

Aus dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie

Direktor: Prof. Dr. Dr. Florian Holsboer

**Die Auswirkungen antidepressiver Therapieverfahren auf  
Verhalten und Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-  
Nebennierenrinden-Achse im Tiermodell**

Dissertation

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

vorgelegt von  
Tobias Welt

aus Frankfurt am Main

Jahr 2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Dr. med. M. E. Keck

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. J. Schopohl  
Prof. Dr. B. Fichtl

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. A. Erhardt  
Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 11.05.2006

# INHALTSVERZEICHNIS

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
1.1	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse.....	8
1.2	HPA-Achsen-Veränderungen bei Depression .....	10
1.3	HPA-System und Dex/CRH-Test.....	12
1.4	Selektiv gezüchtete HAB/LAB-Tiere und der Dex/CRH-Test .....	13
1.5	HAB/LAB-Tiere und Paroxetin.....	14
1.6	Paroxetin und Serotonin.....	15
1.7	Repetitive transkranielle Magnetstimulation (rTMS).....	16
1.8	Prinzip des Forced Swim-Tests.....	19
1.9	Neurogenese.....	20
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
2.1	Tiere und Tierhaltung .....	21
2.1.1	Normale Wistar Ratten.....	21
2.1.2	HAB/LAB-Tiere.....	21
2.2	Verwendete Substanzen und Applikationsformen.....	22
2.2.1	Paroxetin.....	22
2.2.2	Repetitive Transkranielle Magnetstimulation.....	22
2.3	Verhaltenstestung .....	23
2.3.1	Elevated Plus-Maze .....	23
2.3.2	Forced Swim-Test.....	24
2.3.3	Open Field.....	25
2.3.4	Sozialer Konflikt (Social Defeat).....	25
2.4	Blutabnahme .....	26
2.4.1	Chirurgische Implantation eines Jugularvenenkatheters.....	26
2.4.2	Experimenteller Ablauf der Blutentnahme.....	26
2.4.3	Abnahme von Schwanzblut.....	27
2.4.4	Blutanalyse und RIA.....	27
2.5	Mikrodialyse .....	28
2.5.1	Funktionsweise und Aufbau einer Mikrodialyse-Sonde.....	28

2.5.2	Chirurgische Implantation einer Mikrodialyse-Sonde .....	30
2.6	BrdU und Neurogenese.....	31
2.6.1	Gewebebehandlung und Immunhistochemie .....	31
2.6.2	Quantifizierung .....	32
2.7	AVP-mRNA in situ Hybridisierung .....	33
2.8	5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor-mRNA und SERT in situ Hybridisierung .....	34
2.9	Quantitative Rezeptorautoradiographie der SERT-Bindungsstellen.....	35
2.10	V <sub>1a</sub> -Rezeptorautoradiographie.....	35
2.11	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie .....	36
2.12	Glukokortikoid- und Mineralokortikoid-Rezeptormessungen .....	36
2.13	Postmortem Histologie .....	37
2.14	Statistische Auswertung .....	38
2.14.1	Kombinierter Dexamethason/CRH-Test.....	38
2.14.2	Paroxetin .....	38
2.14.3	Transkranielle Magnetstimulation.....	39
2.14.4	Neurogenese.....	39
2.15	Versuchsaufbau und –ablauf.....	39
2.15.1	DEX/CRH-Test mit HAB- und LAB-Ratten .....	39
2.15.2	DEX/CRH-Test mit Vehikel- oder V <sub>1</sub> -Rezeptorantagonist behandelten HAB-Ratten .....	40
2.15.3	Paroxetin .....	40
2.15.4	Transkranielle Magnetstimulation.....	42
2.15.5	Neurogenese.....	43
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>44</b>
3.1	DEX/CRH-Test.....	44
3.1.1	DEX/CRH-Test mit männlichen HAB- und LAB-Tieren .....	44
3.1.2	DEX/CRH-Test mit männlichen HAB-Ratten mit V <sub>1</sub> -Rezeptorantagonist 46	
3.1.3	Basale Freisetzung von AVP im PVN bei HAB- und LAB-Ratten.....	48
3.1.4	Expression von AVP-mRNA im PVN von HAB- und LAB-Ratten .....	48
3.1.5	Immunhistochemie .....	50
3.1.6	Kortikosteroid-Rezeptorbindung im Gehirn und in der Hypophyse.....	50
3.2	Langzeitbehandlung mit Paroxetin .....	51
3.2.1	Forced Swimming .....	51

3.2.2	Open Field.....	53
3.2.3	Effekte der Langzeitbehandlung mit Paroxetin auf die basale und die stressvermittelte Aktivität des HPA-Systems.....	53
3.2.4	Dexamethason/CRH-Test.....	55
3.2.5	Wirkung von Paroxetin auf die Genexpression von AVP im Nucleus paraventricularis.....	57
3.2.6	V <sub>1a</sub> -Rezeptorautoradiographie bei Vehikel- und Paroxetin-behandelten HAB- und LAB-Tieren.....	59
3.2.7	Einfluß der Langzeitbehandlung mit Paroxetin auf die Freisetzung von Serotonin im Hippocampus von HAB- und LAB-Ratten.....	61
3.2.8	Paroxetin hat keinen Einfluss auf die unterschiedliche 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptorgenexpression im Hippocampus bei HAB- und LAB-Ratten.....	63
3.2.9	Erhöhte SERT-Bindungsstellen bei HAB-Tieren: Reduktion durch Langzeitbehandlung mit Paroxetin.....	65
3.3	rTMS bei HAB- und LAB-Tieren.....	67
3.3.1	Berechnete Stromdichteverteilung.....	67
3.3.2	Elevated plus-maze (EPM).....	69
3.3.3	Forced Swimming.....	71
3.3.4	Einfluss von rTMS auf die Aktivität des HPA-Systems.....	75
3.4	Neurogenese.....	80
3.4.1	rTMS normalisiert den stressbedingten Anstieg von ACTH und Kortikosteron im Plasma.....	80
3.4.2	Zellproliferation im Hippocampus: kein Einfluss von rTMS auf die stressassoziierte Abnahme der Proliferationsrate.....	82
3.4.3	rTMS vermindert die Überlebensrate BrDU-markierter Zellen.....	83
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>85</b>
4.1	Der kombinierte DEX/CRH-Test.....	85
4.1.1	Aberrierendes Ergebnis des kombinierten DEX/CRH-Tests bei männlichen HAB-Ratten.....	85
4.1.2	Hyperaktivität des vasopressinergen Systems im PVN: Hauptverantwortlich für das aberrierende Ergebnis des DEX/CRH-Tests oder Kompensationsmechanismus?.....	86
4.1.3	Die Rolle der Glukokortikoid- und der Mineralokortikoidrezeptoren ....	88
4.2	Paroxetin.....	90

4.2.1	Langzeitbehandlung mit Paroxetin induziert eine aktivere Stressbewältigungsstrategie.....	90
4.2.2	Langzeitbehandlung mit Paroxetin normalisiert den DEX/CRH-Test ..	91
4.2.3	Langzeitbehandlung mit Paroxetin reduziert die erhöhte vasopressinerge Genexpression im Hypothalamus .....	92
4.2.4	Serotonin.....	94
4.2.5	Basale und stressinduzierte hippocampale Neurotransmission bei HAB- und LAB-Ratten.....	95
4.2.6	Langzeitbehandlung mit Paroxetin erhöht die raphé-hippocampale Neurotransmission .....	97
4.2.7	Die unterschiedliche Expression von 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptoren im Hippocampus zwischen HAB- und LAB-Tieren werden durch die Behandlung mit Paroxetin nicht beeinflusst.....	99
4.3	Repetitive transkranielle Magnetstimulation .....	101
4.3.1	Neuroendokrine Effekte von rTMS: Dämpfung der stressinduzierten Aktivität des HPA-Systems bei HAB-Ratten .....	101
4.3.2	Verhaltenseffekte von rTMS: Veränderungen der Stressbewältigungsstrategie.....	102
4.3.3	rTMS: Unterschiedliche Wirkung auf das Angstverhalten und die Stressbewältigungsstrategie.....	105
4.4	Neurogenese.....	106
4.4.1	rTMS dämpft die stressinduzierte Aktivität des HPA-Systems .....	106
4.4.2	Zellproliferation im Hippocampus: kein Einfluss von rTMS auf die stressassoziierte Abnahme der Proliferationsrate .....	106
4.4.3	Dissoziation von Stresshormonkonzentrationen und Neurogenese im Hippocampus: Relevanz anderer Faktoren .....	109
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>112</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>130</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>132</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon (Corticotropin)
ANOVA	analysis of variance / Varianzanalyse
AUC	area under the concentration-time curve
AVP	Arginin-8-Vasopressin
B <sub>max</sub>	maximale Bindungskapazität
BrDU	5´Bromo-2-desoxy-Uridin
BW	Bodyweight / Körpergewicht
CCK	Cholezystokinin
CORT	Kortikosteron (bzw. Kortisol beim Menschen)
CRH	Corticotropin-Freisetzungshormon
CRHR1	CRH Rezeptor Typ 1
CRHR2	CRH Rezeptor Typ 2
DAB	Diaminobenzidin
DEX	Dexamethason
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	dorsaler Raphékern
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPM	Elevated plus-maze
FS	Forced Swimming / Forced Swim-Test
GFAP	saures Gliafaserprotein
GR	Glukokortikoidrezeptoren
HAB	high anxiety-related behaviour = hohe angeborene Angstdisposition
HNS	Hypothalamo-Neurohypophysäres-System
HPA(-Achse)	Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical-Axis Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
K <sub>d</sub>	relative Bindungsaffinität
LAB	low anxiety-related behaviour = niedrige angeborene Angstdisposition
MnR	medianer Raphékern
MR	Mineralokortikoidrezeptoren
MRI	Magnetresonanztomographie

NeuN	Neuron-specific nuclear protein
NMDA	n-Methyl-D-Aspartat / Glutamat
NNR	Nebennierenrinde
OXT	Oxitocin
PVC	Polyvinylchlorid
PVN	Nucleus paraventricularis des Hypothalamus
RIA	Radioimmunoassay
rTMS	repetitive transkranielle Magnetstimulation
SERT	Serotonintransporter
SON	Nucleus supraopticus
TMS	transkranielle Magnetstimulation

# 1 Einleitung

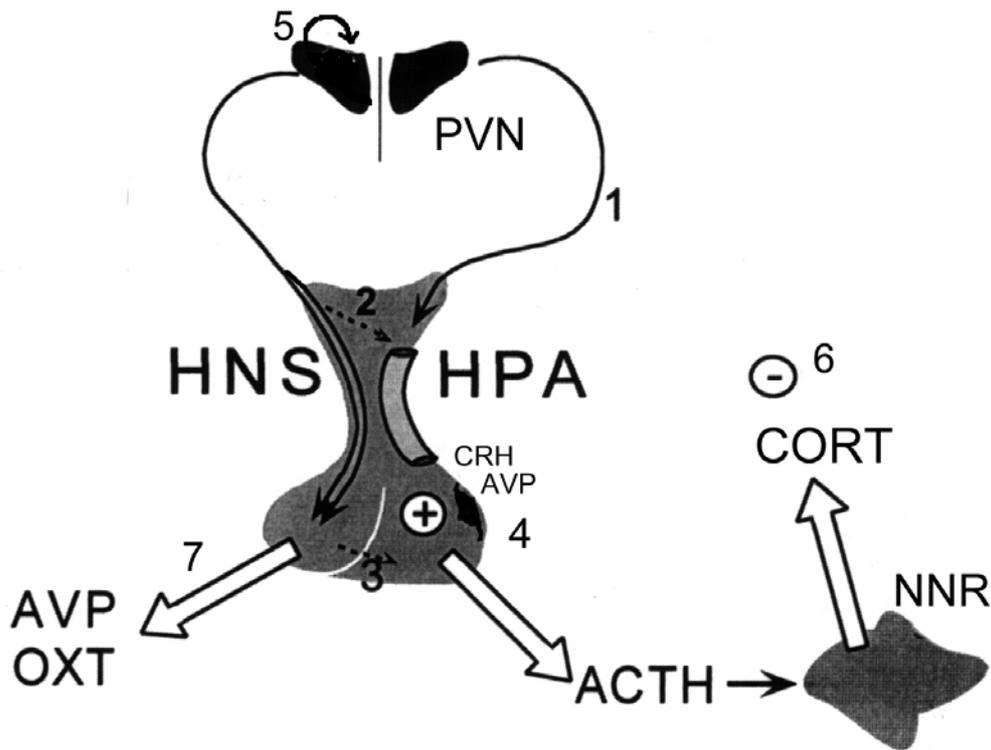
## 1.1 Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-(engl. HPA)-Achse besteht aus dem Nucleus paraventricularis des Hypothalamus (PVN), der Adenohypophyse und der Nebennierenrinde. Die Aktivierung der HPA-Achse spiegelt im Zusammenspiel mit dem sympathischen Nervensystem die neuroendokrine Reaktion des Organismus auf Stress wider. Vasopressin (AVP) und Corticotropin-releasing-Hormon (CRH) werden aus den Axonterminalen parvozellulärer Neuronen des PVN (Abbildung 1.1: 1) in die Zona externa der Eminentia mediana freigesetzt und gelangen über Portalgefäße zur Adenohypophyse (Antoni 1993). Durch en passant-Freisetzung aus den Axonen magnozellularer Neurone des PVN, die zur Neurohypophyse verlaufen, gewinnt magnozelluläres AVP (2) Zugang zu den Portalgefäßen der Adenohypophyse (Holmes, Antoni et al. 1986; Buma and Nieuwenhuys 1987; Nordmann and Dayanithi 1988; Antoni 1993; Wotjak, Kubota et al. 1996; Wotjak, Ganster et al. 1998; Wotjak, Ludwig et al. 2002). Aber auch aus den Axonterminalen magnozellularer Neurone freigesetztes AVP kann über kurze Portalgefäße (3) (*engl. short portal vessels*) die Adenohypophyse erreichen (Bergland and Page 1978). An der Adenohypophyse stimuliert AVP und CRH synergistisch die Freisetzung von ACTH (4), dieses bewirkt wiederum an der Nebennierenrinde (NNR) die Freisetzung von Kortisol (6) beim Menschen, bzw. Kortikosteron bei der Ratte. AVP, welches aus magnozellulären Neuronen im PVN (5) selber synthetisiert und freigesetzt wird, hemmt die Sekretion von AVP aus parvozellulären Neuronen in der Adenohypophyse und somit auch die Freisetzung von ACTH (Pow and Morris 1989; Wotjak, Kubota et al. 1996; Landgraf, Wotjak et al. 1998; Wotjak, Ganster et al. 1998; Morris, Christian et al. 2000; Wotjak, Naruo et al. 2001). Systemisches Kortisol (6), bzw. Kortikosteron wiederum hemmt die Aktivität der HPA-Achse über einen negativen Feedback-Mechanismus im Sinne eines geschlossenen Regelkreises. Das HNS-System besteht aus den magnozellularen Neuronen des PVN, die in der Neurohypophyse AVP und Oxytocin (OXT) (7) aus den Axonterminalen direkt in den Systemkreislauf des Blutes sezernieren, wo AVP

an den Gefäßen zu Vasokonstriktion und in der Niere zu Wasserretention und Harnkonzentration führt.

Hierbei wird deutlich, dass die HPA-Achse und das HNS-System in enger morpho-funktioneller Verbindung stehen: Es gibt zahlreiche Möglichkeiten der wechselseitigen Beeinflussung beider neuroendokriner Systeme z.B. auf den Ebenen der Hypophyse und des PVN. Durch die Möglichkeit der Freisetzung von AVP aus Dendriten, Perikarya/Somata und Axonen (Nordmann and Dayanithi 1988; Pow and Morris 1989; Ludwig 1998; Morris, Christian et al. 2000; Wotjak, Ludwig et al. 2002; Engelmann and Ludwig 2004) parvo- und magnozellularer Neurone des PVN in verschiedene Kompartimente eröffnet sich die Möglichkeit einer sehr fein abgestimmten hormonellen Regulation der HPA-Achse (Landgraf 1995; Landgraf, Wotjak et al. 1998; Wotjak, Ganster et al. 1998): Ein- und dasselbe Neuropeptid kann je nach dem Ort seiner Sekretion und dem Vorhandensein verschiedener Rezeptoren sogar gegensätzliche Wirkungen entfalten. So führt die Intra-PVN-Freisetzung von AVP zu einer Hemmung der ACTH-Sekretion, während AVP zusammen mit CRH an der Adenohypophyse selbst die Sekretion von ACTH stimuliert. Magnozelluläre vasopressinerge Neurone können aus Dendriten und dem Zellsoma AVP freisetzen, während zur gleichen Zeit die Sekretion von AVP am Axonterminal in der Neurohypophyse blockiert ist (Wotjak, Ganster et al. 1998; Engelmann and Ludwig 2004).

Zusätzlich zu ihrer Funktion als zentrale Regulatoren der HPA-Achse sind AVP und CRH sowie ihre Rezeptoren auch in extrahypothalamischen, vor allem limbischen Hirnarealen vorhanden und dort als Neurotransmitter oder Neuromodulatoren in die Regulation von emotionalem Verhalten miteinbezogen (Ebner, Wotjak et al. 1999).



**Abb. 1.1:** Überblick über das **HPA-** und das **HNS-**System (mit Modifikationen übernommen aus Landgraf et al., 1998). Die Ziffern in der Abbildung entsprechen der Nummerierung im Text.

## 1.2 HPA-Achsen-Veränderungen bei Depression

Veränderungen des HPA-Systems gehören zu den am besten dokumentierten neuroendokrinen Veränderungen bei der „Major Depression“ (Holsboer 1995; Holsboer and Barden 1996; Scott, Medbak et al. 1998), zudem korrelieren die Aktivität des HPA-Systems und die Wahrscheinlichkeit an einer Depression zu erkranken (Holsboer 1999). Klinisch zeigt sich bei Patienten eine verminderte Supprimierbarkeit von ACTH und Kortisol nach Gabe des synthetischen Glukokortikoids Dexamethason (DEX) sowie eine paradox erhöhte Freisetzung von ACTH und Kortisol im kombinierten DEX/CRH-Test (Holsboer 2000; Ising, Kunzel et al. 2005).

Innerhalb dieses präzise abgestimmten neuroendokrinen Regelkreises stimuliert CRH synergistisch mit AVP an den kortikotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens die Freisetzung von ACTH, welches wiederum die Sekretion von Kortisol an der Nebennierenrinde bewirkt (Abbildung 1.1). Über einen negativen Rückkopplungsmechanismus hemmt Kortisol unter physiologischen Bedingungen die Synthese von CRH auf der Ebene des Hypothalamus. Zwei

unterschiedliche CRH-Rezeptor-Subtypen vermitteln die Wirkung von CRH am Hypophysenvorderlappen und in selektiven Gehirnarealen: CRH-Rezeptor Typ 1 (CRHR1) und CRH-Rezeptor Typ 2 (CRHR2). Hauptverantwortlich für die Vermittlung der Effekte von CRH auf das HPA-System (neuroendokrine Effekte) und auf angstassoziiertes Verhalten ist CRHR1 (Liebsch, Landgraf et al. 1995; Holsboer 1999; Keck and Holsboer 2001; Keck, Welt et al. 2001).

Während einer schweren Depression werden bei 50-70 % der Patienten erhöhte CRH-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis sowie eine erhöhte Cortisolkonzentration im Blut gefunden. Auf der Grundlage dieser klinischen Befunde wurde die „CRH-Hypothese der Depression“ (Nemeroff 1996; Keck and Holsboer 2001) entwickelt. Diese steht für die Annahme, dass eine Überexpression des Neuropeptids CRH im zentralen Nervensystem zum einen die typischen Beschwerden der Depression auslöst, andererseits aber auch verantwortlich ist für die miteinhergehende Überstimulation des neuroendokrinen Systems. Weitere Hinweise hierfür ergaben sich aus *post-mortem* Untersuchungen an Gehirnen depressiver Patienten. So konnte bei diesen im hypothalamischen Nucleus paraventricularis (PVN) sowie im Locus coeruleus eine signifikant erhöhte Expression von CRH nachgewiesen werden (Austin, Janosky et al. 2003). Neben CRH spielt auch die hypothalamische Überexpression von AVP, einem weiteren hypothalamischen Neuropeptid, eine wichtige Rolle bei der Depressions-assoziierten Dysregulation des Stresshormonsystems (Keck, Wigger et al. 2002).

Die Wirkung von CRH wird durch Vasopressin, welches nach prolongiertem Stress und im Alter sowohl beim Menschen als auch beim Nagetier aus CRH-Neuronen im Hypothalamus vermehrt coexpressiert und freigesetzt wird, moduliert (Antoni 1993; Tilders, Schmidt et al. 1993; Hatzinger, Wotjak et al. 2000; Keck, Hatzinger et al. 2000). Entsprechend ließ sich auch im Hypothalamus depressiver Patienten eine erhöhte Anzahl von CRH-Neuronen, die AVP-mRNA koexpressieren, nachweisen (Raadsheer, Sluiter et al. 1993; Purba, Hoogendijk et al. 1996). Man nimmt an, dass die übermäßige Freisetzung von CRH und AVP in das Portalblut der Hypophyse die Freisetzung von ACTH aus den kortikotropen Zellen der Hypophyse und somit auch die Freisetzung von Kortikosteroiden aus der Nebennierenrinde erhöht (Scott and Dinan 2002).

Klinische Verlaufsstudien haben zudem gezeigt, dass sich die pathologische Überaktivität des HPA-Systems zeitlich bereits vor dem Eintritt der klinischen

Besserung der depressiven Erkrankung normalisiert. Ferner gibt es Hinweise dafür, dass das Wiederauftreten oder die Persistenz der HPA-Dysregulation mit einem erhöhtem Risiko für ein Wiederauftreten der Depression behaftet ist (Holsboer 2000; Keck and Holsboer 2001). Ein weiterer, sehr wichtiger Hinweis für eine kausale Bedeutung der HPA-Dysregulation in der Entstehung und Aufrechterhaltung affektiver Erkrankungen ist der Befund, dass eine erfolgreiche antidepressive Pharmakotherapie zu einer Modulation und Normalisierung des dysregulierten neuroendokrinen Systems führt (Holsboer and Barden 1996; Kunzel, Binder et al. 2003; Ising, Kunzel et al. 2005).

In diesem Kontext konnten Veränderungen von ACTH- und Kortisol/Kortikosteron-Plasmakonzentrationen durch antidepressive Substanzen sowohl beim Menschen als auch im Tierexperiment nachgewiesen werden (Reul, Stec et al. 1993; Reul, Labeur et al. 1994; Heuser, Schweiger et al. 1996; Holsboer and Barden 1996).

### **1.3 HPA-System und Dex/CRH-Test**

Neuroendokrinologische Studien deuten darauf hin, dass eine Hyperaktivität der zentralen Freisetzung von CRH und AVP, welche zu einer charakteristischen peripher messbaren Dysregulation des HPA-Systems führt, eine ursächliche Rolle für die Symptomatologie von Affekt- und Angsterkrankungen spielt (Keck and Holsboer 2001). In diesem Zusammenhang wurden einige Veränderungen der Regulation des HPA-Systems bei der Major Depression nachgewiesen, darunter ein vermindertes negatives Feedback des HPA-Systems, basale Hyperkortisolämie, verminderte Suppression des HPA-Systems durch das synthetische Kortikosteroid Dexamethason und paradoxe Stimulation der Freisetzung von ACTH durch CRH nach Vorbehandlung mit Dexamethason (Holsboer and Barden 1996; Holsboer 2000). Bei der Depression hat sich der kombinierte Dex/CRH-Test, bei welchem mit Dexamethason oral vorbehandelte Probanden eine einzelne Dosis CRH intravenös verabreicht bekommen, als der sensitivste Test zur Abbildung einer veränderten Regulation des HPA-Systems erwiesen. Abhängig von Alter und Geschlecht zeigen bis zu 90% der depressiven Patienten neuroendokrine Veränderungen (Heuser, Yassouridis et al. 1994). Ferner stimmen die Resultate aus Studien, die den Dex/CRH-Test gebrauchen, nicht nur damit überein, dass eine Normalisierung der ursprünglichen Dysregulation dem Ansprechen auf eine Therapie vorausgeht, sondern untermauern auch die Annahme, dass eine persistierende Abnormalität des

HPA-System mit Chronizität und Wiederauftritt der Erkrankung korrelieren (Heuser, Schweiger et al. 1996; Zobel, Yassouridis et al. 1999; Kunzel, Binder et al. 2003). Da die Aktivierung von Kortikosteroidrezeptoren die Synthese und Freisetzung von CRH und ACTH aus dem PVN im Hypothalamus unterdrücken (De Kloet, Vreugdenhil et al. 1998), stehen diese Ergebnisse in einer Linie mit der Hypothese der funktionell gestörten Signaltransduktion der Kortikosteroidrezeptoren sowohl bei depressiven Patienten (Modell, Yassouridis et al. 1997) als auch bei gesunden Personen mit einem genetischen Risiko für Depression (Holsboer 1995; Modell, Lauer et al. 1998; Holsboer 2000).

