2004	Studienabschluss (Staatsexamen)