#### **1.4 Selektiv gezüchtete HAB/LAB-Tiere und der Dex/CRH-Test**

Da die Mechanismen, die der abnormen Reaktivität des HPA-Systems bei Patienten mit psychiatrischen Störungen zugrunde liegen, nicht vollständig geklärt sind, bedarf es Untersuchungen an geeigneten Tiermodellen um den vermuteten Zusammenhang zwischen diesen Erkrankungen und Veränderungen in der Regulation des HPA-Systems weiter aufzudecken. Nach mehreren Generationen selektiver Züchtung gelang es am Max Planck-Institut für Psychiatrie zwei Wistar Rattenzuchtlinien zu etablieren, die sich deutlich und konstant bezüglich ihrer angeborenen Emotionalität unterscheiden (Liebsch, Linthorst et al. 1998; Liebsch, Montkowski et al. 1998; Landgraf and Wigger 2002). Diese Tiere wurden auf der Elevated Plus-Maze (EPM), einem der am häufigsten genutzten, unkonditionierten Angsttests für Nagetiere, nach starkem (high anxiety-related behaviour, HAB) beziehungsweise niedrigem Angstverhalten (low anxiety-related behaviour, LAB) selektiert. Die Männchen und Weibchen dieser zwei Zuchtlinien unterscheiden sich jedoch nicht nur in ihrem angeborenen Angstverhalten, wie verschiedene Verhaltenstests zeigten (Liebsch, Montkowski et al. 1998; Henninger, Ohl et al. 2000; Ohl, Toschi et al. 2001), sondern auch bezüglich ihrer Stressbewältigungsstrategien: HAB-Ratten zeigen eine ausgesprochen passivere Stressbewältigung beim Forced Swim-Test (Liebsch, Montkowski et al. 1998; Keck, Welt et al. 2001). Dem Forced Swim-Test wird ein prädiktiver Wert für die klinische Wirksamkeit einer antidepressiven Behandlung bei Menschen zugesprochen (Lucki 1997), folglich ist es das passive Stressbewältigungsverhalten, das die HAB-Tiere zu einem wertvollen Modell zur Untersuchung von potentiell antidepressiven Behandlungsstrategien macht. Interessanterweise geht die starke Emotionalität der HAB-Tiere mit einer erhöhten

Anfälligkeit des HPA-Systems gegenüber externen Stressoren einher (Landgraf, Wigger et al. 1999; Landgraf and Wigger 2002). Daher stellen die HAB-Tiere, die mehrere charakteristische Symptome und Veränderungen, die auch bei Angsterkrankungen und Depression zu finden sind, widerspiegeln, ein gutes Tiermodell dar, um neuroendokrine Veränderungen zu untersuchen.

In den letzten Jahren konnten wir in unserem Labor den Dex/CRH-Test bei Ratten etablieren und charakteristische Veränderungen bei Alterungsprozessen nachweisen (Hatzinger, Reul et al. 1996; Hatzinger, Wotjak et al. 2000; Keck, Hatzinger et al. 2000). Nun untersuchten wir die Freisetzung von ACTH und Kortikosteron während des Dex/CRH-Tests bei HAB- und LAB-Ratten. Zusätzlich charakterisierten wir die basale AVP-mRNA-Expression und die basale Freisetzung von AVP im PVN mit Hilfe von *in situ* Hybridisierung und *in vivo* Mikrodialyse. Um die Rolle von endogenem AVP in der Regulation des HPA-Systems weiter zu ergründen, prüften wir den Einfluss eines selektiven AVP Typ 1 ( $V_1$ ) Rezeptorantagonisten auf die Ausschüttung von ACTH und Kortikosteron während des Dex/CRH-Tests. Zusätzlich maßen wir die maximale Bindungskapazität ( $B_{max}$ ) und die relative Bindungsaffinität ( $K_d$ ) von Mineralokortikoid- (MR) und Glukokortikoidrezeptoren (GR) im Gehirn und der Hypophyse um zu klären, ob Veränderungen dieser Rezeptoren mit möglichen Defekten des kortikosteroiden Feedbacks eine Rolle in der veränderten Regulation des HPA-Systems in diesem Tiermodell spielen.

## 1.5 HAB/LAB-Tiere und Paroxetin

Wenn man annimmt, dass die Normalisierung einer gestörten Regulation des HPA-Systems ein essentieller Mechanismus antidepressiver Medikamente ist (Holsboer 2000), stellt sich die Frage, welche molekularen Mechanismen dieser Veränderung zugrunde liegen. Da die Genexpression von CRH und AVP der Regulation durch Glukokortikoide unterliegt, wird vermutet, dass bei der Major Depression die kortikosteroidale Signaltransduktion gestört ist und durch Behandlung mit antidepressiven Medikamenten verbessert wird (Holsboer and Barden 1996; Ma and Aguilera 1999; Holsboer 2000). Im Gegensatz zu CRH, dessen Genexpression durch Antidepressiva vermindert wird, konnte dies für AVP und seine Rezeptoren bisher nur in einer Studie *in vitro*, aber nicht *in vivo* gezeigt werden (Brady, Whitfield et al. 1991; Altemus, Cizza et al. 1992; Butterweck, Winterhoff et al. 2001; Stout, Owens et al. 2002). Deshalb untersuchten wir den Einfluss von Paroxetin, einem selektiven

Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, der in der Klinik zur Behandlung der Major Depression verwendet wird, auf die Neuroendokrinologie und das Verhalten im Tiermodell der HAB- und LAB-Ratten, welche neuroendokrine und psychopathologische Veränderungen der Depression widerspiegeln und somit phänotypische, Konstrukt- und prädiktive Validität vereinen (Landgraf and Wigger 2002).

## 1.6 Paroxetin und Serotonin

Sowohl das serotonerge System als auch die HPA-Achse spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von ängstlichem und depressionsähnlichem Verhalten (Holsboer 2000; Millan 2003; Porter, Gallagher et al. 2004), die beiden Systeme stehen in engem funktionellen Zusammenhang und Funktionsstörungen in einem führen zu Fehlfunktionen im anderen (Dinan 1994; McAllister-Williams, Ferrier et al. 1998). Die zentrale Synthese und Freisetzung von Serotonin wird durch Glukkokortikoide reguliert. Die nicht unumstrittene Indolaminhypothese affektiver Erkrankungen wird durch klinische Studien gestützt, die eine gestörte Serotoninfreisetzung bei Gemüts- und Angsterkrankungen nachweisen konnten (Mongeau, Blier et al. 1997; Ressler and Nemeroff 2000; Nemeroff and Owens 2004). Tierstudien zeigten, dass die zentrale serotonerge Neurotransmission stressabhängig ist (Price, Curtis et al. 1998; Price and Lucki 2001; Linthorst, Penalva et al. 2002). Der dorsale Hippocampus, welcher serotonergen Input aus den medianen Raphékernen (MnR) des Mittelhirns erhält, spielt nicht nur für Angst und Depression eine wichtige Rolle, sondern auch für die Koordination von neuroendokriner und Verhaltensreaktion auf Stress (López, Chalmers et al. 1998; Meijer and de Kloet 1998; File, Kenny et al. 2000). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass sich die Muster neuronaler Aktivierung im Hippocampus nach Exposition auf dem offenen Arm der EPM zwischen HAB- und LAB-Tieren unterscheiden (Salome, Salchner et al. 2004). Auch Langzeiterhöhungen von CRH mit nachfolgender Hyperaktivität des HPA-Systems führten zu einer verminderten Reaktion der serotonergen Ausschüttung im dorsalen Hippocampus auf einen akuten Stressstimulus (Linthorst, Flachskamm et al. 1997).

Um weitere Einblicke in die bidirektionale Interaktion zwischen HPA-Achse und Serotonin im Hippocampus zu gewinnen, untersuchten wir den Einfluß von chronischer Paroxetinbehandlung auf die serotonerge Neurotransmission im dorsalen Hippocampus mit Hilfe von *in vivo* Mikrodialyse. Da die Expression des

meistverbreiteten Serotoninrezeptors im dorsalen Hippocampus, dem 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor, durch die Aktivität der HPA-Achse beeinflusst wird (Chalmers, Kwak et al. 1993; Meijer, VanOosten et al. 1997; López, Chalmers et al. 1998), führten wir außerdem eine *in situ* Hybridisierung durch, um mögliche Unterschiede zwischen Paroxetin- und scheinbehandelten HAB- und LAB-Ratten aufzudecken. Zusätzlich untersuchten wir die Expression von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor mRNA im dorsalen Raphékern (DR) und im MnR, welche die Hauptquellen der serotonergen Innervation des Vorderhirns darstellen. Da Paroxetin den Serotonintransporter (SERT) blockiert, interessierte uns die SERT-mRNA und die Bindungsstellen im Hippocampus, DR und MnR bei behandelten und unbehandelten HAB- und LAB-Tieren. Um einen maximalen „therapeutischen“ Effekt zu erreichen, wurden die Tiere über 10 Wochen mit Paroxetin behandelt.

## **1.7 Repetitive transkranielle Magnetstimulation (rTMS)**

Die transkranielle Magnetstimulation (TMS) ist eine nicht-invasive und schmerzlose Methode, die erstmals 1985 in die klinisch-neurophysiologische Diagnostik eingeführt wurde (Barker and Jalinous 1985). Die Stimulation des motorischen Kortex ruft ab einer individuellen Stimulationsschwelle eine peripher-motorische Antwort in Form von Muskelaktivität hervor und ermöglicht ein gezieltes Brainmapping des motorischen Kortex sowie die Messung seiner neuronalen Konnektivität und Erregbarkeit. Ferner ermöglicht TMS die Bestimmung der zentral-motorischen Leitungszeit kortikofugaler Bahnen sowie der Latenz und Amplitude motorisch evozierter Potentiale definierter Muskeln (Goldman and Nahas 2000). Während bei der Einführung der TMS-Methode 1985 nur die Stimulation mit einzelnen Impulsen (single-pulse) technisch möglich war, können heute Reizserien mit einer Frequenz von bis zu 100 Hz (repetitive-pulse) verabreicht werden. Dies eröffnete neue Möglichkeiten für den klinischen Einsatz sowie die Erforschung der Wirkungsweise der TMS, da offensichtlich einige Wirkungen nur nach repetitiver Stimulation, vermutlich durch kumulative exzitatorische bzw. inhibitorische Effekte, nachgewiesen werden können (Pascual-Leone, Tarazona et al. 1999). Die derzeit üblicherweise angewandte Stimulation liegt im Frequenzbereich von 1-30 Hz.

Definitionsgemäß wird von hochfrequenter, repetitiver TMS (rTMS) gesprochen, wenn Reizserien (>2 Reize) von mehr als 1Hz mit konstantem Interstimulus-Intervall verabreicht werden (Konsensuskonferenz NINDS, Washington, 1996). Reizserien bis

1 Hz bezeichnet man als serielle rTMS. Die Funktionsweise der rTMS basiert auf dem 1831 beschriebenen Prinzip der elektromagnetischen Induktion (Faraday, 1831). Angewendet auf rTMS, wird durch ein sich rasch änderndes Magnetfeld in der Umgebung einer stromdurchflossenen Stimulatorspule ein elektrisches Feld im Kortex induziert. Je schneller sich das induzierte Magnetfeld ändert, um so stärker ist der Reizeffekt. Die Stärke des induzierten elektrischen Stroms ist direkt proportional der magnetischen Flussdichte in der Reizspule. Der Reizeffekt auf neuronale Strukturen kommt hierbei nicht durch das Magnetfeld selbst sondern durch die im Gewebe induzierten Ströme zustande. Die lokale Stromdichte und die Leitfähigkeit des betroffenen Gewebes bestimmen die Ausbreitung des Stroms in der Umgebung (Cerri, De Leo et al. 1995). Anhand Kernspintomographie(MRI)-basierter Berechnungen mit Berücksichtigung der Gewebeleitfähigkeit können die durch rTMS induzierten Stromdichteverteilungen im Gewebe dargestellt werden, z.B. bei linksfrontaler Stimulation an Ratten in Abb. 3.1. (Post and Keck 2001; Keck 2003).

Die Fähigkeit des induzierten Stroms, neuronale Erregung hervorzurufen, hängt von dem zeitlichen Einfall des Stroms, der Stromrichtung und der Stromstärke ab. Zunächst kommt es zum transmembranösen Ladungsaustausch mit Verschiebung des Membranpotentials über die Depolarisationsschwelle, wodurch ein Aktionspotential ausgelöst wird. Anschliessend breitet sich die Erregung entlang der transsynaptischen Verbindungen aus. Die für die präklinische und klinische Forschung erforderliche Intensität der rTMS-Applikation wird nach deren biologischer Effizienz bemessen (Wassermann, Pascual-Leone et al. 1993) und jeweils in Prozent der Schwelle zur Auslösung motorischer Potentiale, die an kleinen Handmuskeln im relaxierten Zustand gemessen werden, angegeben (Rossini, Barker et al. 1994). Inwiefern die Schwelle für die Erregung des motorischen Kortex jedoch mit der neuronalen Erregung in anderen Bereichen des Gehirns korreliert, ist nicht bekannt. Die motorische Schwelle kann auch in Tierstudien bestimmt werden (Müller, Toschi et al. 2000). Der induzierte Strom kann sowohl exzitatorisch als auch inhibitorisch auf die jeweilige Kortexregion wirken und somit Hirnregionen auch in ihrer Funktion hemmen. Dieses Prinzip wird auch zur Untersuchung höherer Hirnfunktionen verwendet (Pascual-Leone, Valls-Sol\* et al. 1994; Hallett 2000).

Die Reizgeräte sind mit relativ fokalen achtförmigen oder nichtfokalen runden Reizspulen ausgerüstet (Saypol et al. 1991). Je nach Stimulator und verwendeter Reizspule betragen die auftretenden maximalen magnetischen Flußdichten bis zu 2

Tesla. Der induzierte Strom hängt dabei vom Abstand der Reizspule zum Kopf sowie ihrer genauen Position ab (De Leo, Cerri et al. 1992).

Anfangs wurde rTMS hauptsächlich in der klinischen Diagnostik für den Nachweis von demyelinisierenden Läsionen der Pyramidenbahn, z.B. bei Multipler Sklerose oder Myelopathien, eingesetzt. In den letzten 10 Jahren entwickelte sich die rTMS zu einem wichtigen Instrument in der neurologisch-psychiatrischen Forschung und Therapie. Das experimentelle Anwendungsspektrum der Magnetstimulation umfasst mittlerweile Erkrankungen wie Depression, Schizophrenie, Parkinson-Syndrome, Migräne und chronische Schmerzsyndrome (Pascual-Leone, Catalá et al. 1996; George, Lisanby et al. 1999; McNamara, Ray et al. 2001; Padberg and Möller 2003; Chang 2004). Im Mittelpunkt der Forschung stehen derzeit die stimmungsaufhellenden Effekte der kortikalen, meist linkspräfrontalen Stimulation bei Patienten mit schwergradiger Depression (major depression) (George, Lisanby et al. 1999; Gershon, Dannon et al. 2003). In einigen Studien zeigte sich die Behandlung mit rTMS der Elektrokrampftherapie bezüglich der antidepressiven Wirksamkeit ebenbürtig (Grunhaus, Schreiber et al. 2003; Fitzgerald 2004). Welche neurobiologischen Wirkmechanismen für die klinische Besserung der depressiven Patienten eine Rolle spielen, ist bisher nicht genau bekannt. Vorliegende Studien aus dem Bereich der tierexperimentellen Neuroendokrinologie und Verhaltensforschung weisen auf eine Beeinflussung von neuronalen Schaltkreisen im Bereich der HPA-Achse hin (Keck, Engelmann et al. 2000; Keck, Welt et al. 2001; Post and Keck 2001; Hedges, Salyer et al. 2002). Zusätzliche Effekte konnten im Tiermodell auch auf der molekularen und zellulären Ebene (Post, Muller et al. 1999; Müller, Toschi et al. 2000) sowie bei depressiven Patienten unter anderem im Bereich der Hirndurchblutung nachgewiesen werden (Nahas, Lomarev et al. 2001). In vorhergehenden Studien in unserem Laboratorium konnten wir zeigen, dass links präfrontale rTMS mit 20 Hertz selektiv die dopaminerge Neurotransmission moduliert und keinen Einfluss auf die Freisetzung der Monoamine Serotonin und Noradrenalin hat (Keck, Welt et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Auswirkungen einer Behandlung mit rTMS auf das Verhalten und das HPA-System anhand des psychopathologischen Tiermodells der HAB- und LAB-Ratten.

## 1.8 Prinzip des Forced Swim-Tests

Veränderungen der Freisetzung von AVP, ACTH und Kortikosteron sind während eines ethologisch relevanten Stressors deutlicher als unter Basalbedingungen zu beobachten. Besonders geeignet ist dazu der Schwimmstressor, das „Forced swimming“, da es sich hierbei um einen kombiniert emotional/physischen Stressor handelt (West 1990; Abel 1994; Wotjak, Kubota et al. 1996): Eine starke emotional-psychische Komponente durch den vermeintlichen Überlebenskampf ist gepaart mit einer ausgeprägt physisch-körperlichen Anstrengung des Tieres. Das Verhalten der Ratte im Forced Swim-Test kann gut beobachtet und in drei Verhaltensweisen differenziert werden: „Struggling“, „Swimming“ und „Floating“, „Struggling“ und „Swimming“ stellen eher aktive Bewältigungsstrategien dar, während „Floating“ (= passives Treiben) im Sinne eines passiven Bewältigungsverhaltens interpretiert werden kann (Liebsch, Linthorst et al. 1998; Keck, Engelmann et al. 2000). Eingeführt wurde das „Forced swimming“ von Porsolt zur Untersuchung der Wirkung trizyklischer antidepressiver Medikamente (Porsolt, Le Pichon et al. 1977): Die Abnahme des passiven Stressbewältigungsverhaltens des Floating korreliert mit der klinischen Wirkung antidepressiver Substanzen (Porsolt, Le Pichon et al. 1977; Borsini and Meli 1988). Andere Wissenschaftler interpretieren dagegen in modifizierten Testversionen eher die Steigerung der aktiven Bewältigungsstrategien, insbesondere des Struggling, als einen deutlicheren Hinweis auf die klinische Wirkung von Antidepressiva (West 1990; Lucki 1997; Keck, Welt et al. 2001), denn die Immobilität des Floating ist von Lern- und Gedächtniseffekten beeinflusst (West 1990), insbesondere bei wiederholter Durchführung, wie in der Originalversion des Tests (Porsolt, Le Pichon et al. 1977). Intrazerebral triggert das „Forced swimming“ innerhalb hypothalamischer Kerngebiete (Nucleus supraopticus, Nucleus paraventricularis) die Freisetzung von AVP, ohne dass jedoch AVP in die systemische Zirkulation freigesetzt wird (Wotjak, Kubota et al. 1996; Wotjak, Kubota et al. 1996; Wotjak, Ganster et al. 1998; Engelmann, Wotjak et al. 2000; Engelmann and Ludwig 2004).

## 1.9 Neurogenese

Im Hippocampus verschiedener Säugetiere und auch des Menschen teilen sich während des gesamten Lebens Vorläuferzellen im Gyrus dentatus und differenzieren sich zu reifen Neuronen und Gliazellen aus (Eriksson, Perfilieva et al. 1998; Gross 2000; Van Praag, Schinder et al. 2002). Die adulte Neurogenese ist ein dynamischer Prozess, der durch neuronale Aktivität und Umweltfaktoren sowohl in positiver als auch in negativer Weise beeinflusst wird (Gould and Fuchs 2000). Da auch psychotrope Medikamente und Stressexposition die Neurogenese im adulten Hippocampus beeinflussen, wurde postuliert, dass die Neurogenese eine wichtige Rolle sowohl in der Pathophysiologie als auch der Behandlung neurobiologischer Erkrankungen wie z.B. Depression und posttraumatische Belastungsstörung spielt (Duman, Malberg et al. 1999; Malberg 2004).

Das Ziel dieser Studie war, herauszufinden, ob eine begleitende Behandlung mit rTMS einen positiven, stimulierenden Effekt auf die durch psychosozialen Stress verminderte Proliferation und/oder das Überleben der neu generierten Neurone im Gyrus dentatus des Hippocampus hat. Da die Proliferation und das Überleben der Körnerzellen in hohem Maße von der Konzentration der zirkulierenden Glukokortikoide abhängt, wurde zusätzlich der Einfluss von rTMS auf das HPA-System, beziehungsweise die Plasmakonzentrationen von ACTH und Kortikosteron untersucht.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Tiere und Tierhaltung**

#### **2.1.1 Normale Wistar Ratten**

Als Versuchstiere dienten junge männliche Wistar Ratten, die von einem kommerziellen Anbieter (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden (Alter: 3-4 Monate; n = 144). Nach Anlieferung hatten die Tiere im Durchschnitt 7 Tage Zeit, sich im Tierstall des Instituts einzugewöhnen. Sie wurden in Gruppen zu 6 Tieren unter Standardbedingungen (Temperatur  $22 \pm 2$  °C, Luftfeuchtigkeit  $60 \pm 5$  %, 12 h Licht-/12 h Dunkel-Zyklus, wobei das Licht um 7.00 Uhr eingeschaltet wurde) mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Die Ratten wogen zum Zeitpunkt der Operation zwischen 250 und 400 g. Nach der Operation wurden die Tiere einzeln in Plexiglaskäfige (23 x 39 x 36 cm) gesetzt. Bis zum Versuchsbeginn hatten sie dann 3 Tage Zeit sich zu erholen und an ihren neuen Käfig zu habituieren. Alle Versuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

#### **2.1.2 HAB/LAB-Tiere**

Alle Tiere wurden im Tierstall des Instituts unter Standardbedingungen (Temperatur  $22 \pm 2$  °C, Luftfeuchtigkeit  $60 \pm 5$  %, 12 h Licht-/12 h Dunkel-Zyklus, wobei das Licht um 7.00 Uhr eingeschaltet wurde) mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Die selektive Züchtung von ängstlichen und nicht-ängstlichen Ratten wurde im Jahr 1993 begonnen. Dazu wurden Tiere aus einer Population von kommerziell erworbenen Wistar-Ratten (Charles River, Sulzfeld) aufgrund ihrer Verhaltensleistung im Elevated plus-maze-Test ausgewählt. Diejenigen Männchen und Weibchen, die sich in diesem Test am meisten bzw. am wenigsten ängstlich zeigten, wurden als Zuchtpaare zur Etablierung der HAB-Linie (High Anxiety-related Behaviour; hohe Angstdisposition) und der LAB-Linie (Low Anxiety-related behaviour; niedrige Angstdisposition) ausgewählt. Je zwei bis drei Elternpaare pro Linie und Generation wurden paarweise in Zuchtkäfigen (56 x 36 x 20 cm) gehalten. Die Jungen aus jeder dieser Zuchtboxen wurden im Alter von circa drei Wochen von ihren Eltern getrennt und in gleichgeschlechtlichen Gruppen von maximal sechs Tieren pro Käfig gehalten. Alle äußeren Einflüsse (Käfigbewegung, Lärm etc.) und

Berührungen der Tiere wurden auf ein Minimum begrenzt und in beiden Linien strikt parallel durchgeführt. Mit 10 Wochen wurden alle Nachkommen aus den beiden Zuchtlinien dem Elevated plus-maze-Test unterzogen und wiederum jeweils die Tiere mit den insgesamt extremsten Verhaltensleistungen verpaart. HAB-Ratten, die ein niedriges Angstniveau zeigten, LAB-Ratten, die sich ängstlich erwiesen, sowie Tiere mit durchschnittlichen Leistungen wurden von weiteren Versuchen und von der Zucht ausgeschlossen.

## **2.2 Verwendete Substanzen und Applikationsformen**

### **2.2.1 Paroxetin**

Paroxetin (Glaxo SmithKline, Harlow, UK) ist ein transisomeres Phenylpiperidin, dessen primärer Wirkmechanismus in der Hemmung der Wiederaufnahme von Serotonin in neuronale Zellen liegt und hierdurch antidepressive Eigenschaften aufweist. Die Versuchstiere wurden über einen Zeitraum von insgesamt zehn Wochen mit Paroxetin behandelt. Die Aufnahme erfolgte über das Trinkwasser, welches mit Paroxetin in einer Konzentration von 75 mg/l versetzt war. Durch Wiegen der Trinkwasserflaschen beim täglichen Wiederauffüllen ließ sich eine durchschnittliche Paroxetinaufnahme von 5mg/kg KG pro Tag errechnen.

### **2.2.2 Repetitive Transkranielle Magnetstimulation**

Für die Experimente wurde ein kommerzielles Stimulationsgerät verwendet (MagPro® der Firma DANTEC, Skovlunde, Dänemark). Die Impulsbreite des biphasisch konfigurierten Stimulus betrug 280  $\mu$ s. Die Stimulationsintensität wurde in A/ $\mu$ s gemessen. Der durch uns verwendete Prototyp einer runden Stimulationsspule (S60, DANTEC) hatte folgende Maße: innerer Durchmesser 6 mm, äußerer Durchmesser 57 mm; 21 Windungen, Windungshöhe 7 mm, Kabellänge 1,40 m.

Jede HAB- und LAB-Ratte erhielt 1000 Stimuli, resultierend aus 20 Stimulationsdurchgängen. Der maximale Induktionsmodulus mit einer Frequenz von 20 Hz für 2,5 s betrug dabei 4 Tesla (120 A/ $\mu$ s; 130% der motorischen Schwelle bei Ratten; (Müller, Toschi et al. 2000). Diese Stimulationsparameter wurden gemäss Kernspintomographie-basierter, computergestützter Berechnungen der intrazerebralen Stromdichte gewählt (Keck, Engelmann et al. 2000; Keck, Sillaber et al. 2000; Keck, Welt et al. 2001). Um klinische Standardbedingungen nachzuahmen

(Pascual-Leone, Catalá et al. 1996), wurde die Stimulationsspule gemäss der Angaben des Atlas von Green (1963) über dem linken frontalen Kortex (d.h. über dem linken Auge der Ratte), platziert. Die Stimulationsspule hatte direkten Kontakt zum Kopf der Tiere. Um Hitzeschäden an der Stimulationsspule zu vermeiden, musste nach jeder Stimulation ein Kühlintervall von 2,5 Minuten eingelegt werden. Die Spule wurde mit Hilfe von Trockeneis auf jeweils 15 C° abgekühlt. Aufgrund direkter Aktivierung der Muskulatur war bei den Tieren der rTMS Gruppe (Experiment 1: HAB n = 11; LAB n = 9; Experiment 2: HAB n = 6; LAB n=6) während der Stimulation ein leichter Tremor des Kopfes zu beobachten. Die Tiere der Kontrollgruppe (Experiment 1: HAB n = 11; LAB n =10; Experiment 2: HAB n =6; LAB n =6) erfuhren, dadurch dass die Stimulationsspule senkrecht 10 cm über ihrem Kopf positioniert wurde, die gleichen akustischen Artefakte wie die Tiere der Stimulationsgruppe. Die Tiere wurden in zwei Serien à drei Tagen, unterbrochen von vier Tagen Pause, behandelt. In einer Pilotstudie zeigten nicht habituierte, erwachsene Ratten, die das gleiche Stimulationsprotokoll durchliefen, anschließend klare Anzeichen unspezifischen Stresses, wie zum Beispiel lokomotorische Hyperaktivität und aggressives Verhalten. Da aufgrund des experimentellen Protokolls erwachsene Tiere benutzt werden mussten, wodurch die Möglichkeit einer Adaptation der Tiere an die Stimulation durch intensives Training wegfiel, wurden alle Tiere, sowohl die der rTMS- als auch die der Scheinbehandlungsgruppe, während der Behandlung anästhesiert. Hierzu wurde das Inhalationsanästhetikum Halothan benutzt um die Tiere via Maske während der einstündigen Stimulation sediert zu halten. Die Betäubung wurde relativ flach gehalten und der Kornealreflex regelmäßig überprüft um sicherzustellen, dass dieser kontinuierlich erhalten blieb. Die Körpertemperatur wurde mit einer Kolonsonde überwacht und mit Hilfe eines elektrischen Heizkissens konstant bei 37,5 °C gehalten.

## **2.3 Verhaltenstestung**

### **2.3.1 Elevated Plus-Maze**

Dieser Test, der ursprünglich zur Untersuchung von anxiolytischen bzw. anxiogenen Eigenschaften von Pharmaka entwickelt wurde (Pellow, Chopin et al. 1985), beruht auf dem inneren Konflikt der Versuchstiere zwischen ihrem Explorationsdang auf der einen und der angeborenen Aversion gegenüber offenen, hellen und erhöhten Kompartimenten auf der anderen Seite. Die Apparatur aus dunkelgrauem PVC

bestand aus vier Armen (jeder 50 cm lang und 10 cm breit), von denen zwei gegenüberliegende durch Seiten- und Endwände (38 cm hoch) begrenzt, die beiden anderen ohne Begrenzung waren. Die Verbindung der Armpaare wurde durch eine 10 x 10 cm große „neutrale Zone“ gewährleistet. Diese als symmetrisches Kreuz angeordnete Versuchsanordnung befand sich 73 cm über dem Boden. Die Lichtintensität direkt über dieser Apparatur betrug ca. 100 Lux. Um zu verhindern, dass die Tiere während des Tests durch den Experimentator gestört werden, wurde ein Vorhang um die Apparatur gezogen. Mit Hilfe einer Videokamera, die über dem Zentrum der Apparatur angebracht und mit einem Computer verbunden war, konnte das Verhalten der Tiere aufgezeichnet und ausgewertet werden. Der Versuch begann mit der Exposition des Tieres auf die neutrale Zone der Apparatur. Während der fünfminütigen Expositionszeit erfolgte die Erfassung folgender Parameter: (1) die Anzahl der Eintritte in die geschlossenen und offenen Arme, (2) die jeweils darin verbrachte Zeit und (3) die Latenz bis zum ersten Eintritt in einen offenen Arm. Als Eintritt galt, wenn sich das Tier mit beiden Vorderpfoten innerhalb des jeweiligen Armes befand. Nach dem Ende der Expositionszeit wurde die Ratte wieder in den Heimkäfig gesetzt. Die Apparatur wurde vor jeder Exposition gründlich mit einer desinfektionsmittelhaltigen Lösung gereinigt, um mögliche Geruchsspuren zu beseitigen.

### **2.3.2 Forced Swim-Test**

„Forced swimming“ stellt ein ethologisch relevantes und komplexes Stressmodell dar, das nicht nur eine starke physische Belastung darstellt, sondern auch eine ausgeprägt emotional-psychische Komponente beinhaltet (West 1990; Abel 1994). Es ist außerdem validiert für die Erfassung der Wirksamkeit antidepressiver Therapieverfahren wie die Gabe von Antidepressiva und Elektrokrampftherapie. Es besteht allgemeine (Porsolt, Le Pichon et al. 1977; Borsini and Meli 1988; Lucki 1997) Übereinstimmung, dass bei diesem Test eine gesteigerte Aktivität („Swimming“, „Struggling“) eine aktive Bewältigungsstrategie widerspiegelt, während eine erhöhte Immobilität („Floating“) hinweisend für ein passives Bewältigungsverhalten ist (Lucki et al. 1997). Das Versuchstier wurde aus dem Heimkäfig herausgenommen und für 5 Minuten in einen mit 23 °C warmen Wasser gefüllten Schwimmbottich (50 cm hoher Plexiglaszylinder, Durchmesser: 30 cm) gesetzt. Der Bottich war bis auf 40 cm mit Wasser gefüllt. Somit war das Tier gezwungen aktiv zu schwimmen („Swimming“, „Struggling“) oder sich passiv treiben

zu lassen („Floating“). Nach dem 5-minütigen Schwimmen wurde die Ratte aus dem Wasser genommen, sorgfältig abgetrocknet und in ihren Heimkäfig zurückgesetzt. Das Schwimmverhalten der Tiere wurde während des Versuchs auf Video aufgezeichnet und später mit Hilfe eines Programms am Computer nach den drei charakteristischen Verhaltensweisen ausgewertet: „Struggling“: Die Ratte bewegt stark alle vier Extremitäten, die Vorderfüße durchbrechen die Wasseroberfläche. „Swimming“: Die Ratte bewegt alle vier Extremitäten ohne dabei mit ihnen die Wasseroberfläche zu durchbrechen, oder sie taucht aktiv. „Floating“: Die Ratte verharrt bewegungslos im Wasser mit lediglich gelegentlichen leichten Bewegungen um ihre Lage zu stabilisieren.

### **2.3.3 Open Field**

Dieser Test dient der Erfassung von Veränderungen in der lokomotorischen Aktivität. Hierbei wurde das Versuchstier in eine dunkelgraue Holzbox (57 x 57 cm mit 39 cm hohen Wänden) gesetzt und seine während eines Zeitraums von fünf Minuten zurückgelegte Wegstrecke unter Zuhilfenahme einer über der Box montierten Videokamera und eines Computerprogramms (TSE, Bad Homburg, Deutschland) gemessen.

### **2.3.4 Sozialer Konflikt (Social Defeat)**

Dieses in erster Linie von einer stark emotionalen Komponente geprägte Stressmodell basiert auf der sozialen Konfrontation mit einem dominanten, aggressiven Artgenossen (Miczek 1979). Das Versuchstier wurde in den Käfig eines älteren, dominanten und speziell für diesen Zweck trainierten Männchens (Resident) gesetzt. Die Residents waren wenigstens sechs Monate alt und wurden, um ihre territoriale Aggression zu verstärken, zusammen mit einem Weibchen gehalten (Flannelly and Lore 1977). Nach der ersten aggressiven Attacke des dominanten Tieres gegenüber dem Eindringling (Intruder), welche in der Regel nach ca. 1-2 Minuten Expositionsdauer erfolgte, wurden Resident und Intruder für den Rest der insgesamt 30 Minuten dauernden Prozedur durch ein engmaschiges Metallgitter voneinander getrennt. Einerseits sollte dadurch das Versuchstier vor Verletzungen geschützt und andererseits die visuelle und olfaktorische Präsenz des Stressors gewährleistet werden. Während des gesamten Verfahrens wurde das Verhalten sowie die Ultraschallvokalisation des Versuchstieres im Minutentakt dokumentiert.

Die Social Defeat-Prozedur wurde als erfolgreich gewertet, wenn das Versuchstier über wenigstens 20 Minuten ein defensives Verhalten, wie zum Beispiel eine unterwürfige Körperhaltung oder Freezing, zeigte. Nach Beendigung der Prozedur wurde das Versuchstier wieder in seinen Heimkäfig zurückgesetzt.

## **2.4 Blutabnahme**

### **2.4.1 Chirurgische Implantation eines Jugularvenenkatheters**

Für die wiederholte Blutentnahme am wachen und frei beweglichen Tier wurde den Ratten ein Jugularvenenkatheter unter Halothan-Narkose gelegt (Thrivikraman, Huot et al. 2002). Unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops (Olympus SZ30, Japan) wurde die rechte Vena jugularis freigelegt und durch einen kurzen Schnitt eröffnet. Der aus einem 3,5 cm langen Silikonschlauch bestehende Katheter (Silastic<sup>®</sup>, Dow Corning Cop., Midland, USA; Durchmesser innen: 0,6 mm; Durchmesser außen: 1,2 mm), welcher 1,0 cm auf ein ca. 15 cm langes Stück Polythene-Schlauch (SIMS Portex<sup>®</sup>, Kent, England; Durchmesser: 0,58 mm) aufgezogen wurde, wurde durch die kleine Gefäßöffnung etwa 3 cm bis in den rechten Vorhof des Herzens eingeführt. Anschließend wurde der Katheter in das Blutgefäß eingenäht. Das andere Ende des Katheters wurde subkutan in den Nacken des Tieres geführt und durch die Haut nach außen geleitet, wo er mit einer Naht befestigt wurde. Abschließend wurde der Katheter mit einer antibiotikumhaltigen (Gentamicin 30000 IU/Ratte, Centravet, Bad Bentheim, Deutschland) und isotoner Kochsalzlösung (Pharmacia, Erlangen, Deutschland) gefüllt. Die Wunde wurde mit Metallclips und der Katheter durch Abknicken verschlossen.

### **2.4.2 Experimenteller Ablauf der Blutentnahme**

Am Morgen des Versuchstags wurde der Jugularvenenkatheter über einen etwa 50 cm langen Polyethylen-Schlauch (SIMS Portex<sup>®</sup>, Kent, England; Durchmesser: 0,58 mm) mit einer 1-ml Plastikspritze verbunden. Zwei Stunden vor Versuchsbeginn wurde der Katheter mit steriler heparinisierter Kochsalzlösung (30 IU/ml isotoner Kochsalzlösung: Heparin-Natrium-25000-Ratiopharm<sup>®</sup>, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) gespült. Die Plastikspritze befand sich außerhalb des Käfigs und ermöglichte somit eine für die Ratte störungsfreie Blutentnahme. Nach dem Anschließen und initialem Spülen hatten die Tiere zwei Stunden Zeit sich an die experimentellen Bedingungen zu gewöhnen.

Zu definierten Zeitpunkten wurden 0,8 ml (für die Bestimmung von ACTH, CORT und AVP) bzw. 0,3 ml (für die Bestimmung von ACTH und CORT) Blut in die Plastikspritze aufgenommen. Unmittelbar danach wurde den Tieren das gleiche Volumen steriler, isotoner Kochsalzlösung (Pharmacia, Erlangen, Deutschland) reinfundiert. Die Blutproben wurden in eisgekühlte, mit Ethylendiamintetraessigsäure beschichtete Tubes (EDTA 1000A, KABE Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland) gegeben, die 10 µl Aprotinin (Trasylo<sup>®</sup> 10000 KIE/ml, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) als Proteaseinhibitor enthielten. Anschließend wurden sie für 5 Minuten bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge: Z233MK, Hermle GmbH, Wehingen, Deutschland). Das Plasma wurde für die Analyse von AVP (180 µl), ACTH (80 µl) und Kortikosteron (10 µl) aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

#### **2.4.3 Abnahme von Schwanzblut**

Zur Gewinnung von Blut aus der Schwanzvene wurde die Spitze (ca. 4 mm) des Rattenschwanzes mit Hilfe einer Schere unter sterilen und stressfreien Bedingungen abgetrennt. Durch retrogrades Ausstreichen des Schwanzes wurde ca. 1 ml Blut gewonnen und in einem Röhrchen gesammelt. Eine Narkotisierung des Tieres war hierfür nicht notwendig.

#### **2.4.4 Blutanalyse und RIA**

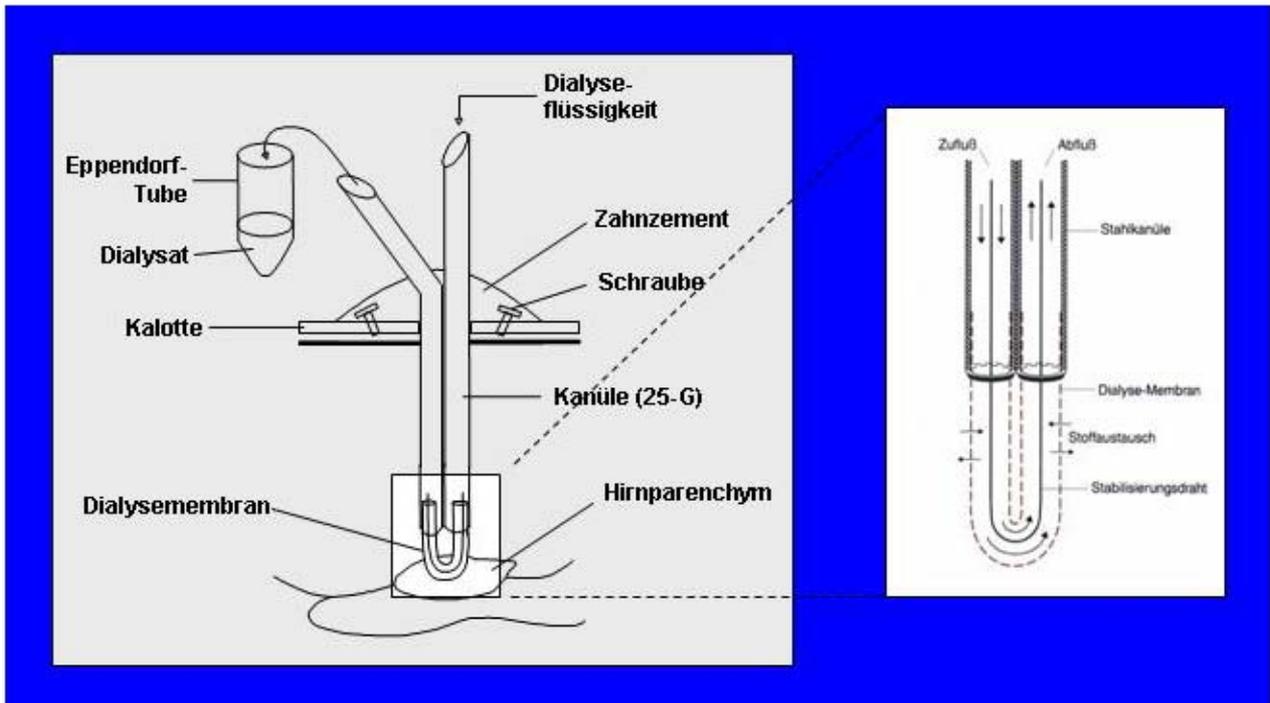
Die Blutproben wurden in vorgekühlten, EDTA und einen Protease-Hemmstoff (10 µl Aprotinin, Trasylo<sup>®</sup>, Bayer, Deutschland) enthaltenden Tubes gesammelt und zentrifugiert (5 min, 4000 U/min, 4°C). Bis zur Messung wurden die Blutproben bei -20°C gelagert. Die Plasmakonzentrationen von ACTH (50 µl) und Kortikosteron (10 µl) wurden mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Kits (Biochem, Freiburg, Deutschland) unter Berücksichtigung der jeweiligen Anleitungen bestimmt (Sensitivität: ACTH, < 1,0 pg/ml; Corticosteron, < 2,0 ng/ml). Der Intra- und Interassay Abweichungskoeffizient betrug 7 beziehungsweise 10%.

## 2.5 Mikrodialyse

Die Mikrodialyse ermöglicht die *in vivo* Messung der Veränderung der Konzentrationen von biologisch aktiven Neurotransmittern im extrazellulären Kompartiment des PVN beziehungsweise des Hippocampus im zeitlichen Verlauf im hierdurch ungestörten Tier.

### 2.5.1 Funktionsweise und Aufbau einer Mikrodialyse-Sonde

Die Mikrodialyse-Sonde wird fest in den PVN oder den Hippocampus implantiert (Horn and Engelmann 2001). Die Dialyseflüssigkeit wird mittels einer Mikroperfusionspumpe gleichmäßig durch die Sonde gepumpt und in einem Eppendorf-Tube am distalen Ende aufgefangen. An der semipermeablen Dialysemembran kommt es zu einem Stoffaustausch zwischen dem Dialysemedium und dem extrazellulären Kompartiment bis zum Ausgleich des Konzentrationsgradienten. Die U-förmige Membran kann von Substanzen mit einem Molekulargewicht kleiner als 18 kDa passiert werden und weist eine relative Durchlaßrate von etwa 2 % *in vitro* auf. Die Sonden wurden im Max-Planck-Institut für Psychiatrie selbst hergestellt: Ein 0,1 mm dicker und rostfreier Draht wurde in eine schlauchförmige Dialysemembran (Hemophan® GFS Plus 16, Gambro Dialysatoren, Hechingen, Deutschland) eingezogen. Beide Enden dieses ca. 1,0 cm langen Dialyseschlauchs samt Draht wurden ca. 3 mm in je eine 2,0 cm lange 25-G Kanüle (Durchmesser innen: 0,3 mm; Durchmesser außen: 0,5 mm) eingeführt. Anschließend wurden beide Enden um jeweils 90° aufeinander zubewegt, so dass die beiden Kanülen Seite an Seite zu liegen kamen. Eine Kanüle wurde am anderen Ende um ca. 45° nach außen gebogen, um im Experiment ein leichteres Anschließen der Eppendorf-Tubes zu ermöglichen. Die beiden parallel aneinanderliegenden Kanülen sowie der Übergangsbereich zwischen Kanülen und Dialysemembran wurden mit einem 2-Komponenten Epoxidharz-Kleber (Uhu®, Bühl, Deutschland) verbunden. Das kurze Drahtstück im Lumen des Dialyseschlauchs verbessert die Stabilität der U-förmigen Membranschleife und soll ein Abknicken während der chirurgischen Implantation verhindern.



**Abbildung 2.1:** Aufbau einer U-förmigen Mikro dialyse-Sonde



**Abbildung 2.2:** Ratte im Forced Swim-Test

## 2.5.2 Chirurgische Implantation einer Mikrodialyse-Sonde

Die chirurgische Implantation der selbstgebauten, U-förmigen Mikrodialyse-Sonde erfolgte unter tiefer Halothan-Narkose (Hoechst AG, Frankfurt am Main, Deutschland). Zum allgemeinen Ablauf der Operation gehörte keimarmes Arbeiten und eine postoperative Versorgung der Tiere mit einem Depot-Antibiotikum (Tardomycel<sup>®</sup>, 0,01 ml/100g Körpergewicht, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) subkutan. Vor dem operativen Eingriff wurde die Kopfhaut mit einem Lokalanästhetikum (Xylocain<sup>®</sup>) besprüht und mit Cutasept<sup>®</sup> F desinfiziert. Es wurde großen Wert darauf gelegt, dass die Operation für die Tiere möglichst atraumatisch war. Das tief narkotisierte Tier wurde in einen stereotaktischen Apparat (Stoelting, USA) eingespannt. Mit Hilfe eines Skalpells wurde die Kopfhaut samt darunterliegendem Bindegewebe bis auf die Kalotte durchtrennt und das Bregma dargestellt. Auf das Bregma als den Schnittpunkt der Sutura coronalis und der Sutura sagittalis (Paxinos and Watson 1986) wurde der Stereotakt zunächst fixiert. Anschließend wurden folgende Koordinaten eingestellt, die aus einem stereotaktischen Atlas (Paxinos and Watson 1986) erhoben und operatorspezifisch adaptiert wurden:

<i>Hirnregion</i>	<i>Winkel</i>	<i>Caudal</i>	<i>Lateral</i>	<i>Ventral</i>
Hippocampus	0°	-4,1 mm	3,0 mm	4,0 mm

Winkel: bezogen auf die Oberfläche der Schädelkalotte

Caudal: bezogen auf das Bregma

Lateral: bezogen auf das Bregma

Ventral: bezogen auf die Oberfläche der Schädelkalotte

Mit einem Dentalbohrer (Durchmesser 1,2 mm) wurde die Durchtrittsstelle für die Mikrodialyse-Sonde und zwei Löcher für die beiden zur Fixierung des Implantats dienenden rostfreien Mikroschrauben gebohrt. Nach der Einführung der Sonde mittels des Stereotakten wurde das Implantat mit Hilfe von lighthärtendem, dualem Zahnzement (Twinlook<sup>®</sup> cement, Kulzer, Dormagen, Deutschland) an den beiden Schrauben und der Schädelkalotte befestigt. Auf die beiden Kanülenenden der Mikrodialyse-Sonde wurden zwei etwa 4,5 cm lange Polyethylen-Schläuche (SIMS

Portex<sup>®</sup>, Kent, England; Durchmesser: 0,38 mm) aufgesteckt und mit Hilfe von rotem Zahnzement (Kallocryl<sup>®</sup> CPGM, Dr. Speier GmbH, Münster, Deutschland) mit dem Implantat verbunden. Das System wurde zuvor mit Ringer-Lösung gespült und auf Durchgängigkeit überprüft. Abschließend wurde die Wunde desinfiziert (Braunol<sup>®</sup>, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland).

## **2.6 BrdU und Neurogenese**

Die Bestimmung der Neurogeneserate der mitotisch aktiven Vorläuferzellen der subgranulären Zone des Gyrus dentatus erfolgte über die intraperitoneale Injektion des Thymin-Analogons 5-Bromo-2-desoxy-Uridin (2 x 200 mg/kg BW BrDU; Sigma-Aldrich), welches in der S-Phase des Mitosezyklus anstelle der Pyrimidinbase Thymin (5-Methyluracil) in die neu synthetisierte DNA inkorporiert wird und mittels Antikörperfärbung immunhistochemisch nachgewiesen werden kann (Gould, McEwen et al. 1997).

### **2.6.1 Gewebebehandlung und Immunhistochemie**

Die Tiere wurden mit einer Mischung aus Ketamin und Xylazin (Xylazin 2 mg/kg, Ketamin 10 mg/kg) tief anästhesiert und transkardial mit 100 ml 0,9%iger Kochsalzlösung gefolgt von 500 ml Fixationslösung, bestehend aus 4% Paraformaldehyd in 0,1 mol/l Phosphat Puffer (PB; pH 7,4), perfundiert. Die Köpfe wurden in frischer Fixationslösung bei 4°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Gehirne vorsichtig den Köpfen entnommen. Nach Kryoprotektion mit 0,1 mol/l phosphatgepuffertem Kochsalz (PBS; pH 7,4), welches 30% Sukrose und 10% Glycerol enthielt, wurde ein auf -20°C gekühltes Mikrotom benutzt um koronare, 50 µm dicke Schnitte des gesamten septo-temporalen Ausmaßes des Hippocampus anzufertigen. Jeder sechste Schnitt wurde auf einen Objektträger aufgezogen und, um Objektivität zu gewährleisten, vor dem Prozeß der Immunzytochemie kodiert. Die Immunhistochemie wurde nach unserem Standardprotokoll durchgeführt (Czeh, Michaelis et al. 2001). Zur Quantifizierung der BrDU-markierten Zellen wurde die Peroxidase-Technik angewandt. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Wasch- und Inkubationsgänge in 0,1 mol/l PBS (Peroxidase-Immunhistochemie) und 0,1 mol/l Tris-gepufferten 0,9% NaCl (Fluoreszenz-Immunhistochemie) durchgeführt. Die Schnitte wurden 5 Minuten bei 90°C in 0,1 mol/l Zitronensäure inkubiert, 20 Minuten in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert, gespült, 10 Minuten in Trypsin (0,001%) in Trispuffer,

welcher 0,1% CaCl<sub>2</sub> enthielt, aufgelöst, gespült, 30 Minuten in 2N HCl denaturiert, gespült, 2 Stunden in 3% Ziegen Serum geblockt und über Nacht mit monoklonalen Mausantikörpern gegen BrDU inkubiert (1:100, DAKO, Hamburg, Deutschland; plus 0,5% Tween-20). Am nächsten Tag wurden die Schnitte gespült, 2 Stunden mit biotinierten, sekundären Mausantikörpern (1:200, Vectastain *Elite* ABC Kit, Vector) inkubiert, wieder gespült, 10 Minuten in Diaminobenzidin (1:200, DAB Peroxidase Substrat Kit, Vector), welches Nickelammoniumsulfat enthielt, entwickelt und dann gespült. Die Schnitte wurden dann mit Hämatoxylin (Vector) gegengefärbt, durch Alkohol dehydriert und mit Eukit-Deckgläsern abgedeckt.

Für die kombinierte Fluoreszenzmarkierung wurden die Schnitte wie zur DNA-Denaturierung behandelt (siehe oben), über Nacht mit monoklonalen primären Rattenantikörpern gegen BrDU (1:100, Accurate Chemical, Westbury, NY, USA) inkubiert, gespült, 2 Stunden mit Alexa 568-konjugierten sekundären Rattenantikörpern (1:100, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) inkubiert, einige Male gespült und dann entweder mit monoklonalen Mausantikörpern gegen Neuron-Specific Nuclear Protein (NeuN, 1:1000, Chemicon, Hofheim, Deutschland) oder polyklonalen Kaninchenantikörpern gegen saures Gliafaserprotein (GFAP, 1:4000, Chemicon) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die mit anti-NeuN inkubierten Schnitte für 2 Stunden mit Alexa 488-konjugiertem sekundärem Mausantiserum (1:100, Molecular Probes) inkubiert. Die Schnitte, welche mit Antiserum gegen GFAP inkubiert waren, wurden für 2 Stunden mit Cy5-konjugiertem sekundärem Kaninchenantiserum (1:200, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) inkubiert. Nach dem Spülen wurden die Schnitte aufgezo-gen, getrocknet und mit Antifading Media (DAKO) abgedeckt.

### **2.6.2 Quantifizierung**

Es wurde ein modifiziertes stereologisches Protokoll benutzt (Czeh, Michaelis et al. 2001). Alle BrDU-markierten Zellen in der Körnerzellschicht und der subgranulären Zone, welche als circa zwei Zellkörper breite Zone entlang der Grenze zur Körnerzellschicht definiert ist, wurden ungeachtet ihrer Größe oder Form gezählt. Um das Zählen von Zellklustern zu ermöglichen, wurden 400- und 1000-fache Vergrößerungen verwendet, Zellen am äußeren Rand der Brennebene wurden außer Acht gelassen. Jeder sechste Schnitt wurde ausgezählt, die Gesamtzahl der BrDU-markierten Zellen durch Multiplikation mit sechs ermittelt. Um einen möglichen Effekt von Stress und/oder der Behandlung mit rTMS auf die Bioverfügbarkeit des

mitotischen Markers zu überprüfen, wurden zusätzlich bei jedem Tier der Gruppe Proliferation die BrDU-positiven Zellen im Corpus Callosum ausgezählt. Für diesen Zweck wurden fünf repräsentative Schnitte des Hippocampus, von 7,0 bis 5,0 mm interaural - bezogen auf den Atlas von Paxinos und Watson - analysiert. Um das Volumen der Körnerzellschicht zu bestimmen, wurden angrenzende, Nissl-gefärbte Schnitte unter Zuhilfenahme des Systems Neurolucida (MicroBrightField) untersucht. Die Volumina wurden auf Basis des Cavalierischen Prinzips ermittelt.

Um den Phänotyp der BrDU-positiven Zellen zu ermitteln, wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop (BioRad MRC 1024 ES System mit HeNe und Nikon Eclipse TE 300 Mikroskop mit krypton/argon Laser) fluoreszierende Doppelmarkierungen mit neuronalem (NeuN) oder glialem (GFAP) Marker nachgewiesen. Die Dicke der optischen Schnitte variierte zwischen 2,0 und 2,5  $\mu\text{m}$  und Schnittführung in der Z-Ebene wurde in Intervallen von 1,0 oder 1,5  $\mu\text{m}$  durchgeführt. Mindestens 100 BrDU-markierte Zellen wurden pro Gehirn analysiert, und die Anzahl der doppelt markierten Zellen wurde prozentual dargestellt.

## **2.7 AVP-mRNA in situ Hybridisierung**

Die histochemische in situ Hybridisierung wurde an Kontroll- und mit Paroxetin behandelten HAB- und LAB-Ratten durchgeführt (n = 6 pro Gruppe). Aufeinanderfolgende, gefrorene Schnitte des Ratten-Hypothalamus (14  $\mu\text{m}$ ) wurden alternierend auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger für die folgende Hybridisierung der AVP-mRNA fixiert. Die Schnitte wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert. Für die in situ Hybridisierung wurde folgende spezifische DNA-Sonde benutzt: AVP (48-mer): 5'-GCA GAA GGC CCC GGC CGG CCC GTC CAG CTG CGT GGC GTT GCT CCG GTC-3' (Müller, Landgraf et al. 2000). Alle Schnitte liefen unter identischen Bedingungen im selben Experiment. Die Objektträger wurden in Kodak NTB2 Emulsion, welche 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt war, getaucht, fünf Tage bei 4° C exponiert und in Kodak D19 Lösung entwickelt. Die entwickelten Objektträger wurden leicht mit Kresylviolett gegengefärbt und mit einem Leica Mikroskop, welches Hell- und Dunkelfeld Kondensatoren besitzt, untersucht. Zur Evaluation des Hybridisierungssignals wurden auf der Grundlage von histologischen Kriterien Schnitte der gleichen Ebene des PVN und SON ausgewählt. Zur objektiven Auswertung wurden Bilder von wenigstens drei Schnitten pro Tier mit Hilfe eines computergestützten Bildanalysegerätes (Optimas-Bioscan), das mit

einem Zeiss Axioplan Mikroskop und einer Sony CCD Kamera gekoppelt war, eingescannt. Die quantitative Analyse der mRNA-Expression wurde verblindet für Zuchtlinie und Behandlung mit dem auf Macintosh basierenden public domain Bildanalyse Programm NIH image, Version 1.6.1 (entwickelt im National Institute of Health, USA, und verfügbar im Internet unter <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>), durchgeführt. Durch eine automatische Messung der optischen Dichte jedes umrissenen Objektes (Zelle) wurde die Anzahl der Silberkörnchen pro Zelle bestimmt. Der Mittelwert der optischen Dichte pro Zelle wurde für jedes Tier errechnet.

## 2.8 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-mRNA und SERT in situ Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung wurde wie vormals beschrieben (Burnet, Mead et al. 1995; Keck, Welt et al. 2003) in parallelen Gruppen von Paroxetinbehandelten und unbehandelten HAB- (n = 6 je Gruppe) und LAB-Ratten (n = 6-7 je Gruppe), die alle Versuche durchliefen, aber keine Mikrodialysesonde implantiert bekommen hatten. Zusätzlich schlossen wir für die Untersuchung von DR und MnR im Mittelhirn naive HAB- und LAB-Tiere ein, die keine Experimente durchlaufen haben (n = 9-10 je Gruppe). Aufeinanderfolgende, gefrorene 14 µm dicke Schnitte des dorsalen Hippocampus und der Raphékerne wurden auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern fixiert und für die *in situ* Hybridisierung vorbehandelt (Burnet, Mead et al. 1995). Zwei in equimolaren Konzentrationen gemischten Oligonukleotidsonden wurden zur Detektion von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-mRNA benutzt: 5'-CTT TGG AGT TGC CCA CTC GGT GCA CCT CGA TCA CCT CCA-3' und 5'-CAG AGA GGT GAT CAC TTG GTA GCT GAC GGT CAC GTC GGA GT-3' (Burnet et al. 1995). Das für SERT komplementäre Oligonukleotid war: 5'-CAC CCA GCA GAT CCT CCA GAA CCA CCC CGG GCT GAA GCC GAG-3' (Burnet, Sharp et al. 1999). Die radioaktive Markierung der Sonde erfolgte am 3'-Ende mit α-<sup>35</sup>S-deoxy-ATP und terminaler Deoxynukleotidyltransferase (Promega, Mannheim, Deutschland). Nach Inkubation bei 35°C über Nacht wurden die Objektträger dreimal 20 Minuten in 0,5x Natriumzitrat bei 55°C gefolgt von zweimal 60 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Die getrockneten Objektträger wurden hiernach für 7-14 Tage auf einem BioMax MR Film exponiert (Kodak, Rochester, NY, USA). Als Kontrolle wurde der 20fache Überschuss an unmarkierten Sonden hinzugegeben. Zur Bestimmung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor mRNA Expression im Hippocampus wurden die Autoradiogramme

mittels eines Scanners (UMAX, UMAX Systems, Düsseldorf, Deutschland) digitalisiert. Die quantitative Analyse zweier Sektionen pro Gehirn erfolgte verblindet für Zuchtlinie und Behandlung mit einem Bildanalysesystems (Analysis Soft imaging Systems, Münster, Deutschland). Grauwerte der untersuchten Regionen wurden zunächst in optische Dichtewerte und dann mit Hilfe von für  $[^{35}\text{S}]$  korrigierten  $[^{14}\text{C}]$  autoradiographischen Standards (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) in  $\text{nCi/g tissue equivalent}$  umgewandelt.

## **2.9 Quantitative Rezeptorautoradiographie der SERT-Bindungsstellen**

Die SERT-Bindungsstellen wurden mittels quantitativer Rezeptorautoradiographie mit  $[^3\text{H}]$ Citalopram (Amersham Biosciences) nach einem leicht modifizierten Protokoll untersucht (Hebert, Habimana et al. 2001). Die Hirnschnitte wurden in Tris-HCL-Puffer (50 mM, pH 7,4), versetzt mit NaCl (120 mM) und KCl (5 mM), 15 Minuten bei Raumtemperatur präinkubiert. Danach wurden die Schnitte im gleichen Puffer mit  $[^3\text{H}]$ Citalopram (2 mM) für 60 Minuten inkubiert. Um unspezifische Bindungen radioaktiv markierter Liganden zu ermitteln, wurde eine Kontrolle mit Fluoxetin (20  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt. Am Ende der Inkubation wurden die Schnitte in eisgekühlten Tris-HCl (50 mM, pH 7,4), welches NaCl (120 mM) und KCl (5 mM) enthielt, für viermal fünf Minuten gewaschen, in Wasser gewaschen und zügig luftgetrocknet. Schließlich wurden die Objektträger auf einem Tritiumfilm (Amersham Biosciences) mit  $[^3\text{H}]$ -microsales (Amersham Biosciences) exponiert. Nach dreitägiger Exposition wurde der Film mit einem Typhon 9410 high performance imager (Amersham Bioscience) gescannt. Die quantitative Analyse der  $[^3\text{H}]$ Citalopram-Bindungen erfolgte wie bei der in situ Hybridisierung beschrieben, jedoch wurde die optische Dichte in  $\text{fm/mg tissue equivalent}$  umgewandelt.

## **2.10 $V_{1a}$ -Rezeptorautoradiographie**

Die Expression des  $V_{1a}$ -Rezeptors in den Gehirnen von Vehikel- oder Paroxetin-behandelten HAB- und LAB-Tieren ( $n = 6$  pro Gruppe) wurde mit Hilfe des spezifischen Liganden des  $V_{1a}$ -Rezeptor  $^{125}\text{I}$ -HO-phenylacetyl $^1$ -D-Tyr(Me) $^2$ -Phe $^3$ -Gln $^4$ -Asn $^5$ -Arg $^6$ -Pro $^7$ -Arg $^8$ -NH $_2$  ( $^{125}\text{I}$ -HO-LVA) ermittelt (Barberis and Tribollet 1996). Mittels computergestützten densometrischen Messungen (Optimas 5.2, Optimas, München, Deutschland) wurde die quantitative Auswertung der autoradiographischen

Filme im lateralen Septum, Thalamuskernen und der amygdalostriatalen Übergangszone durchgeführt. Repräsentative Bereiche der verschiedenen Hirnregionen wurden mit einer digitalen Kamera eingescannt, wobei darauf geachtet wurde, dass alle Aufnahmen unter identischen Lichtverhältnissen gemacht wurden. In den untersuchten Regionen wurden die mittleren Grauwerte ermittelt und als Einheiten der optischen Dichte dargestellt. Pro Region wurde pro Tier 5-7 bilaterale Messungen durchgeführt, dann wurden die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen miteinander verglichen (Keck, Welt et al. 2003).

## **2.11 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie**

Serotonin wurde mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*engl. High performance liquid chromatography*, HPLC) mit elektrochemischer Gleichrichtung durch einen auf +0,6 V voreingestellten BAS-Gleichrichter (West Lafayette, IN, USA) und einer gläsernen Unijet 3 mm Karbonelektrode (BASi, West Lafayette, IN, USA), wie vormals beschrieben, bestimmt (Singewald, Kaehler et al. 1997). Das Substanzgemisch des Dialysates wurde mittels Umkehr-Ionenpaar-Chromatographie (reversed-phase ion-pair HPLC) in die einzelnen Bestandteile aufgetrennt. Die Flussrate durch die Analysensäule (Sepstick Microbore Säule 150 x 1 mm, 5 µm C18; BAS) wurde mit Hilfe eines Flusssplitters von 1,5 ml/min auf 70 µl/min reguliert. Durch einen gekühlten Mikrosampller (CMA, Helsingborg, Schweden) wurde ein 50 µl Aliquot jedes Dialysates automatisch injiziert. Das Detektionslimit betrug 0,3 pg/Probe, das Verhältnis Signal/Hintergrund betrug 3.

## **2.12 Glukokortikoid- und Mineralokortikoid-Rezeptormessungen**

Um Rezeptormessungen mittels des <sup>3</sup>H-Steroid-Bindungsassays durchführen zu können, müssen die Versuchstiere adrenaletomiert werden, um kein endogenes Kortikosteron aufzuweisen. Hierzu wurde unter Halothan-Narkose auf der Höhe der Nebennieren bilateral ein kleiner Schnitt gesetzt. Diese wurden aus dem perirenenalen Fettgewebe entnommen, anschließend erfolgte der Wundverschluss über Klammern. Wegen des fehlenden Aldosterons erhielten die Tiere nach Adrenaletomie 0,9%ige NaCl-Lösung als Trinkwasser. Nach Tötung der Tiere nach einem Tag wurde Kortikosteron im Plasma bestimmt, um die komplette Entfernung der Nebennieren zu überprüfen. Nach Präparation der Hypophyse wurden die Gehirne umgehend in verschiedene Areale (Hippocampus, Hypothalamus, Amygdala, frontaler Kortex,

Neokortex) dissektiert, welche sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt wurden.

Zur Durchführung der  $^3\text{H}$ -Steroid-Bindungsassays wurden aufgrund der geringen Gewebemengen Hypothalami und Hypophysen der einzelnen Gruppen gepoolt, für die restlichen Gewebe wurden Einzelmessungen durchgeführt. Die totale Bindung wurde mit [ $^3\text{H}$ ]-Dexamethason (spezifische Aktivität 85 Ci/mmol) oder mit [ $^3\text{H}$ ]-Aldosteron (spezifische Aktivität 83Ci/mmol) bestimmt. Nach einer Inkubationszeit von 20-24 h bei  $0-2^{\circ}\text{C}$  wurden die gebundenen von den freien [ $^3\text{H}$ ]-Steroiden mittels Sephadex LH-20 (Pharmacia, Schweden) Gel-Filtration getrennt. Die Proteinkonzentrationen wurden mit BSA als Standards bestimmt. Die Maximalbindung ( $B_{\text{max}}$ ) und die relative Bindungsaffinität ( $K_d$ ) wurden mittels Scatchard-Analyse ermittelt (Reul and de Kloet 1985).

### **2.13 Postmortem Histologie**

Die histologische Kontrolle dient dem Nachweis der korrekten Lage der Mikrodialyse-Sonde im Hippocampus. Die Beurteilung der Hirnschnitte erfolgte demnach allein auf Grund der Histologie noch vor Kenntnis der Ergebnisse der Mikrodialyse- und Plasmaproben. Am Tag nach dem Experiment wurden die Ratten durch eine Überdosis Halothan getötet. Die Gehirne wurden vorsichtig aus der Schädelkalotte entnommen, in vorgekühltem 2-Methylbutan (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) auf Trockeneis ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) schockgefroren und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Einige Tage später wurden die Gehirne bei  $-20^{\circ}\text{C}$  am Kryostaten (Microm, HM 500-O, Walldorf, Deutschland) in  $25\ \mu\text{m}$  dicke Hirnschnitte geschnitten. Diese Frontalschnitte des PVN wurden auf Objektträger, die mit 0,01 % Poly-L-Lysin-Hydrobromid (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) beschichtet worden waren, aufgezogen. Sie wurden für 1,5 Minuten mit 0,5 % Kresylviolett (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gefärbt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (20 Sekunden in 70 % Ethanol; 20 Sekunden in 96 % Ethanol) entwässert. Danach wurden sie 5 Minuten in Isopropanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und 10 Minuten in Rotihistol<sup>®</sup> (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) überführt. Abschließend wurden sie in Eukitt<sup>®</sup> (Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland) eingebettet. Die Ansicht der Hirnschnitte und die Beurteilung der Lage der Spitze der Mikrodialyse-Sonde erfolgte am Stereomikroskop.

## 2.14 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Statistik-Software GB-STAT (Version 6.0, Dynamic Microsystems Inc., Silver Springs, USA). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Signifikanz wurde angenommen, wenn die statistische Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  war.

### 2.14.1 Kombiniertes Dexamethason/CRH-Test

Nach Verabreichung von CRH wurde die Freisetzung von ACTH und Kortikosteron als *area under the concentration-time curve* (AUC, willkürliche Einheit) unter Korrektur zur basalen Konzentration (durchschnittliche Plasmakonzentration von ACTH und Kortikosteron zwischen 18.00 und 19.30 Uhr) mit trapezoidaler Integration berechnet. Zusätzlich wurden die Quotienten der AUCs für ACTH und Kortikosteron als grobe Schätzung der Reagibilität der Nebennierenrinde auf ACTH (Hypophysen-Nebennierenrinden Quotient) berechnet. Zur Analyse der Daten der in situ Hybridisierung wurden die mittleren Grauwerte pro Region und Tier ermittelt. Bindungsdaten wurden ausgedrückt in fmol/mg und im Falle der individuellen Zytosolmessungen (außer Adenohypophyse) als Mittelwerte der Gruppe. Scatchard-Analysen wurden für die Bindungsdaten gepoolten Zytosols durchgeführt und die maximale Bindungskapazität ( $B_{max}$ ) und Bindungsaffinität ( $K_d$ ) wurden berechnet. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe einer Zweiweg-ANOVA für wiederholte Messungen (Gruppe x Zeitpunkt) gefolgt von *Fisher's least-significant-difference protected t-test* oder dem Mann-Whitney U-Test (für Vergleiche der Anzahl von positiv markierten Zellen/Silberkörnern, AVP-Dialysaten und AUC-Werten) bestimmt. Als statistisch Signifikant wurde  $P < 0,05$  angesehen.

### 2.14.2 Paroxetin

Wie oben beschrieben wurden auch hier für ACTH und Kortikosteron die *area under the concentration-time curve* (AUC) berechnet. Die statistische Signifikanz der Plasmakonzentrationen von ACTH und Kortikosteron wurde mit Hilfe einer Dreiweg-ANOVA (Zuchtlinie x Behandlung x Zeitpunkt) mit wiederholten Messungen des letzten Faktors bestimmt. Die Verhaltensparameter wurden mit Hilfe einer Zweiweg-ANOVA (Zuchtlinie x Behandlung), die Daten des Mikrodialyseexperiments mit einer Dreiweg-ANOVA (Zuchtlinie x Behandlung x Zeitpunkt) analysiert. Wenn die statistische Rechtfertigung bestand, wurde ein Fisher's LSD post hoc Test

durchgeführt. Zum Vergleich der AUC-Werte wurde der Mann-Whitney U-Test benutzt. Die Dichte der Silberkörnchen der markierten Zellen (AVP *in situ* Hybridisierung), die optische Dichte der untersuchten Regionen / *regions of interest* ( $V_{1a}$ -Rezeptorautoradiografie), die Rezeptorautoradiographie, die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-mRNA und SERT *in situ* Hybridisierung wurden mit einer Kruskal-Wallis Einweg-ANOVA gefolgt von einem Mann-Whitney U-Test oder Bonferroni-Test analysiert. Bei Experimenten mit nur zwei Gruppen wurde ein Student's T-Test durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde  $P < 0,05$  angesehen.

### **2.14.3 Transkranielle Magnetstimulation**

Mit Hilfe einer Zweiweg-ANOVA für wiederholte Messungen (Gruppen x Zeitpunkt) wurden die Unterschiede in der Freisetzung von ACTH und Kortikosteron zwischen den verschiedenen Gruppen statistisch analysiert. Innerhalb der Gruppen wurde hierzu eine Einweg-ANOVA benutzt. Die Verhaltensparameter wurden mit einer Dreiweg-ANOVA (Zuchtlinie x Behandlung x Zeitpunkt) mit wiederholten Messungen des letzten Faktors (EPM und Forced Swimming) statistisch untersucht. Wenn die statistische Rechtfertigung bestand wurde ein Mann-Whitney U-Test durchgeführt.  $P < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

### **2.14.4 Neurogenese**

Zur Bewertung der Effekte der unterschiedlichen Behandlungen kam eine Zweiweg-ANOVA (Behandlung x Stress) für wiederholte Messungen zum Einsatz. Soweit die statistische Rechtfertigung gegeben war, wurde an die ANOVA ein post hoc Tukey's HSD Test angehängt.

## **2.15 Versuchsaufbau und -ablauf**

### **2.15.1 DEX/CRH-Test mit HAB- und LAB-Ratten**

Am Tag des Experimentes wurden die Tiere (HAB:  $n = 13$ ; LAB:  $n = 11$ ) um 7.00 Uhr gewogen. Der DEX/CRH-Test wurde wie beschrieben (Hatzinger, Reul et al. 1996) durchgeführt: um 8.00 Uhr wurde der Jugularvenenkatheter mittels eines PE-50 Schlauches mit einer mit heparinisierten Kochsalzlösung (30 IU/ml; Ratiopharm, Ulm, Deutschland) gefüllten Spritze verbunden. Danach blieben die Tiere ungestört. Um 12.00 Uhr mittags, während des Tiefpunkts im circadianen Rhythmus des HPA-

Systems der Ratte, wurde DEX (30 µg/kg, gelöst als Phosphat in 0,9% Kochsalzlösung; 0,5 ml/kg; Merck, Darmstadt, Deutschland) intravenös injiziert. Um den Einfluss von DEX auf die Ausschüttung von ACTH und Kortikosteron während der täglichen Akrophase zu beobachten, wurden um 18.00, 18.30, 19.00 und 19.30 Uhr jeweils 0,2 ml Blut entnommen. Um 19.31 Uhr wurde CRH (50 ng/kg, 0,5 ml/kg i.v.; Ferring, Kiel, Deutschland) injiziert. Zur Beurteilung der durch CRH stimulierten Ausschüttung von ACTH und Kortikosteron wurden um 19.40, 20.00, 20.20 und 20.40 Uhr weitere Blutentnahmen durchgeführt.

### **2.15.2 DEX/CRH-Test mit Vehikel- oder V<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist behandelten HAB-Ratten**

Der DEX/CRH-Test wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Um 19.15 Uhr wurde entweder reine Trägersubstanz (0,9% Kochsalz, 0,5 ml/kg; n = 19) oder der V<sub>1a/b</sub>-Rezeptorantagonist dP[Tyr(Me)<sub>2</sub>]AVP (10 µg/kg gelöst in 0,9% Kochsalzlösung, 0,5 ml/kg; Dr. M. Manning, Toledo, OH, USA; n = 13) intravenös injiziert. Um 19.31 Uhr wurde CRH (50 ng/kg, 0,5 ml/kg) injiziert. Zur Beurteilung der durch CRH stimulierten Ausschüttung von ACTH und Kortikosteron wurden um 19.40, 20.00, 20.20 und 20.40 Uhr weitere Blutentnahmen durchgeführt.

### **2.15.3 Paroxetin**

#### **Verhaltenstestung**

In der achten Wochen der Behandlung mit Paroxetin durchliefen die Tiere aller vier experimentellen Gruppen (HAB Paroxetin, HAB Vehikel, LAB Paroxetin, LAB Vehikel, jeweils n = 10) am Tag des Experiments zwischen 8.00 und 12.00 Uhr den Forced Swim-Test.

Um mögliche Einflüsse von Paroxetin auf die lokomotorische Aktivität zu untersuchen, wurden die Tiere 5 Minuten in ein open field gesetzt und die Linienübertritte ausgezählt.

#### **Operation 1**

In der achten Woche der Behandlung mit Paroxetin, fünf Tage vor dem Experiment, wurde den Tieren aller Gruppen unter Halothan-Narkose wie oben beschrieben Jugularvenenkatheter chirurgisch implantiert.

#### **Experiment 1: Basale und stressinduzierte Aktivität des HPA-Systems**

Um die Freisetzung von ACTH und Kortikosteron ins Blut unter basalen Bedingungen und nach einem kombinierten physiologisch-emotionalen Stressor (5 Minuten Forced

Swimming) zu beobachten, wurde den Tieren 5, 15 und 50 Minuten nach Stress Blut abgenommen.

### **Experiment 2: Kombierter Dexamethason/CRH-Test**

Drei Tage nach Experiment 1 wurde mit den selben Tieren der DEX/CRH-Test durchgeführt.

### **Operation 2**

In der zehnten Woche der Behandlung mit Paroxetin wurde sechs Tieren pro Gruppe unter Halothan-Narkose wie oben beschrieben Mikrodialysesonden in den Hippocampus chirurgisch implantiert.

### **Experiment 3: *In vivo* Mikrodialyse des Hippocampus**

Drei Tage nach Operation, am Tag des Experiments, wurden die Ratten an die Mikrodialysepumpe angeschlossen: Die um 45° nach außen gebogene Kanüle wurde mit einem Eppendorf-Tube zum Auffangen der Dialyseflüssigkeit verschlossen. Die gerade Kanüle wurde über einen ca. 3 m langen Polythene-Schlauch (SIMS Portex®, Kent, England; Durchmesser: 0,38 mm) mit einer Mikroperfusionspumpe (TSE-Systems, E 540220, Bad Homburg, Deutschland) verbunden. In die Pumpe wurden Präzisionsglasspritzen (2,5 ml, Hamilton, Schweiz) eingelegt, die luftblasenfrei mit steriler Ringer-Lösung (Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland) gefüllt waren. Ein Liter steriler Ringer-Lösung enthält 8,80 g NaCl, 0,30 g KCl und 0,33 g CaCl<sub>2</sub>. Dies entspricht einem Ionengehalt von Na<sup>+</sup> 147,1 mmol/l, Ca<sup>2+</sup> 2,25 mmol/l, K<sup>+</sup> 4,0 mmol/l, Cl<sup>-</sup> 155,6 mmol/l mit einer theoretischen Osmolarität von 309 mosm/l. Der pH-Wert beträgt 7,4. Die Dialysegeschwindigkeit betrug 200 µl/h. Vor dem Beginn des eigentlichen Versuchs wurden die Mikrodialyse-Sonden 2 Stunden perfundiert, um eine Adaption des Hirngewebes an den Dialysevorgang zu gewährleisten. Während dieser Zeit stellt sich ein Gleichgewicht zwischen dem Dialysemedium und dem extrazellulären Gewebe ein. Während des Experiments wurden alle 30 Minuten die Eppendorf-Tubes (1,5 ml, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland) gewechselt. In jedem Reaktionsgefäß befanden sich zur Stabilisierung der Peptide in der Dialyseflüssigkeit 10 µl einer 0,1 N HCl-Lösung. Die Tubes mit den Dialysaten wurden sofort zentrifugiert, auf Trockeneis gelagert und bei -80 °C eingefroren. Während des fünften von zehn aufeinander folgenden Dialysaten, wurden die Tiere zur Induktion von emotionalem Stress fünf Minuten auf der EPM exponiert.

## **2.15.4 Transkranielle Magnetstimulation**

### **Experiment 1 und 2: Verhaltenstestung**

#### **Elevated Plus-maze (EPM):**

Neun Wochen nach ihrer ersten Testung auf der EPM und nach zwei dreitägigen Serien chronischer Behandlung mit rTMS, wurden die HAB- und LAB-Ratten erneut auf der EPM getestet.

#### **Forced Swimming**

HAB- und LAB-Tiere wurden erstmals einen Tag vor Beginn der ersten rTMS-Behandlung getestet. Der zweite Forced Swim-Test wurde am Tag nach Beendigung der chronischen Behandlung mit rTMS und 90 Minuten nach Testung auf der Elevated plus-maze zwischen 8.00 und 12.00 Uhr durchgeführt.

#### **Experiment 2: Chirurgischer Eingriff**

Die chirurgische Implantation des chronischen Jugularvenenkatheters wurde bei allen Tieren der rTMS- (HAB n = 6; LAB n = 6) und der Scheinbehandlungsgruppe (HAB n = 6; LAB n = 6) einen Tag vor der zweiten dreitägigen Stimulationsserie durchgeführt.

#### **Experiment 2: Blutentnahmen**

Um die Effekte der Langzeitbehandlung mit rTMS auf die Aktivität des HPA-Systems zu beobachten, wurde die Freisetzung von ACTH und Kortikosteron ins Blut unter basalen Bedingungen und nach einem hauptsächlich emotionalen Stressor (5 Minuten EPM) und einem kombinierten emotional/physischen Stressor (5 Minuten Forced Swimming) mit Hilfe von Blutabnahmen überwacht. Hierzu wurde der 5 Tage zuvor implantierte Jugularvenenkatheter am Versuchstag um 7.00 Uhr, wie oben beschrieben, mit einer Spritze verbunden. Es folgten zwei basale Blutentnahmen vor und jeweils drei Blutentnahmen 5, 15 und 50 Minuten nach EPM-Exposition, beispielsweise Forced Swimming.

#### **Stimulation mit intravenös injiziertem CRH**

Am folgenden Tag wurden die Tiere gewogen, dann wurde der Katheter um 7.00 Uhr wieder an eine mit heparinierter Kochsalzlösung befüllten Spritze angeschlossen und um 9.00 Uhr erfolgte eine basale Blutentnahme. 10 Minuten nach intravenöser Bolusinjektion von humanem CRH (50 ng/kg, 0,5 ml/kg; Ferring, Kiel, Germany) wurde eine weitere Blutabnahme durchgeführt.

### 2.15.5 Neurogenese

Die Tiere wurden in vier Versuchsgruppen aufgeteilt: Kontrolle, Kontrolle + rTMS, Stress, und eine Gruppe Stress + rTMS. Jede Gruppe bestand aus 12 Tieren. Die Gruppe Kontrolle erhielt täglich eine rTMS-Scheinbehandlung, die Gruppe Kontrolle+rTMS hingegen eine Behandlung mit rTMS. Die Tiere der Gruppe Stress durchliefen über einen Zeitraum von 18 Tagen täglich die Prozedur des psychosozialen Stresses (social defeat) und eine rTMS-Scheinbehandlung, wohingegen die Gruppe Stress + rTMS täglich dem psychosozialen Stress ausgesetzt und mit rTMS behandelt wurde. Während der 18 Versuchstage wechselte die Reihenfolge von rTMS-Behandlung und Social Defeat täglich, so dass ein Tier, welches vormittags mit rTMS behandelt wurde, nachmittags der Social Defeat-Prozedur ausgesetzt wurde und umgekehrt. Um die Vermehrung und das Überleben der Neurone in der Körnerzellschicht zu ermitteln, wurde jede Gruppe in zwei Untergruppen, eine Gruppe Proliferation und eine Gruppe Survival (jeweils n = 6), aufgeteilt. Um den Effekt der verschiedenen Behandlungsschemata auf das Überleben der neuen Zellen zu ermitteln, wurde den Tieren aus der Gruppe Survival zweimal 5'-Bromo-2-Desoxyuridin (2 x 200 mg/kg BW BrdU [Sigma] in Kochsalzlösung i.p.) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen vor Beginn der Behandlung injiziert und die Tiere am Ende des Experiments, das heißt 18 Tage nach der Injektion, perfundiert. Um den Einfluss der verschiedenen Behandlungsschemata auf die Teilungsrate der Vorläuferzellen zu bewerten, erhielten Tiere der Gruppe Proliferation am letzten Tag des Protokolls, das heißt 24 Stunden vor der Perfusion, einmalig eine Injektion BrdU (200 mg/kg i.p.).

Zur Ermittlung der basalen Aktivität der HPA-Systeme wurde am 17. Tag, einen Tag vor der BrdU-Injektion der Gruppe Proliferation, allen Tieren aus der Schwanzvene Blut entnommen.

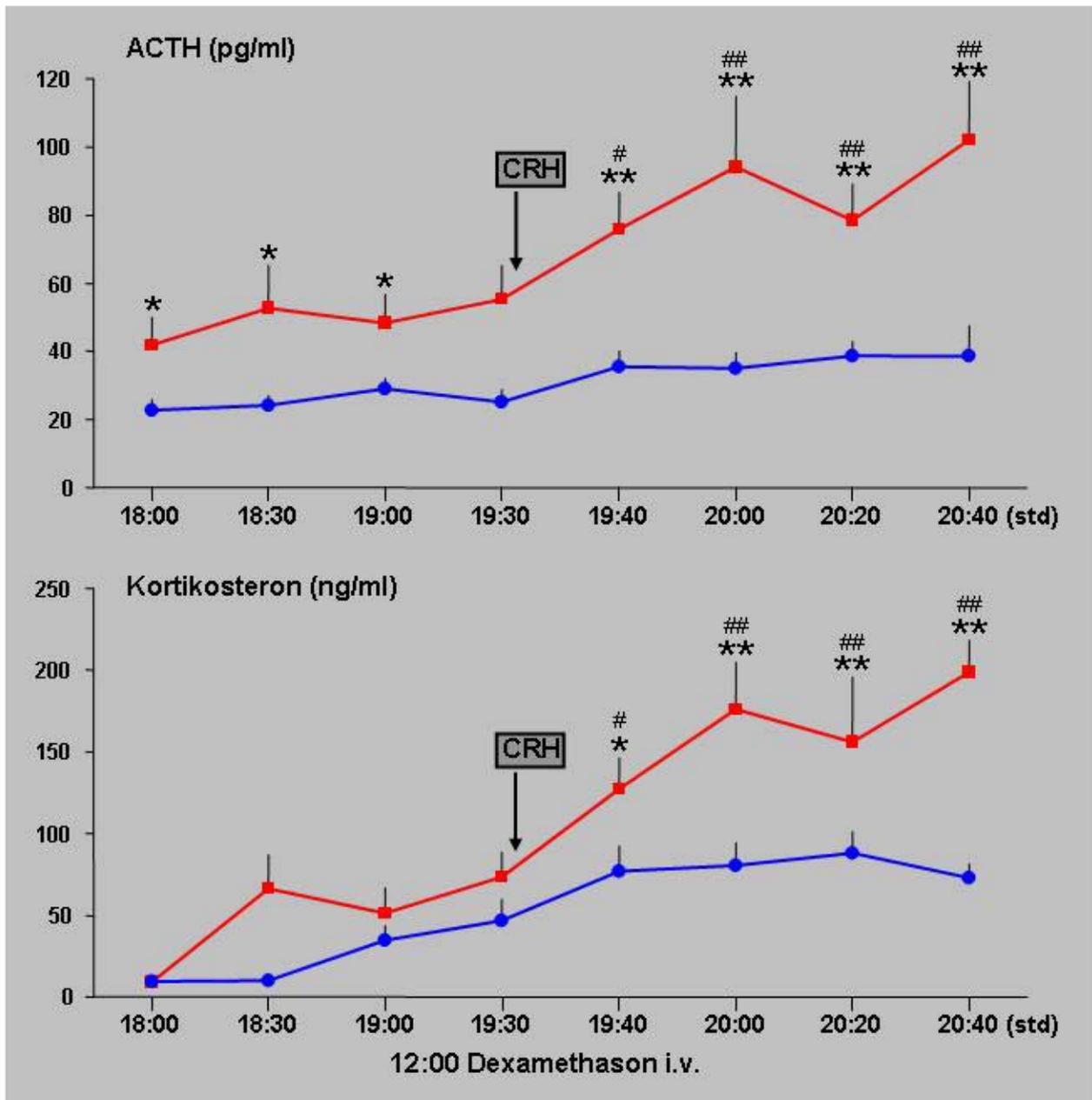
## 3 Ergebnisse

### 3.1 DEX/CRH-Test

#### 3.1.1 DEX/CRH-Test mit männlichen HAB- und LAB-Tieren

Die Vorbehandlung mit DEX führte zu einem Ausbleiben des abendlichen, normalerweise durch die circadiane Rhythmik bedingten Anstieg der Plasmakonzentrationen von ACTH bei LAB-Ratten, bei HAB-Ratten hingegen ließen sich um 18.00, 19.00 und 19.30 Uhr signifikant höhere ACTH-Konzentrationen feststellen, was für eine mangelnde Suppression durch DEX spricht. Die Ausschüttung von ACTH nach Injektion von CRH war signifikant größer bei HAB-Ratten als bei LAB-Ratten (Zweiweg-ANOVA, Gruppe x Zeitpunkt:  $P = 0,03$ ; Abbildung 3.1), was sich auch in signifikant größeren AUC-Werten widerspiegelte (HAB:  $2346 \pm 400$ ; LAB:  $883 \pm 268$ ;  $P < 0,05$ ). Entsprechend war der maximale Anstieg der Plasmakonzentration von Kortikosteron nach Stimulation mit CRH bei HAB-Ratten signifikant größer als bei LAB-Tieren (Gruppe x Zeitpunkt:  $P = 0,0062$ ), was sich ebenfalls in höheren AUC-Werten widerspiegelte (HAB:  $8306 \pm 1500$ ; LAB:  $3709 \pm 458$ ;  $P < 0,05$ ).

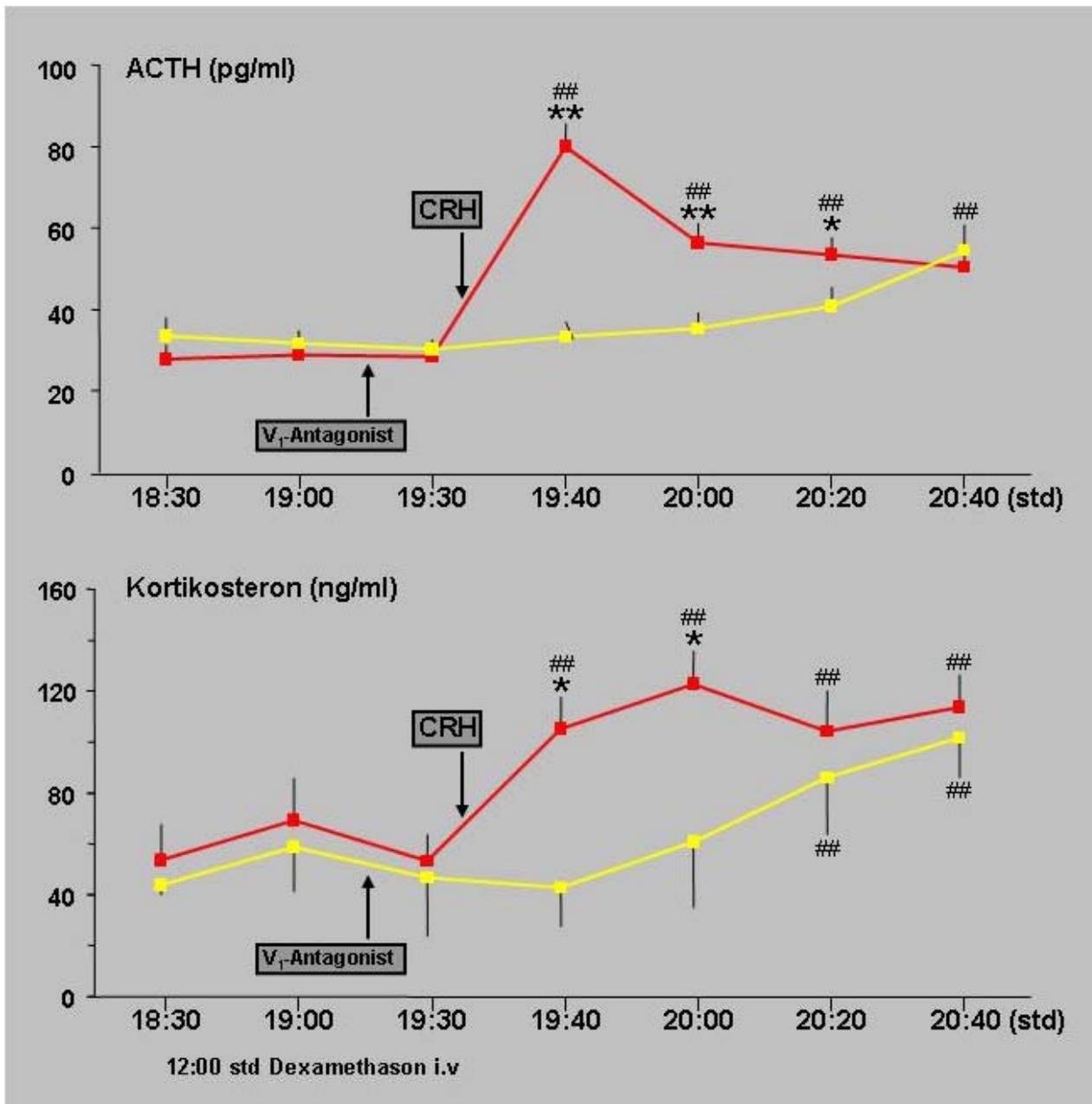
Der Quotient von Hypophyse zu Nebennierenrinde war bei HAB- ( $0,28 \pm 0,07$ ) und LAB-Tieren ( $0,24 \pm 0,05$ ;  $P = 0,94$ ) ähnlich, was zeigt, dass die Reagibilität der Nebennierenrinde auf ACTH bei HAB- und LAB-Tieren nicht signifikant unterschiedlich war.



**Abbildung 3.1:** Plasmakonzentrationen von ACTH und Kortikosteron von HAB- (Quadrate; n = 13) und LAB-Ratten (Kreise; n = 11) zwischen 18.00 und 20.40 Uhr während des kombinierten DEX/CRH Tests. Alle Ratten wurden um 12.00 Uhr mit DEX (30 µg/kg i.v.) vorbehandelt. CRH (50 ng/kg i.v.) wurde um 19.31 Uhr (Pfeil) verabreicht. Die Daten werden als Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 vs. LAB. # p < 0,05, ## p < 0,01 vs. basal.

### 3.1.2 DEX/CRH-Test mit männlichen HAB-Ratten mit V<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist

Nach der Vorbehandlung mit DEX unterschieden sich die basalen Plasmakonzentrationen von ACTH und Kortikosteron zwischen 18.30 und 19.30 Uhr nicht zwischen den Gruppen von HAB-Tieren, die danach mit dem V<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten, beispielsweise reiner Trägersubstanz behandelt wurden. Die Verabreichung von Trägersubstanz oder dem V<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten hatte keinen unmittelbaren Effekt, das heißt während der ersten 15 Minuten, auf die Ausschüttung von ACTH oder Kortikosteron (Abbildung 3.2). Jedoch dämpfte die Verabreichung des V<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten den Anstieg der Ausschüttung von ACTH (Zweiweg-ANOVA, Zeitpunkt x Behandlung:  $P < 0,0001$ ) und Kortikosteron ( $P < 0,05$ ) im Vergleich zu den unbehandelten HAB-Tieren. Dieser Effekt spiegelte sich ebenfalls in niedrigeren AUC-Werten für ACTH (Trägersubstanz:  $3386 \pm 343$ ; V<sub>1</sub>:  $1169 \pm 214$ ;  $P < 0,01$ ) und Kortikosteron (Trägersubstanz:  $4675 \pm 424$ ; V<sub>1</sub>:  $2739 \pm 534$ ;  $P < 0,05$ ) nach Behandlung mit dem Antagonisten wieder.



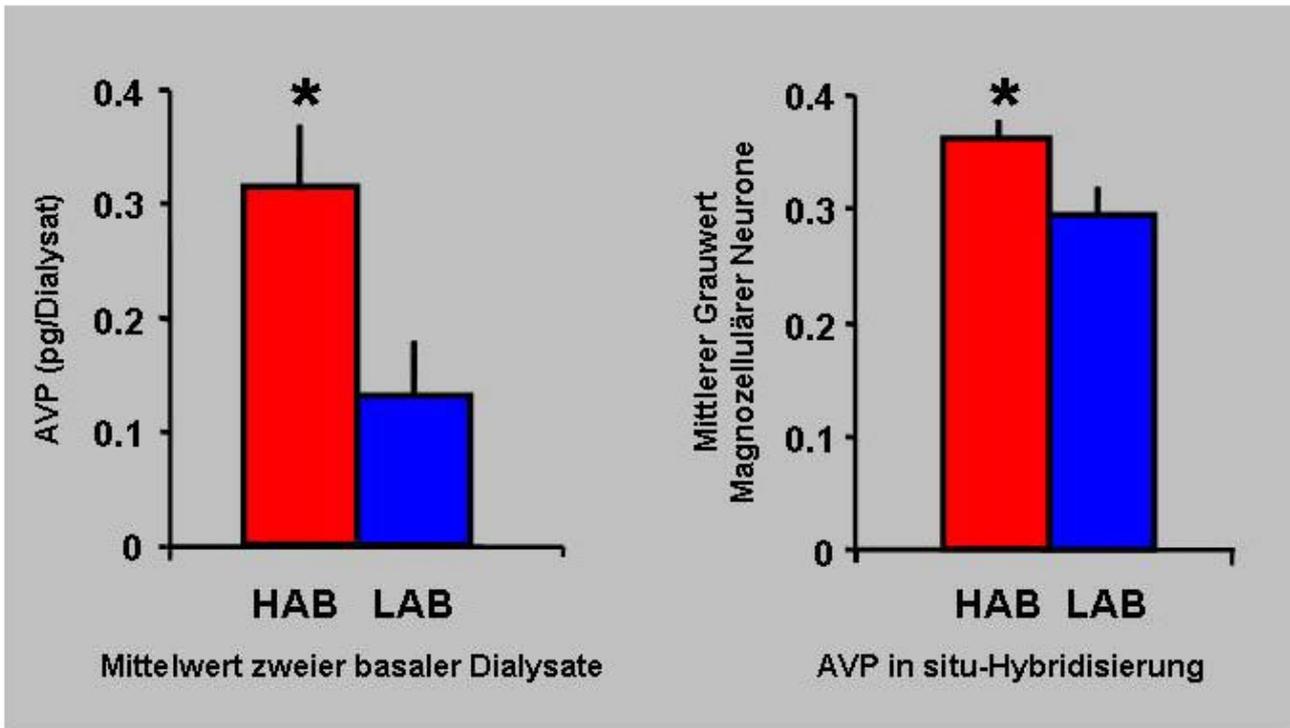
**Abbildung 3.2:** Plasmakonzentrationen von ACTH und Kortikosteron von HAB-Ratten, die entweder mit Trägersubstanz (rote Linie; n = 19) oder V<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten (gelbe Linie; n = 13) behandelt wurden, zwischen 18.30 und 20.40 Uhr während des kombinierten DEX/CRH-Tests. Alle Ratten wurden mit DEX (30 µg/kg i.v.) um 12.00 Uhr vorbehandelt. Der V<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist (10 µg/kg i.v.) oder die Trägersubstanz wurden um 19.15 Uhr (Pfeil) injiziert, 15 Minuten bevor CRH (50 ng/kg i.v.) um 19.31 Uhr (Pfeil) verabreicht wurde. Die Daten werden als Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 versus die entsprechenden Werte für die mit dem V<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten behandelten HAB-Tiere. # P < 0,05; ## P < 0,01 versus basal.

### **3.1.3 Basale Freisetzung von AVP im PVN bei HAB- und LAB-Ratten**

Der durchschnittliche AVP Gehalt zweier aufeinanderfolgender, aus dem PVN gesammelten Dialysate war zwischen HAB- und LAB-Tieren signifikant unterschiedlich ( $P < 0,05$ ). HAB-Ratten zeigten höhere basale Konzentrationen (Abbildung 3.3.).

### **3.1.4 Expression von AVP-mRNA im PVN von HAB- und LAB-Ratten**

Nur einige wenige verstreute Silberkörner waren in den parvozellulären Neuronen des AVP synthetisierenden PVN von unter Basalbedingungen dekapitierten HAB- und LAB-Tieren zu finden. Im magnozellulareren Teil des PVN von HAB-Tieren waren die mittleren Grauwerte hingegen signifikant höher als bei LAB-Tieren (Abbildung 3.3;  $P < 0,05$ ).



**Abbildung 3.3:** Linkes Diagramm: AVP-Gehalt fortlaufend gesammelter, 30-minütiger Dialysate (Mittelwert der Dialysate 1 und 2) aus dem PVN freilaufender HAB- (n = 6) und LAB-Ratten (n = 8). Rechtes Diagramm: Quantitative Analyse des in situ Hybridisierungssignals von AVP-mRNA des magnozellulären Anteils des PVN von HAB- (n = 6) und LAB-Raten (n = 8). Die Daten werden dargestellt als Mittelwerte ± Standardfehler. \* P < 0,05 versus LAB.

### 3.1.5 Immunhistochemie

Es ließen sich weder in der äußeren, noch in der inneren Zone der Eminentia mediana Unterschiede in der Immunreaktivität gegenüber AVP zwischen HAB- und LAB-Ratten feststellen.

### 3.1.6 Kortikosteroid-Rezeptorbindung im Gehirn und in der Hypophyse

Es zeigten sich weder für den Mineralokortikoidrezeptor (MR) noch für den Glukokortikoidrezeptor (GR) bezüglich Bindungskapazität ( $B_{max}$ ) und Bindungsaffinität ( $K_d$ ) Unterschiede zwischen HAB- und LAB-Ratten.

**Tabelle 3.1:** Mineralo- und Glukokortikoidrezeptoren

	MR (fmol/mg)	MR $K_d$ (nM)	GR (fmol/mg)	GR $K_d$ (nM)
<b>Hippocampus</b>				
HAB	95±11	0,26	194±7	1,18
LAB	107±9	0,23	201±7	1,08
<b>Hypothalamus</b>				
HAB	-	-	213±10	-
LAB	-	-	199±11	-
<b>HVL</b>				
HAB	-	-	144	1,96
LAB	-	-	150	1,97

Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt; n = 10-11. Rezeptorbindungskapazität  $B_{max}$  in fmol/mg Protein. Zur Durchführung der  $^3H$ -Steroid-Bindungsassays wurden aufgrund der geringen Gewebemengen die Hypothalami und das Gewebe der Hypophysenvorderlappen (HVL) der einzelnen Gruppen gepoolt, für die restlichen Gewebe wurden Einzelmessungen durchgeführt. Der Mineralokortikoidrezeptor (MR) wurde nur im Hippocampus bestimmt, da er vor allem in dieser Region eine wichtige Rolle spielt.

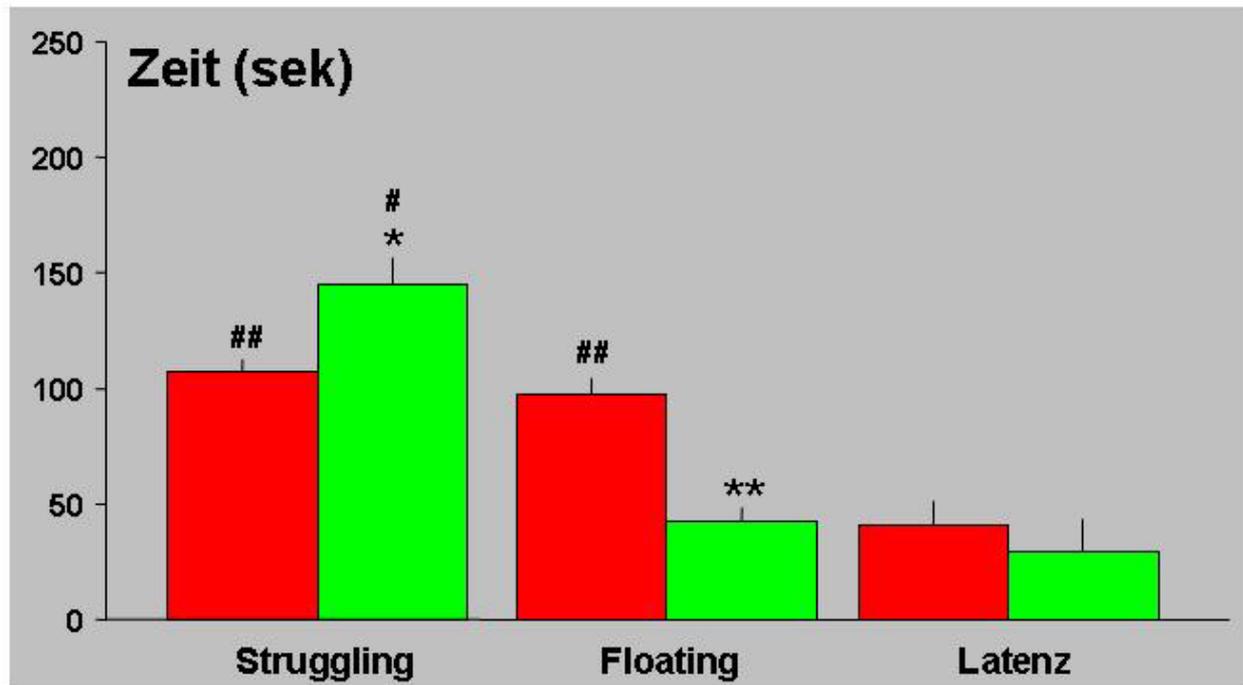
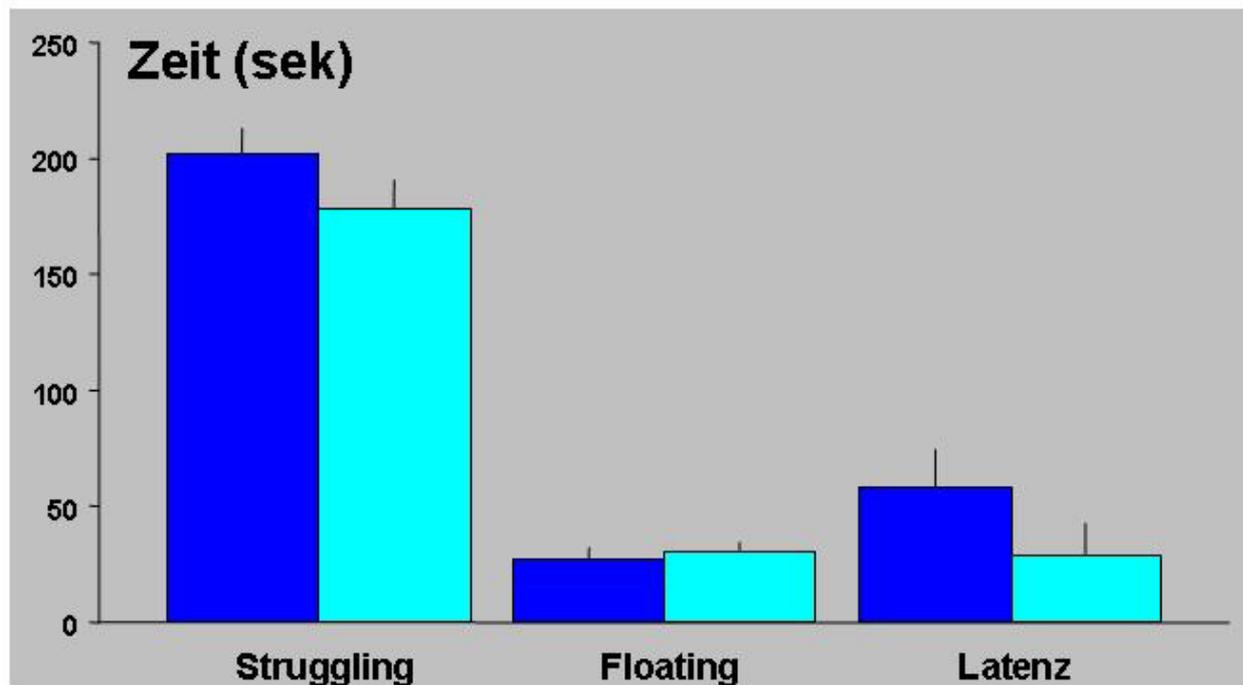
## **3.2 Langzeitbehandlung mit Paroxetin**

Alle Versuchstiere konnten in die statistische Auswertung einbezogen werden, da bei der postmortem durchgeführten Untersuchung der Organe keine pathologischen Veränderungen zu finden waren. Bei der wöchentlichen Gewichtskontrolle der Ratten zeigten sich keine Unterschiede in der Gewichtszunahme zwischen den verschiedenen Gruppen. Der Zusatz von Paroxetin zum Trinkwasser führte während der ersten drei Wochen zu einer leichten Abnahme der täglichen Wasseraufnahme, diese Reduzierung erlangte allerdings keine statistische Signifikanz. Die Plasmakonzentration von Paroxetin war bei HAB- und LAB-Tieren ähnlich ( $60 \pm 2$  ng/ml und  $58 \pm 4$  ng/ml).

### **3.2.1 Forced Swimming**

Eine Zweiweg-ANOVA (Zuchtlinie x Behandlung) enthüllte signifikante Unterschiede zwischen den Zuchtlinien für die Parameter Struggling ( $F_{1,36} = 39,7$ ;  $P < 0,0001$ ) und Floating ( $F_{1,36} = 63,9$ ;  $P < 0,0001$ ), mit einer signifikanten Interaktion mit dem Faktor Behandlung für die Parameter Struggling ( $F_{1,36} = 9,31$ ;  $P = 0,0043$ ) und Floating ( $F_{1,36} = 31,6$ ;  $P < 0,0001$ ). Die post-hoc-Analyse ergab, dass die mit Paroxetin behandelten HAB-Tiere signifikant mehr Struggling- ( $P < 0,05$ ) und weniger Floating-Verhalten ( $P < 0,01$ ) zeigten als mit Vehikel behandelte HAB-Kontrolltiere. Hinsichtlich des Floating-Verhaltens ließen sich die mit Paroxetin behandelten HAB-Ratten nicht von den LAB-Ratten unterscheiden.

Abbildung 3.4 zeigt den Einfluss von einer Langzeitbehandlung mit Paroxetin auf das Schwimmverhalten von HAB- und LAB-Tieren im Forced Swim-Test:

**A****B**

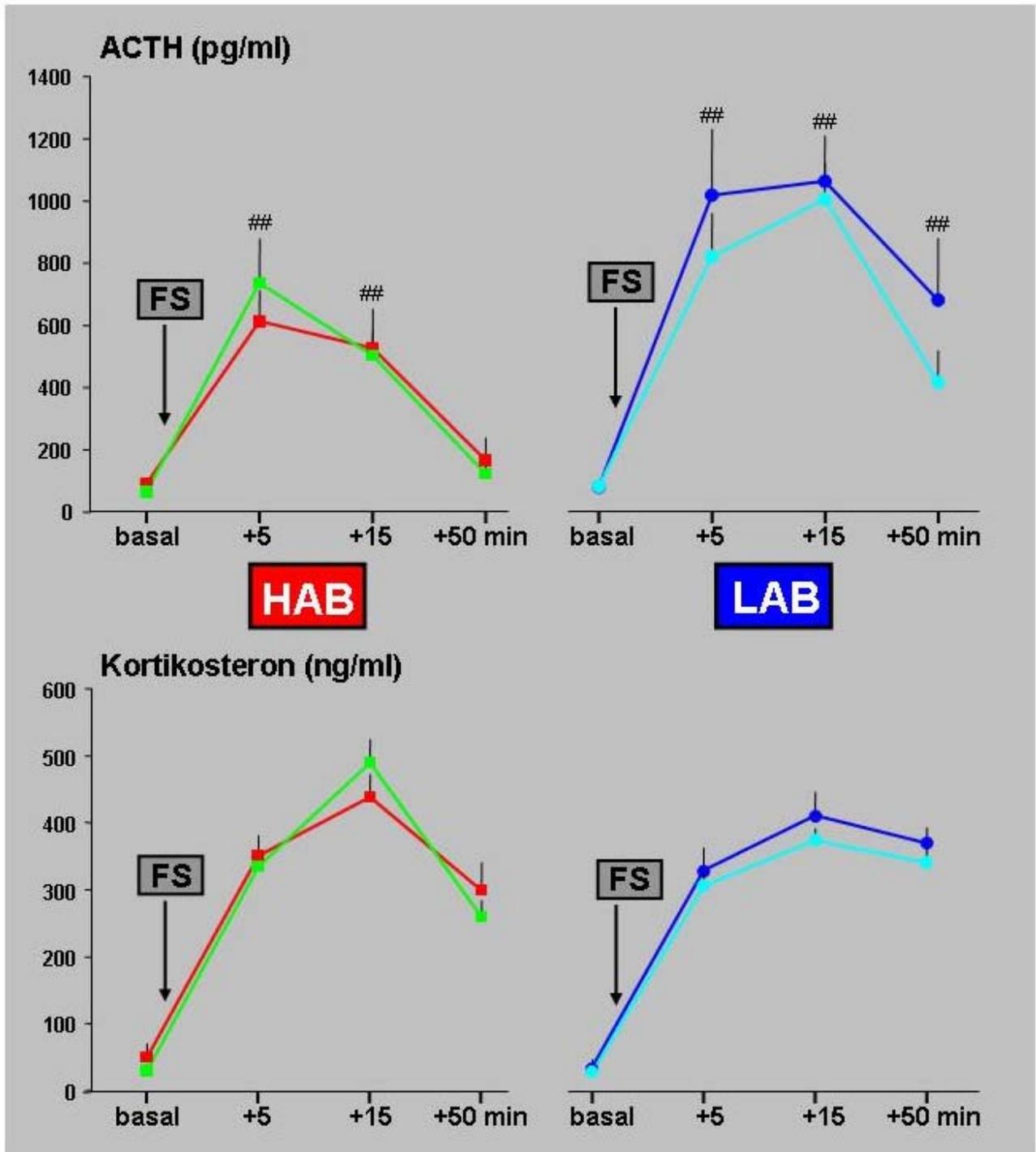
**Abbildung 3.4:** Ergebnisse der Verhaltenstestung im Forced Swim-Test von HAB- (obere Grafik: Kontrolltiere, rote Balken, Paroxetin, hellgrüne Balken) und LAB-Tieren (untere Grafik: Kontrolltiere, blaue Balken, Paroxetin, hellblaue Balken) (n = 10 pro Gruppe). Gezeigt wird die Zeit in Sekunden, die während des fünfminütigen Tests mit Struggling und Floating verbracht wurde, beispielsweise die Latenz bis zur ersten Floating-Reaktion. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  gegen die mit Paroxetin behandelte HAB-Ratten; #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$  gegen LAB-Ratten.

## Open Field

Im Open Field hatte die Langzeitbehandlung mit Paroxetin keinen Einfluss auf die lokomotorische Aktivität (HAB: Kontrolltiere,  $4,5 \pm 0,7$ ; Paroxetin,  $3,1 \pm 0,9$ ; LAB: Kontrolltiere,  $5,2 \pm 0,5$ ; Paroxetin,  $4,4 \pm 0,8$  Linienübertritte).

### **3.2.2 Effekte der Langzeitbehandlung mit Paroxetin auf die basale und die stressvermittelte Aktivität des HPA-Systems**

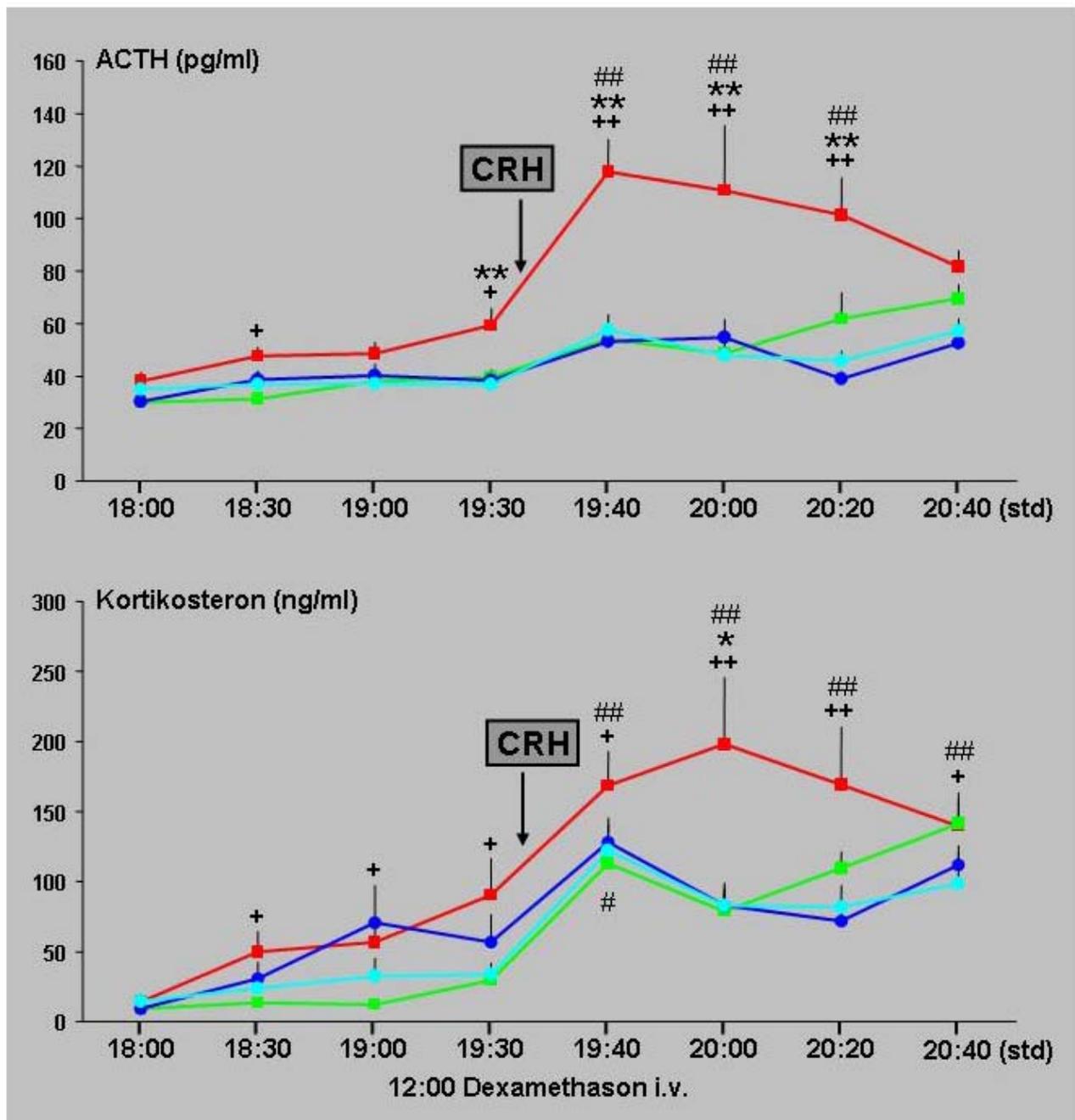
Die basalen Plasmakonzentrationen von ACTH (HAB: Kontrolle,  $91,4 \pm 18,8$  pg/ml; Paroxetin,  $64,9 \pm 14,2$  pg/ml; LAB: Kontrolle,  $80,3 \pm 8$  pg/ml; Paroxetin,  $83,2 \pm 6,9$  pg/ml) und Kortikosteron (HAB: Kontrolle,  $49,8 \pm 20,8$  ng/ml; Paroxetin,  $29,5 \pm 5,5$  ng/ml; LAB: Kontrolle,  $35,6 \pm 10,7$  ng/ml; Paroxetin,  $27,8 \pm 9,4$  ng/ml) waren bei Vehikel- und Paroxetin-behandelten HAB- und LAB-Tieren vergleichbar. Forcierter Schwimmstress verursachte einen signifikanten Anstieg von ACTH (Dreiweg-ANOVA [Zuchtlinie x Behandlung x Zeit], Faktor: Zeit;  $F_{3,108} = 83,6$ ,  $P < 0,0001$ ) und Kortikosteron ( $F_{3,108} = 269,4$ ,  $P < 0,0001$ ) im Plasma bei allen Gruppen. Die Plasmakonzentrationen von ACTH und Kortikosteron 5, 15 und 50 Minuten nach dem forcierten Schwimmstress waren statistisch zwischen den Gruppen nicht zu unterscheiden.



**Abbildung 3.5:** Dargestellt wird der Einfluss von Schwimmstress (5 Minuten Forced Swimming) auf die Ausschüttung von ACTH (obere Grafik) und Kortikosteron (untere Grafik) ins Plasma bei Kontroll- (HAB, rote, LAB, blaue Linie) und mit Paroxetin behandelten (HAB, hellgrüne, LAB, hellblaue Linie) männlichen HAB- (Quadrate, linke Seite) und LAB-Ratten (Kreise; rechte Seite, n = 10 pro Gruppe). Dargestellt werden die Daten als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. ## P < 0,01 gegen basal.

### 3.2.3 Dexamethason/CRH-Test

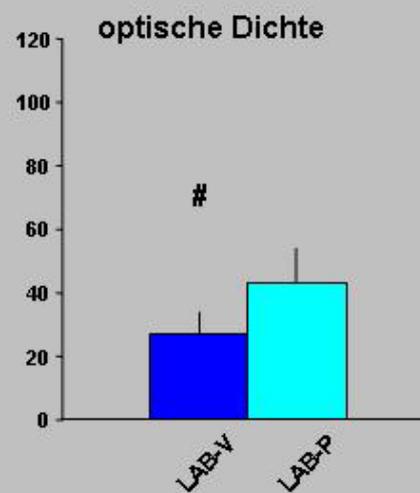
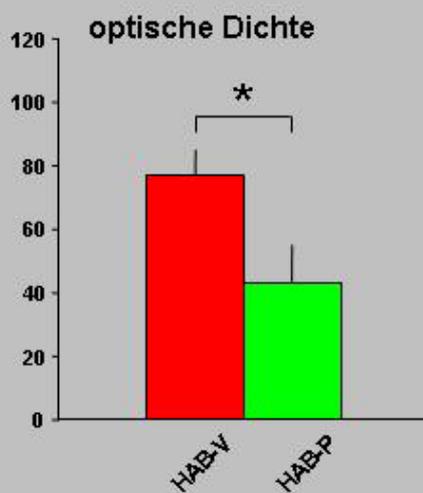
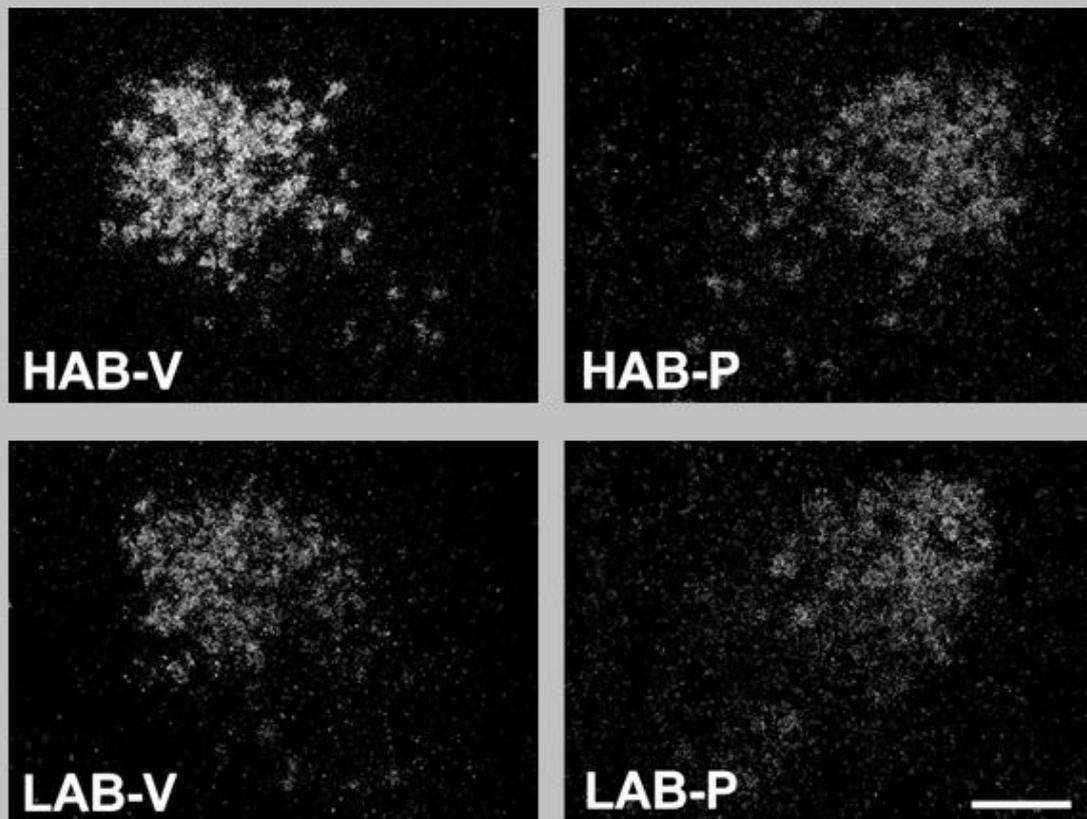
Nach Injektion von CRH war die Ausschüttung von ACTH bei vehikelbehandelten HAB-Tieren signifikant größer als bei vehikelbehandelten LAB-Tieren (Dreiweg-ANOVA [Zuchtlinie x Behandlung x Zeit];  $F_{7,252}=5,49$ ,  $P < 0,0001$ ; siehe Abbildung 3.6). Dies spiegelte sich ebenfalls in größeren AUC-Werten wider (HAB:  $3714 \pm 779$ ; LAB:  $736 \pm 141$ ;  $P < 0,01$ ). Der maximale Anstieg der Plasmakonzentration von Kortikosteron nach Stimulation mit CRH war ebenfalls signifikant größer bei vehikelbehandelten HAB-Tieren als bei LAB-Tieren (Zuchtlinie x Zeit;  $F_{7,252}=3,17$ ,  $P = 0,0031$ ). Auch hier zeigten sich größere AUC-Werte (HAB:  $6440 \pm 385$ ; LAB:  $5627 \pm 258$ ;  $P < 0,05$ ). Die basalen Plasmakonzentrationen von ACTH und Kortikosteron zwischen 18.30h und 19.30h unterschieden sich signifikant zwischen den mit Paroxetin-behandelten HAB-Tieren und HAB-Kontrolltieren ( $P < 0,05$ ). In ähnlicher Weise dämpfte die Behandlung mit Paroxetin den durch CRH-stimulierten Anstieg der Ausschüttung von ACTH und Kortikosteron ( $P < 0,01$ , beziehungsweise  $P < 0,05$ ). Auch dieser Effekt ließ sich durch kleinere AUC-Werte für ACTH untermauern (Kontrolltiere:  $3714 \pm 779$ ; Paroxetin:  $1793 \pm 483$ ;  $P < 0,01$ ). Zwischen Paroxetin-behandelten LAB-Tieren und LAB-Kontrolltieren ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied nachweisen (siehe Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6:** Gezeigt werden die Plasmakonzentrationen von ACTH (obere Grafik) und Kortikosteron (untere Grafik) von Kontroll- (HAB, rote, LAB, blaue Linie) und Paroxetin-behandelten (HAB, hellgrüne, LAB, hellblaue Linie) HAB- (Quadrate) und LAB-Tieren (Kreise; n = 10 pro Gruppe) zwischen 18:30 h und 20:40 h während des kombinierten Dexamethason/CRH-Test. Alle Tiere wurden mit Dexamethason (30 µg/kg i.v.) um 12:00 h vorbehandelt. Die Daten sind als Mittelwerte + Standardfehler dargestellt. # P < 0,05, ## P < 0,01 gegen basal; \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 gegen LAB; + P < 0,05, ++ P < 0,01 gegen Paroxetin-behandelte HAB-Tiere.

### **3.2.4 Wirkung von Paroxetin auf die Genexpression von AVP im Nucleus paraventricularis**

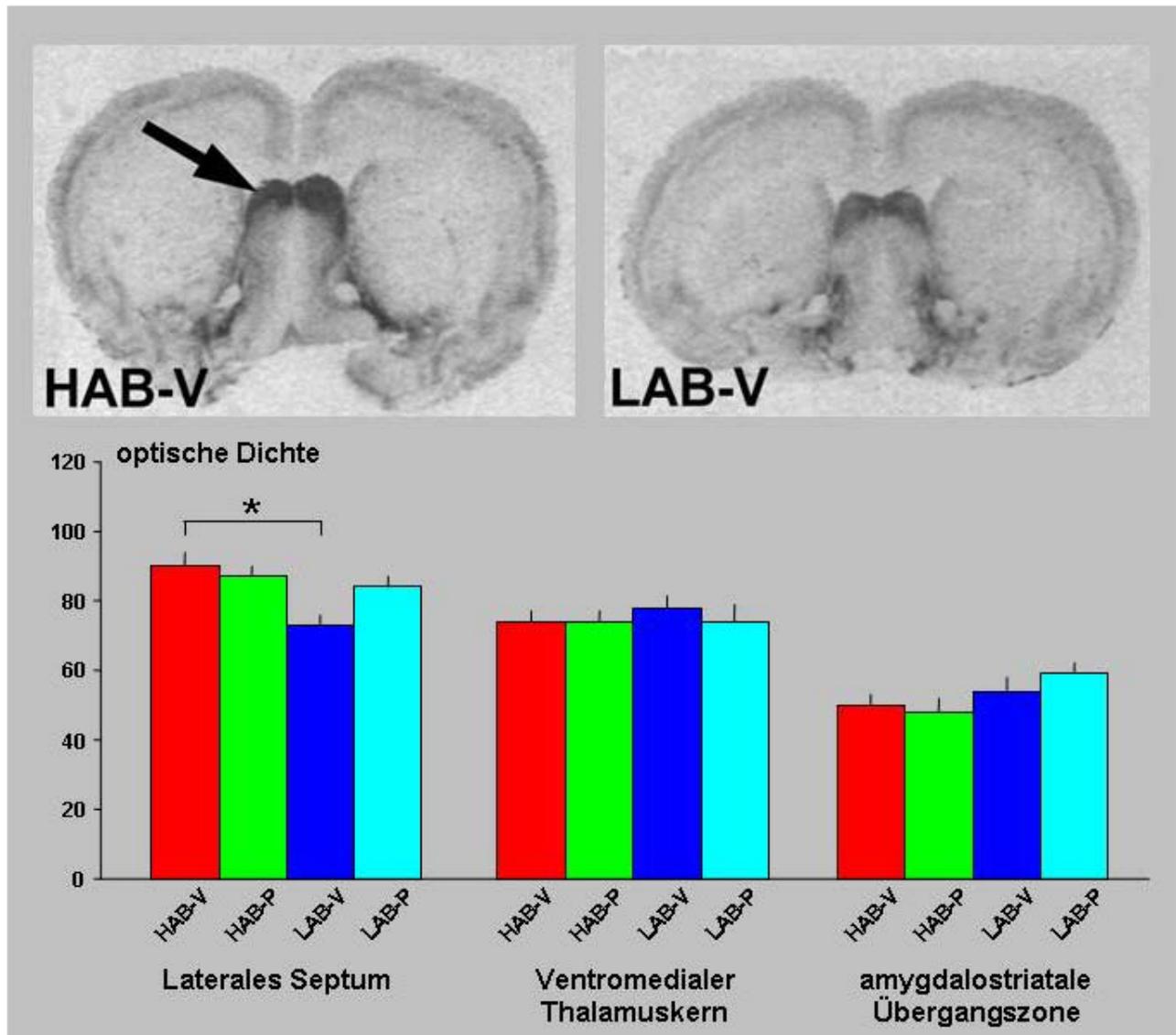
In den parvozellulären AVP-synthetisierenden Neuronen des PVN der Vehikel- und Paroxetin-behandelten Tiere, welche unter basalen Bedingungen dekapitiert wurden, fand sich nur ein schwaches Hybridisierungssignal. Im Gegensatz dazu war die Dichte der Silberkörner pro Zelle im magnozellularen Teil des PVN bei HAB-Kontrolltieren signifikant höher als bei LAB-Tieren (Kruskal-Wallis ANOVA, gefolgt vom Mann-Whitney U-Test;  $P < 0,01$ ) und normalisiert bei Paroxetin-behandelten HAB-Tieren ( $P < 0,05$ ;  $n = 6$  pro Gruppe) (siehe Abbildung 3.7). Kein Unterschied zeigte sich zwischen behandelten und unbehandelten LAB-Tieren. Es ließ sich ebenfalls kein Unterschied der AVP-Genexpression in den magnozellularen Neuronen des SON zwischen den Gruppen feststellen.



**Abbildung 3.7:** AVP-mRNA *in situ* Hybridisierung. Obere Grafik: Repräsentative Schnitte zeigen den PVN im Hypothalamus (Dunkelfeld). Die Dichte der Silberkörner pro Zelle im magnozellularären Teil des PVN war bei HAB-Kontrolltieren (HAB-V) signifikant höher als bei LAB-Tieren und wurde durch die Behandlung mit Paroxetin bei HAB-Tieren (HAB-P) vermindert ( $n = 6$  pro Gruppe). Es ließ sich kein Unterschied zwischen LAB-Kontrolltieren (LAB-V) und mit Paroxetin behandelten LAB-Tieren (LAB-P) feststellen. Die Größe des Maßstabsbalken beträgt  $100 \mu\text{m}$ . Untere Grafik: Quantitative Ermittlung der optischen Dichte pro Zelle. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt. \*  $P < 0,05$ , gegen Paroxetin-behandelte HAB-Tiere. #  $P < 0,05$  gegen HAB-Kontrolltiere.

### **3.2.5 V<sub>1a</sub>-Rezeptorautoradiographie bei Vehikel- und Paroxetin-behandelten HAB- und LAB-Tieren**

Im lateralen Septum fanden sich mehr spezifisch markierte V<sub>1a</sub>-Bindungsstellen bei den HAB-Kontrolltieren als bei den LAB-Tieren ( $P < 0,05$ ) (siehe Abbildung 3.8). In allen anderen untersuchten Hirnregionen ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschieden zwischen HAB- und LAB-Tieren feststellen. Die Behandlung mit Paroxetin hatte weder bei HAB- noch bei LAB-Tieren einen Einfluss auf die Expression von V<sub>1a</sub>-Rezeptoren.



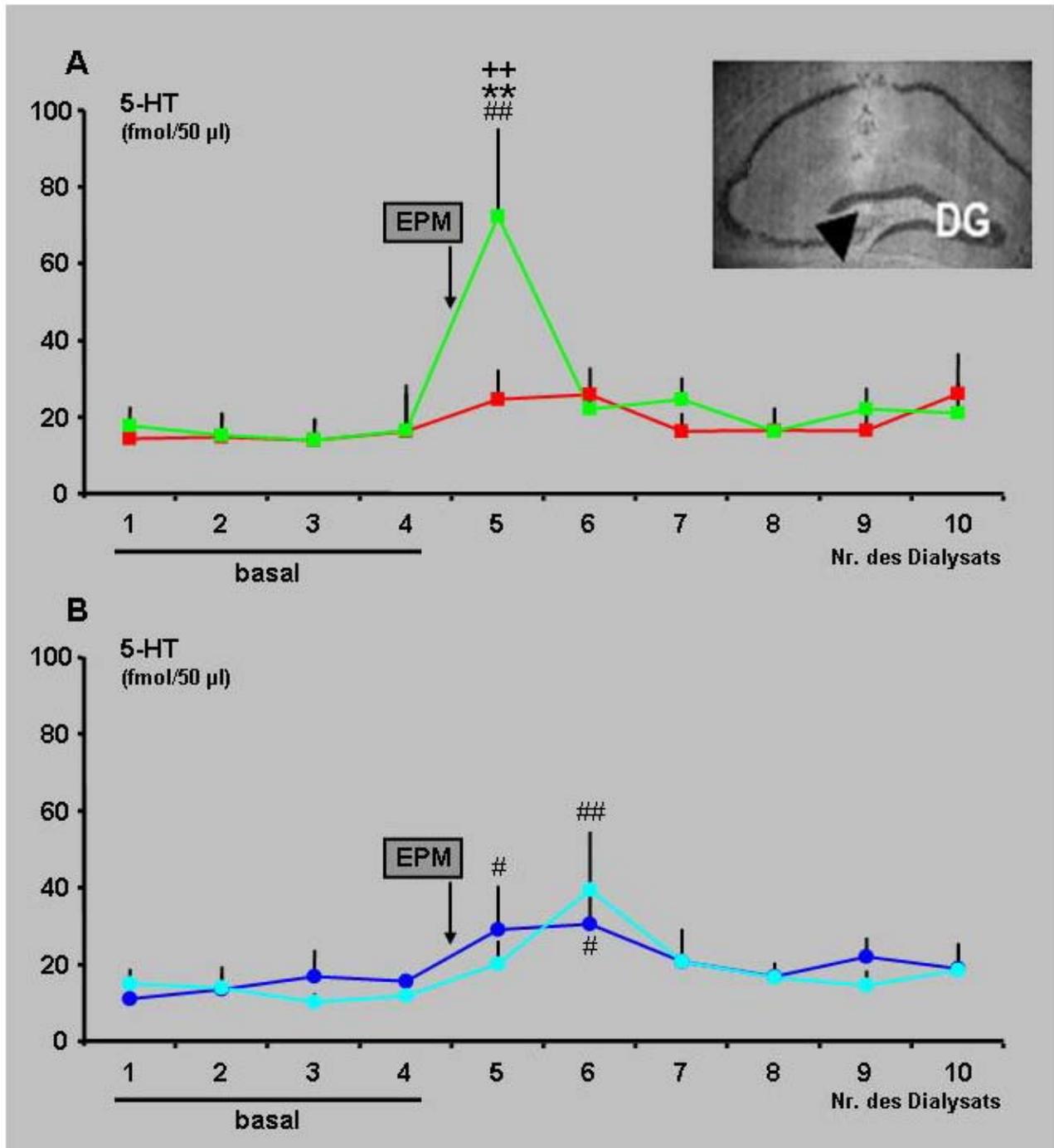
**Abbildung 3.8:** V<sub>1a</sub>-Rezeptorautoradiografie. Obere Tafel: die repräsentative Autoradiografie zeigt bei HAB-Kontrolltieren (HAB-V) im Vergleich zu LAB-Tieren (LAB-V) mehr spezifisch markierte V<sub>1a</sub>-Bindungsstellen im lateralen Septum (Pfeil). In den anderen untersuchten Hirnregionen ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen HAB- und LAB-Tieren feststellen. Die Behandlung mit Paroxetin hatte keinen Einfluss auf die Expression von V<sub>1a</sub>-Rezeptoren, weder bei HAB- (HAB-P) noch bei LAB-Tieren (LAB-P). Untere Grafik: Quantitative Bestimmung der Dichte von spezifischer V<sub>1a</sub>-Bindung. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt. \* P < 0,05 gegen HAB Kontrolltiere.

### **3.2.6 Einfluß der Langzeitbehandlung mit Paroxetin auf die Freisetzung von Serotonin im Hippocampus von HAB- und LAB-Ratten**

Die basale Freisetzung von Serotonin im Hippocampus war in allen Gruppen vergleichbar (gemittelte Basalwerte 1-4: HAB: vehicle:  $16,1 \pm 1,2$ ; Paroxetin:  $15,9 \pm 1,4$  fmol/sample; LAB: vehicle:  $15,1 \pm 1,9$ ; Paroxetin:  $13,7 \pm 1,5$  fmol/sample). Für die stressinduzierte Freisetzung zeigte eine Dreiweg-ANOVA (Zuchtlinie x Behandlung x Zeit) einen signifikanten Einfluß des Faktors Zeit ( $F_{9,252} = 7,3$ ;  $P < 0,0001$ ), eine signifikante Interaktion zwischen den Faktoren Behandlung und Zeit ( $F_{9,216} = 2,9$ ;  $P = 0,003$ ) und eine signifikante Interaktion aller drei Faktoren ( $F_{9,216} = 3,2$ ;  $P = 0,0013$ ).

Emotionaler Stress führte bei paroxetinbehandelten HAB-Ratten zu einem signifikanten Anstieg der Serotoninkonzentrationen im Hippocampus während des fünften Mikrodialysates ( $P < 0,01$ ; Abbildung 3.9). Bei unbehandelten Tieren hingegen hatte emotionaler Stress keinen Einfluß auf die Serotoninfreisetzung im Hippocampus.

Sowohl behandelte als auch unbehandelte LAB-Tiere zeigten nach emotionalem Stress einen kleinen, aber signifikanten Anstieg der Serotoninkonzentrationen ( $P < 0,05$ ; Abbildung 3.9). Paroxetinbehandelte LAB-Tiere zeigten einen signifikanten Anstieg der hippocampalen Serotoninfreisetzung während des sechsten Dialysates ( $P < 0,01$ ); unbehandelte LAB-Tiere während des fünften und sechsten Dialysates ( $P < 0,05$ ). Paroxetinbehandelte LAB-Ratten unterschieden sich von paroxetinbehandelten HAB-Ratten ( $P < 0,01$ ).

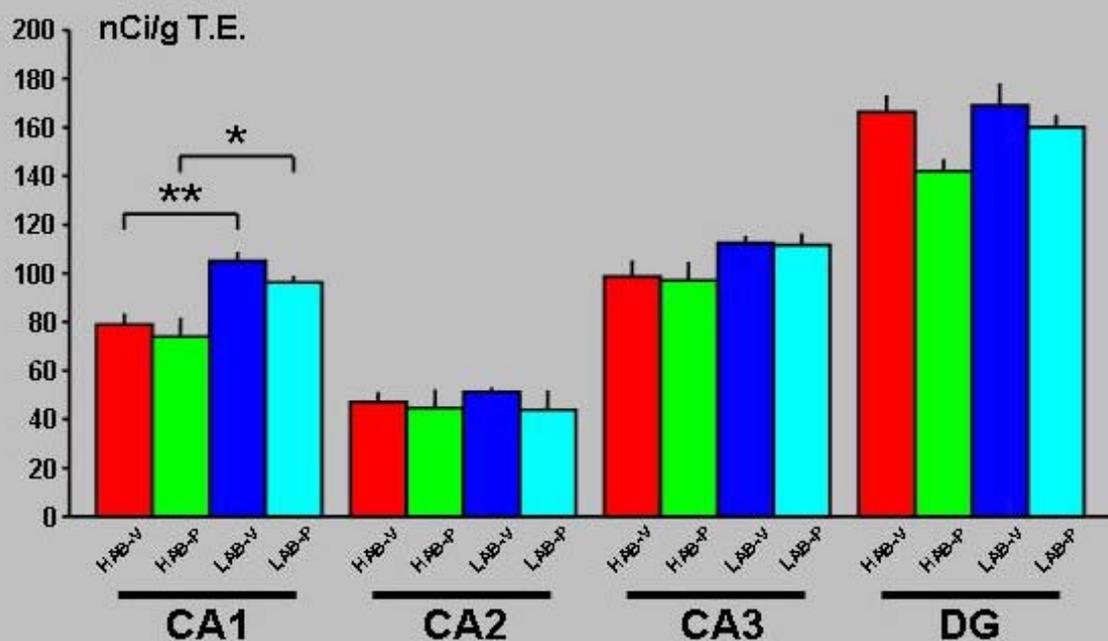
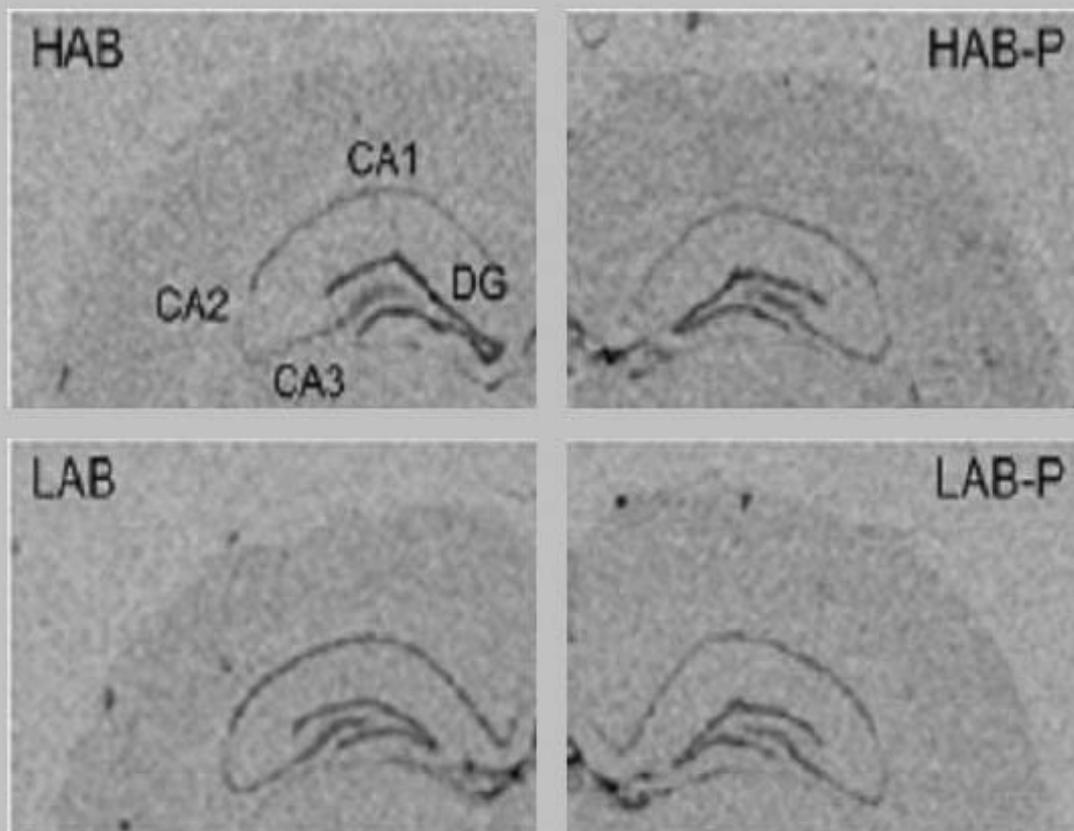


**Abbildung 3.9: (A)** Auswirkungen von fünfminütiger Exposition auf dem Elevated plus-maze (EPM) auf den Serotoningehalt fortlaufend gesammelter 30 min Dialysaten aus dem rechten dorsalen Hippocampus männlicher paroxetinbehandelter ( $n = 8$ ; hellgrüne Linie) und unbehandler ( $n = 7$ ; rote Linie) HAB-Tiere. Mittelwerte  $\pm$  SEM. ++  $P < 0,01$  versus LAB; \*\*  $P < 0,01$  versus unbehandelte Tiere; ###  $P < 0,01$  versus basal.

**(B)** Auswirkungen von fünfminütiger Exposition auf dem Elevated plus-maze (EPM) auf den Serotoningehalt fortlaufend gesammelter 30 minütiger Dialysate aus dem rechten dorsalen Hippocampus männlicher paroxetinbehandelter ( $n = 7$ ; hellblaue Linie) und unbehandler ( $n = 6$ ; blaue Linie) LAB-Tiere. Mittelwerte  $\pm$  SEM. ##  $P < 0,01$ ; #  $P < 0,05$  versus basal.

### **3.2.7 Paroxetin hat keinen Einfluss auf die unterschiedliche 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorgenexpression im Hippocampus bei HAB- und LAB-Ratten**

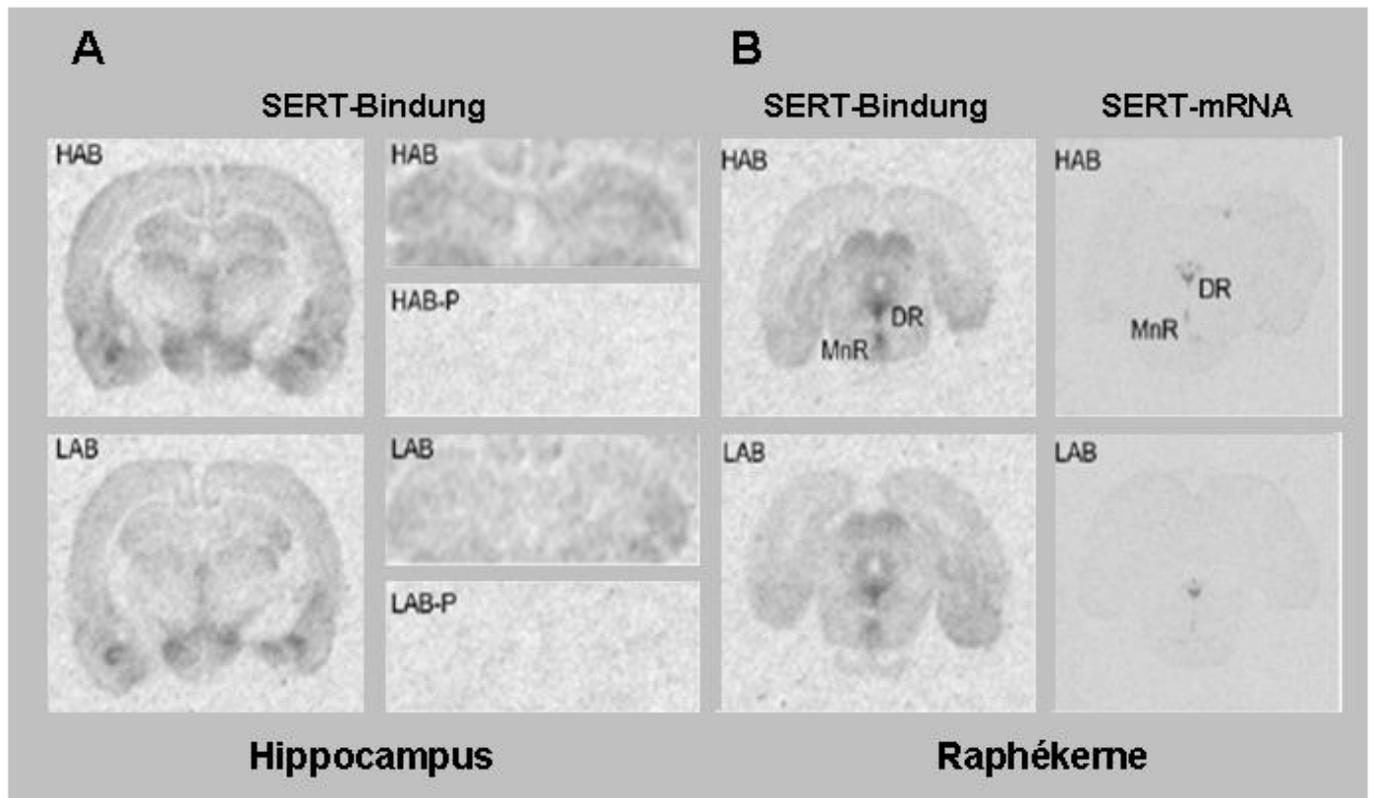
Es zeigte sich die vormals beschriebene charakteristische Verteilung von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor mRNA in DR, MnR und Hippocampus (Burnet, Mead et al. 1995). Starke Hybridisierungssignale fanden sich in DR, MnR, Gyrus dentatus (DG), CA1 und CA3, in CA2 fanden sich etwas niedrigere Werte (Abbildung 3.10). Während sich die Menge der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor mRNA in DR (HAB:  $77 \pm 6$  nCi/g *tissue equivalent*; LAB:  $71 \pm 8$  nCi/g *tissue equivalent*) oder MnR (HAB:  $55 \pm 6$  nCi/g *tissue equivalent*; LAB:  $42 \pm 7$  nCi/g *tissue equivalent*) nicht unterschieden, ließ sich bei HAB-Ratten in der CA1-Region im Hippocampus (HAB:  $79 \pm 5$  nCi/g *tissue equivalent*; LAB:  $105 \pm 2$  nCi/g *tissue equivalent*;  $P < 0,01$ ) weniger 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor mRNA messen. Dieser Unterschied blieb nach Langzeitbehandlung mit Paroxetin bestehen (HAB:  $74 \pm 8$  nCi/g *tissue equivalent*; LAB:  $96 \pm 3$  nCi/g *tissue equivalent*;  $P < 0,05$ ; Abbildung 3.10).



**Abbildung 3.10:** (a) Repräsentative Autoradiogramme von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-mRNA im Hippocampus. (b) Hybridisierungssignale in nCi/g tissue equivalent. Mittelwerte ± Standardfehler. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 versus HAB. HAB-V = unbehandelte HAB-Tiere, LAB-V = unbehandelte LAB-Tiere, HAB-P = Paroxetinbehandelte HAB-Tiere, LAB-P = Paroxetinbehandelte LAB-Tiere. CA1, CA2, CA3 = Untereinheiten des Hippocampus, DG = Gyrus Dentatus.

### 3.2.8 Erhöhte SERT-Bindungsstellen bei HAB-Tieren: Reduktion durch Langzeitbehandlung mit Paroxetin

Die Rezeptorautoradiographie mit [<sup>3</sup>H]Citalopram zeigte sowohl im Hippocampus (Benmansour, Cecchi et al. 1999; Hebert, Habimana et al. 2001) als auch in DR und MnR (Abb 3.11.) die typische Verteilung von SERT-Bindungsstellen. Bei HAB-Ratten waren die SERT-Bindungsstellen in DR (HAB: 302 ± 7 fM/mg *tissue equivalent*; LAB: 253 ± 8 fM/mg *tissue equivalent*; P < 0,01) und MnR (HAB: 283 ± 8 fM/mg *tissue equivalent*; LAB: 220 ± 15 fM/mg *tissue equivalent*; P < 0,01; Abb 3.10) erhöht, während sich in diesen Hirnarealen bei beiden Zuchtlinien die gleiche Menge an SERT-mRNA fand (DR: HAB: 135 ± 6 nCi/g *tissue equivalent*; LAB: 145 ± 6 nCi/g *tissue equivalent*; MnR: HAB: 197 ± 21 nCi/g *tissue equivalent*; LAB: 177 ± 13 nCi/g *tissue equivalent*; Abb 3.11). Entsprechend war die Gesamtexpression von SERT-Bindungsstellen im Hippocampus bei HAB-Tieren gegenüber LAB-Tieren erhöht (HAB: 66 ± 3 fM/mg *tissue equivalent*; LAB: 48 ± 3 fM/mg *tissue equivalent*; P < 0,01). Chronische Behandlung mit Paroxetin führte bei beiden Linien zu einer Reduktion der hippocampalen SERT-Bindungsstellen (HAB: 9 ± 1 fM/mg *tissue equivalent*; LAB: 14 ± 1 fM/mg *tissue equivalent*). Bei HAB-Ratten war die Reduktion größer als bei LAB-Ratten (- 56 % ± 3 fM/mg *tissue equivalent* (- 86 %) versus - 34 ± 3 fM/mg *tissue equivalent* (- 71 %); P < 0,001).

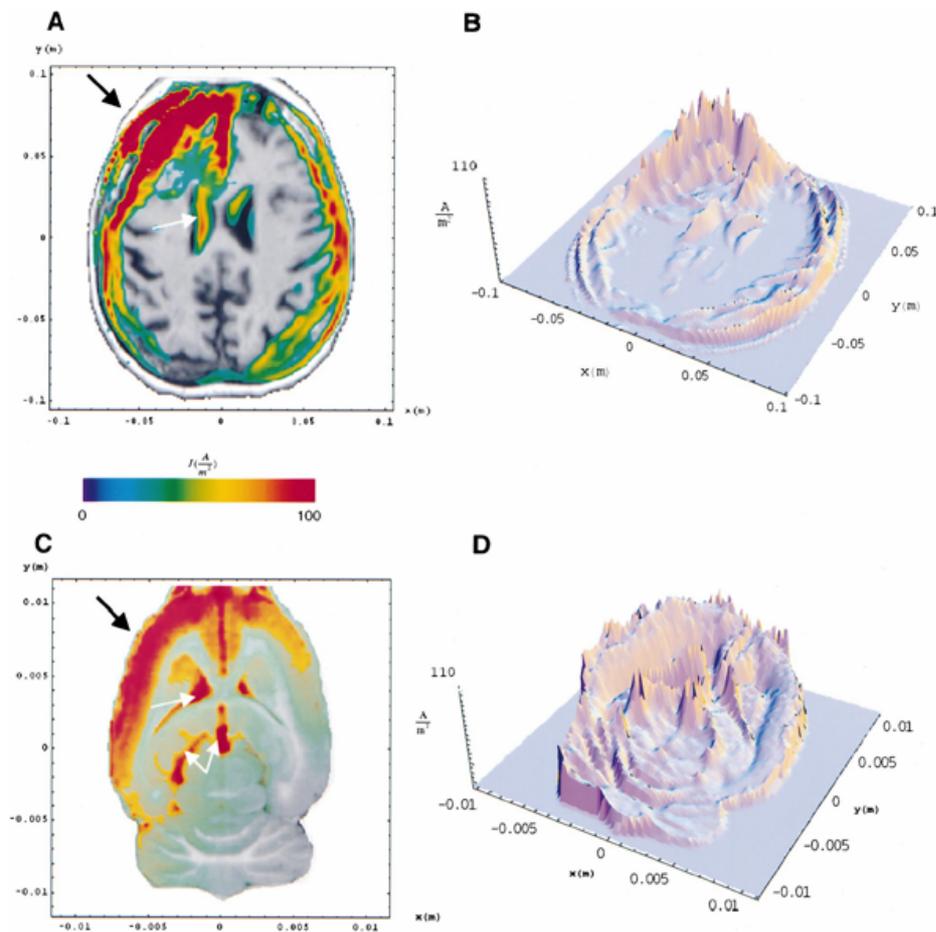


**Abbildung 3.11:** (a) SERT-Bindungsstellen im Hippocampus von HAB- und LAB-Ratten, sichtbar gemacht mit Hilfe von  $[^3\text{H}]$ Citalopram. Links: SERT-Expression im Hippocampus unbehauelter HAB- und LAB-Ratten in niedriger Vergrößerung. Rechts: Hippocampale SERT-Bindungsstellen unbehauelter und Paroxetinbehauelter HAB- und LAB-Tiere in stärkerer Vergrößerung. (b) Repräsentative Autoradiogramme von SERT-Bindungsstellen und SERT-mRNA im dorsalen und medianen Raphékern von HAB- und LAB-Ratten. HAB-V = unbehauelte HAB-Tiere, LAB-V = unbehauelte LAB-Tiere, HAB-P = Paroxetinbehauelte HAB-Tiere, LAB-P = Paroxetinbehauelte LAB-Tiere. DR: dorsaler Raphékern; MnR: medianer Raphékern.

### **3.3 rTMS bei HAB- und LAB-Tieren**

#### **3.3.1 Berechnete Stromdichteverteilung**

Abbildung 3.12 zeigt die berechnete, durch rTMS induzierte Stromdichteverteilung in einem Transversalschnitt des Gehirns der Ratte beziehungsweise des Menschen. Die Stimulationsparameter für das menschliche Gehirn wurden so gewählt, dass sie das in der Klinik gebräuchlichste Setup simulieren. Zur Berechnung der Stromdichteverteilung im Gehirn der Ratte benutzten wir die in unseren Experimenten verwendeten Stimulationsparameter.



**Abbildung 3.12:** Räumliche Verteilung der durch rTMS induzierten intrazerebralen Stromdichte in Transversalschnitten des Menschen- (links) und Rattengehirns (rechts). Human: Maximale Stromintensität der Stimulationsspule  $I_{\max} = 4000$  A. Kommerzielle „Figure 8“-Stimulationsspule (DANTEC/Medtronic), innerer Durchmesser (ID): 20 mm, äußerer Durchmesser (ÄD): 100 mm, 10 Windungen pro Spule. Hieraus resultierender maximaler magnetischer Induktionsmodulus am Spulenzentrum B: ca. 1,8 Tesla. Die Stimulationsspule ist der gebräuchlichsten klinischen Anwendung entsprechend um  $45^\circ$  in der xy- und yz-Ebene gedreht. Kontaktpunkt ist der linke dorsolaterale präfrontale Kortex. Durchschnittliche Stromdichte über den roten Abschnitten:  $92 \pm 1,5$   $A/m^2$ . Pfeile: Liquor mit größter Leitfähigkeit (1,6  $A/Vm$ ). Ratte:  $I_{\max} = 6000$  A. Runde Prototypenspule, ID: 6 mm, ÄD: 57 mm, 21 Windungen (DANTEC/Medtronic). B: ca. 4 Tesla. Die Stimulationsspule ist um  $45^\circ$  in der xy- und yz-Ebene gedreht. Kontaktpunkt ist der linke frontale Kortex. Durchschnittliche Stromdichte über den roten Abschnitten:  $97 \pm 0,6$   $A/m^2$ . Pfeile: Liquor. Das Stimulationsgerät wurde von DANTEC/Medtronic zur Verfügung gestellt.

### 3.3.2 Elevated plus-maze (EPM)

#### 3.3.2.1 Experiment 1, ohne simultane Blutentnahme

Eine Dreiweg-ANOVA (Zuchtlinie x Behandlung x Zeit) mit wiederholten Messungen des letzten Faktors bestätigte, dass HAB-Tiere prozentual weniger Eintritte in den offenen Arm ( $F_{1,38} = 64,20$ ;  $P < 0,0001$ ; Tabelle 3.2) und weniger Zeit auf dem offenem Arm ( $F_{1,38} = 135,9$ ;  $P < 0,0001$ ) der EPM machten, beziehungsweise verbrachten als LAB-Tiere, sowohl vor, als auch nach der Behandlung. Entsprechend war auch die Latenz bis zum ersten Eintritt in den offenen Arm bei HAB-Tieren (rTMS:  $200 \pm 37$  s; Kontrollen:  $252 \pm 32$  s) wesentlich länger als bei LAB-Tieren (rTMS:  $72,8 \pm 22$  s; Kontrollen:  $42,3 \pm 12$  s;  $F_{1,38} = 36,02$ ;  $P < 0,0001$ ). Die allgemeine lokomotorische Aktivität, gemessen an der Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme, war zwischen HAB- (rTMS:  $2,8 \pm 1,1$ ; Kontrollen:  $4,3 \pm 1,0$ ) und LAB-Tieren (rTMS:  $5,8 \pm 1,2$ ; Kontrollen:  $5,3 \pm 0,6$ ) nicht zu unterscheiden. Eine rTMS-bedingte Veränderung zeigte sich für den prozentualen Anteil der im offenen Arm verbrachten Zeit ( $F_{1,38} = 23,77$ ;  $P < 0,0001$ ). Die Interaktion der Faktoren Zuchtlinie ( $F_{1,38} = 23,67$ ;  $P < 0,0001$ ) und Behandlung ( $F_{1,38} = 7,77$ ;  $p < 0,0001$ ) war ebenfalls signifikant. Eine signifikante Interaktion aller drei Faktoren ergab sich für den prozentualen Anteil der Eintritte in den offenen Arm ( $F_{1,38} = 5,25$ ;  $p = 0,0276$ ) und der Zeit, die auf dem offenen Arm verbracht wurde ( $F_{1,38} = 8,37$ ;  $p = 0,0063$ ). Post-hoc-Analysen zeigten, dass die Behandlung mit rTMS bei LAB-Ratten zu einer Verminderung des prozentualen Anteils der Zeit auf dem offen Arm ( $P < 0,01$ ; Tabelle 3.2), führte. Jedoch bestanden die Unterschiede zwischen den Zuchtlinien HAB und LAB weiterhin.

**Tabelle 3.2:** Verhalten auf der Elevated plus-maze

<b>EPM %</b>	<b>rTMS</b>	<b>sham</b>
Zeit im offenen Arm; LAB	23,7 ± 3,3 <sup>**</sup> , <sup>##</sup>	42,4 ± 5,9 <sup>**</sup>
Zeit im offenen Arm; HAB	6,3 ± 4,0	3,6 ± 2,3
Eintritte offener Arm; LAB	33,0 ± 3,1 <sup>**</sup>	45,9 ± 2,3 <sup>**</sup>
Eintritte offener Arm; HAB	7,7 ± 4,6	14,5 ± 5,3

Mittelwerte ± SEM, <sup>\*\*</sup> P < 0,01 vs. HAB-Ratten; <sup>##</sup> P < 0,01 vs. Scheinbehandlung (sham)

### 3.3.2.2 Experiment 2, mit simultaner Blutentnahme

Eine Dreiweg-ANOVA (Zuchtlinie x Behandlung x Zeit) mit wiederholten Messungen des letzten Faktors ergab, dass HAB-Ratten prozentual weniger Eintritte in ( $F_{1,20} = 526,1$ ;  $P < 0,0001$ ) und weniger Zeit auf dem offenem Arm ( $F_{1,20} = 184,1$ ;  $P < 0,0001$ ) der EPM machten, beziehungsweise verbrachten als LAB-Tiere, sowohl vor als auch nach der Behandlung (Daten werden hier nicht gezeigt). Entsprechend war auch die Latenz bis zum ersten Eintritt in den offenen Arm bei HAB-Tieren (rTMS:  $219 \pm 50$  s; Kontrollen:  $300 \pm 0$  s) signifikant länger als bei den LAB-Ratten (rTMS:  $106 \pm 23$  s; Kontrollen:  $63 \pm 20$  s;  $F_{1,20} = 131,3$ ;  $P < 0,01$ ). Die allgemeine lokomotorische Aktivität, gemessen an der Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme, konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen HAB-(rTMS:  $3 \pm 0,6$ ; Kontrollen:  $2,8 \pm 1,6$ ) und LAB-Tieren (rTMS:  $5,2 \pm 1,2$ ; Kontrollen:  $4,8 \pm 0,4$ ) aufdecken. Eine signifikante Interaktion aller drei Faktoren zeigte sich bei den prozentualen Eintritten in ( $F_{1,20} = 7,02$ ;  $P = 0,0175$ ) und der Zeit, die auf dem offenen Arm verbracht wurde ( $F_{1,20} = 6,32$ ;  $P = 0,0229$ ). Post-hoc-Analysen ergaben, dass die Behandlung mit rTMS bei LAB-Ratten zu einer Verminderung der prozentualen Zeit, die auf dem offen Arm verbracht wurde (rTMS:  $22,8 \pm 1,2$ ; Kontrollen:  $34,3 \pm 1,3$ ;  $p < 0,01$ ), führte. Jedoch bestanden die Unterschiede zwischen den Zuchtlinien HAB und LAB weiterhin.

### 3.3.3 Forced Swimming

#### 3.3.3.1 Experiment 1, ohne simultane Blutentnahme

Eine Dreiweg-ANOVA (Zuchtlinie x Behandlung x Zeit) mit wiederholten Messungen des letzten Faktors ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Zuchtlinien in allen Parametern, bis auf den Verhaltensparameter Schwimmen, die vor und nach der Behandlung mit rTMS gemessen wurden (Struggling:  $F_{1,38} = 59,82$ ;  $P < 0,0001$ ; Floating:  $F_{1,38} = 357,9$ ;  $P < 0,0001$ ; Latenz bis zum ersten Floating:  $F_{1,38} = 78,20$ ;  $P < 0,0001$ ). Des Weiteren zeigte sich eine signifikante Interaktion des Faktors Behandlung mit der Struggling- ( $F_{1,38} = 16,41$ ;  $P = 0,0002$ ) und Floating-Zeit ( $F_{1,38} = 31,18$ ;  $P < 0,0001$ ). Eine signifikante Interaktion ließ sich auch für die Faktoren Behandlung und Zeit für Struggling ( $F_{1,38} = 29,39$ ,  $P < 0,0001$ ) und Floating ( $F_{1,38} = 48,12$ ;  $P < 0,0001$ ) feststellen. Für Floating zeigte sich zudem eine signifikante Interaktion aller drei Faktoren ( $F_{1,38} = 32,04$ ;  $P < 0,0001$ ). In der post-hoc-Analyse (Newman-Keuls) konnte für Struggling und Latenz bis zum ersten Floating kein signifikanter Unterschied zwischen rTMS-behandelten HAB- und LAB-Tieren festgestellt werden (Tabelle 3.3). Die rTMS-behandelten HAB-Tiere zeigten signifikant mehr Struggling ( $P < 0,01$ ; Tabelle 3.3) und weniger Floating ( $P < 0,01$ ) als die scheinbehandelten HAB-Kontrollen. Auch die Latenz bis zum ersten Floating war signifikant länger bei den mit rTMS behandelten Tieren als bei den Kontrolltieren ( $P < 0,01$ ).

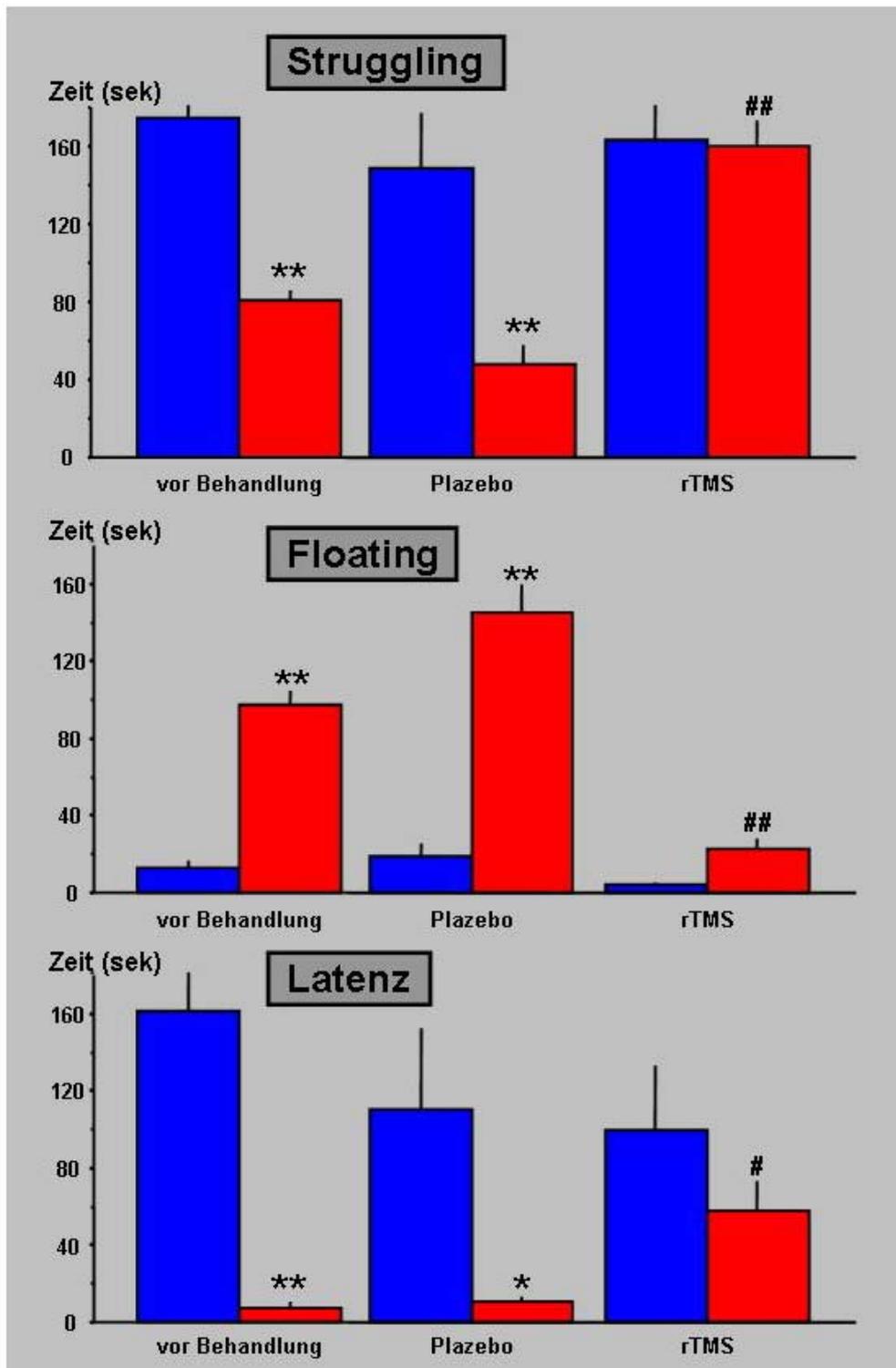
**Tabelle 3.3:** Verhalten im Forced Swimming-Test

	LAB <i>vor</i> <i>Behandlung</i>	LAB <i>sham</i>	LAB <i>rTMS</i>	HAB <i>vor</i> <i>Behandlung</i>	HAB <i>sham</i>	HAB <i>rTMS</i>
Struggling (s)	197±17**	150±19**	162±18	73±5	48±10	160±13###
Floating (s)	12±3,3**	19±5**	4±1*	98±5	145±15	23±5###
Swimming (s)	94±8	136±15	135±18	130±11	109±14	111±12
Latenz (s)	176±17	90±28**	76±21	5±2	<11±3	58±15###

Mittelwerte ± SEM. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01 vs. HAB-Ratten; ### P < 0,01 vs. vor Behandlung und Scheinbehandlung (sham) bei HAB-Ratten. Verhalten im Forced Swimming-Test: Zeit (s) für Struggling, Floating oder Schwimmen und Latenz (s) bis zum ersten Floating männlicher HAB- (rTMS: n = 11; sham: n = 11) und LAB-Ratten (rTMS: n = 9; sham: n = 10) während einer fünfminütigen Testung (Wassertemperatur 23°C). HAB- und LAB-Ratten wurden zunächst einen Tag vor Beginn der rTMS- bzw. Scheinbehandlung getestet. Die zweite Testung fand nach Beendigung des rTMS-Protokolls statt. Mittelwerte ± SEM. + P < 0,05; \*\* P < 0,01 vs. HAB-Ratten; ### P < 0,01 vs. Zeitpunkt vor Beginn der Behandlung und Scheinbehandlung bei HAB-Ratten.

### 3.3.3.2 Experiment 2, mit simultaner Blutentnahme

Eine Dreiweg-ANOVA (Zuchtlinie x Behandlung x Zeit) ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Zuchtlinien in allen Parametern, die vor und nach der Behandlung mit rTMS gemessen wurden, mit Ausnahme des Swimming (Struggling:  $F_{1,20} = 21,23$ ;  $P < 0,003$ ; Floating:  $F_{1,20} = 158,8$ ;  $P < 0,0001$ ; Latenz bis zum ersten Floating:  $F_{1,20} = 19,89$ ;  $P = 0,004$ ). Desweiteren zeigte sich eine signifikante Interaktion des Faktors Behandlung mit Struggling ( $F_{1,20} = 5,97$ ;  $P = 0,0265$ ) und Floating ( $F_{1,20} = 19,39$ ;  $P = 0,004$ ). Eine signifikante Interaktion ließ sich auch für die Faktoren Behandlung und Zeit für Struggling ( $F_{1,20} = 21,96$ ;  $P = 0,0002$ ) und Floating ( $F_{1,20} = 68,12$ ;  $P < 0,0001$ ) feststellen. Nur für Floating zeigte sich eine signifikante Interaktion aller drei Faktoren ( $F_{1,20} = 39,73$ ;  $P < 0,0001$ ). In der post-hoc-Analyse (Newman-Keuls) waren rTMS-behandelte HAB-Tiere in den Parametern Struggling, Floating und der Latenz bis zu ersten Floating statistisch nicht mehr von den LAB-Tieren unterscheidbar (Abbildung 3.13). Die rTMS-behandelten HAB-Tiere zeigten signifikant mehr Struggling (332%;  $P < 0,01$ ) und weniger Floating (16%;  $P < 0,01$ ) als die scheinbehandelten HAB-Kontrolltiere (100%). Auch die Latenz bis zum ersten Floating war bei mit rTMS behandelten HAB-Ratten signifikant länger (526%;  $P < 0,01$ ) als bei den Kontrolltieren.



**Abbildung 3.13:** Verhaltensparameter im Forced Swimming-Test. Dieser wurde vor (prä) und nach Beendigung der zweimal dreitägigen rTMS-Behandlung bei LAB- (rTMS: n=6; sham: n=6; blaue Balken) und HAB-Ratten (rTMS: n=6; sham: n=6; rote Balken) durchgeführt. Abgebildet ist die Zeit, welche während des fünfminütigen Forced Swimming mit Struggling oder Floating verbracht wurde bzw. die Latenz bis zum ersten Floating. Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  vs. LAB; #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$  vs. prä und Scheinbehandlung bei HAB-Ratten.

### **3.3.4 Einfluss von rTMS auf die Aktivität des HPA-Systems**

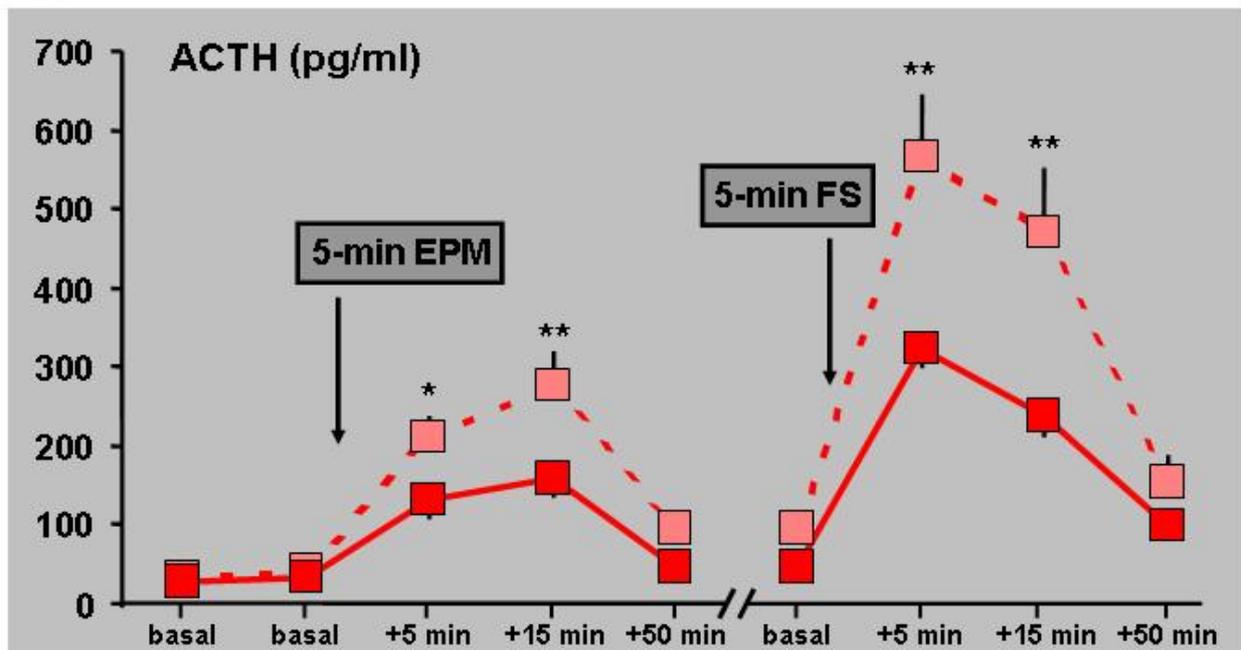
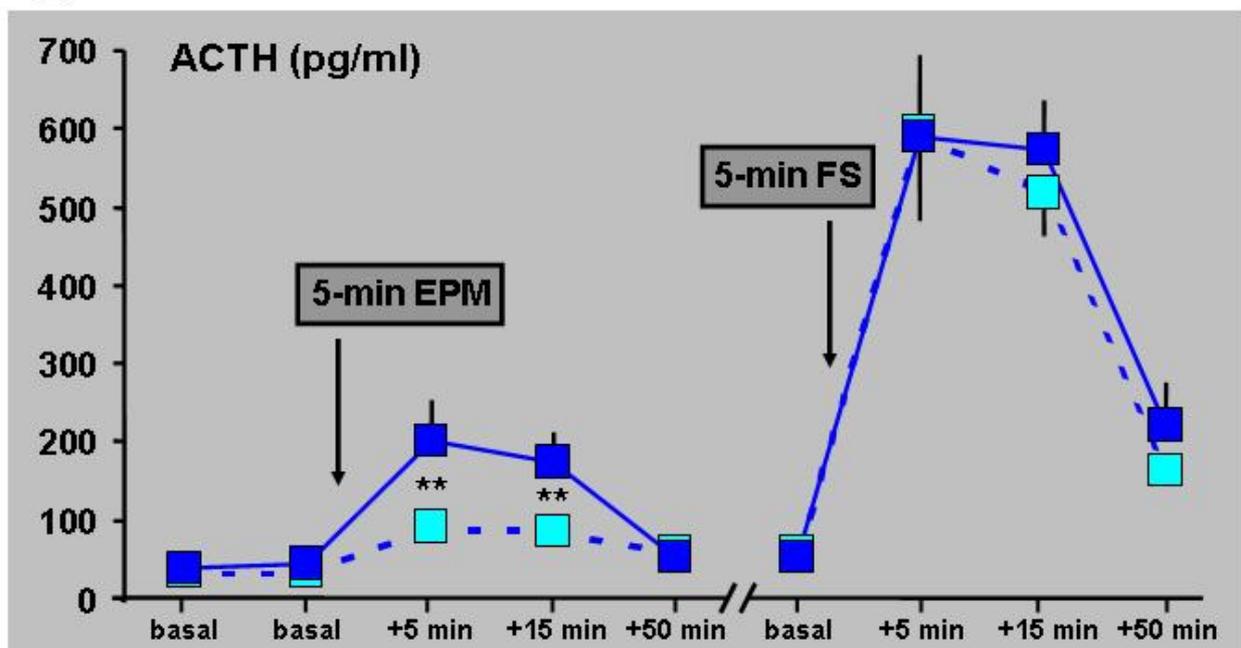
#### **3.3.4.1 Effekte der EPM-Exposition auf HAB-Ratten**

Die basalen Plasmakonzentrationen von ACTH und Kortikosteron waren bei mit rTMS behandelten und scheinbehandelten (sham) Tieren vergleichbar (Tabelle 3.4). Elevated plus-maze-Exposition führte in beiden Gruppen zu einem signifikanten Anstieg von ACTH (Zweiweg-ANOVA, Faktor: Zeit;  $F_{4,40} = 47,13$ ;  $P < 0,0001$ ) und Kortikosteron (ZweiwegANOVA, Faktor: Zeit;  $F_{3,30} = 103,9$ ;  $P < 0,0001$ ). Die Zweiweg-ANOVA zeigte eine signifikante Interaktion mit dem Faktor Behandlung (ACTH:  $F_{4,40} = 3,70$ ;  $P = 0,0138$ ; Kortikosteron:  $F_{3,30} = 3,29$ ;  $P = 0,0339$ ). Wie in Abbildung 3.14 zu sehen, war der Anstieg von ACTH im Plasma 5 Minuten nach Exposition bei rTMS-behandelten HAB-Ratten signifikant geringer als bei den scheinbehandelten Kontrolltieren ( $P < 0,01$ ). Genauso war der Anstieg von ACTH und Kortikosteron 15 Minuten nach Exposition bei rTMS-behandelten HAB-Tieren signifikant niedriger ( $P < 0,01$ ). Im Gegensatz zur Plasmakonzentration von Kortikosteron ( $P < 0,01$ ), waren die Plasmakonzentrationen von ACTH in beiden Gruppen 60 Minuten nach Exposition auf der Elevated plus-maze statistisch nicht voneinander zu unterscheiden.

**Tabelle 3.4:** HPA-Aktivität bei Elevated plus-maze-Exposition

Zuchtlinie	Elevated plus-maze (5 Minuten)					
	Basal 1	Basal 2	+5 Min	+15 Min	+60 Min	Delta
<b>LAB, sham</b>						
ACTH (pg/ml)	33,0±3	33,9±5	90,4±15	86,5±13	57,3±11	57,4±11
Kort (ng/ml)	24,6±12	16,5±2	-	246,9±8	81,1±13	230,4±5
<b>LAB, rTMS</b>						
ACTH (pg/ml)	38,6±5	43,6±12	200,1±53 <sup>##</sup>	174,1±38 <sup>##</sup>	52,6±12	161,5±47 <sup>##</sup>
Kort (ng/ml)	43,5±15	46,4±25	-	264,5±34	94,6±24	221±19
<b>HAB, sham</b>						
ACTH (pg/ml)	33,0±4	41,8±9	210±28	276,5±42	96,2±11	243,5±39
Kort (ng/ml)	22,9±15	15,1±6	-	325,8±15	186,9±37	310,7±4
<b>HAB, rTMS</b>						
ACTH (pg/ml)	26,1±2	32,5±3	130,5±25 <sup>##</sup>	159,1±24 <sup>##</sup>	47,7±3	133±22 <sup>##</sup>
Kort (ng/ml)	19,4±6	13,8±4	-	241,3±16 <sup>##</sup>	111,9±22 <sup>##</sup>	227,5±12 <sup>##</sup>

Mittelwerte ± SEM. <sup>##</sup> P < 0,01 vs. Scheinbehandlung (sham). Kort=Kortikosteron.

**A****B**

**Abbildung 3.14: (A)** HAB-Ratten: Auswirkungen fünfminütiger Exposition auf dem Elevated plus-maze (EPM) und fünfminütigem Forced Swimming (FS) auf die Plasmakonzentrationen von ACTH bei HAB-Ratten: rTMS-Behandlung (n = 6; schwarze Quadrate) und Scheinbehandlung (n = 6; schattierte Quadrate; unterbrochene Linien). Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*\* P < 0,01; \* P < 0,05 versus Scheinbehandlung.

**(B)** LAB-Ratten: Auswirkungen fünfminütiger Exposition auf dem Elevated plus-maze (EPM) und fünfminütigem Forced Swimming (FS) auf die Plasmakonzentrationen von ACTH bei LAB-Ratten: rTMS-Behandlung (n = 6; schwarze Quadrate) und Scheinbehandlung (n = 6; schattierte Quadrate; unterbrochene Linien). Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*\* P < 0,01 versus Scheinbehandlung.

#### **3.3.4.2 Effekte der EPM-Exposition auf LAB-Ratten**

Die basalen Plasmakonzentrationen von ACTH und Kortikosteron waren bei rTMS-behandelten und scheinbehandelten (sham) Tieren vergleichbar (Tabelle 3.4). Für ACTH zeigte die Zweiweg-ANOVA eine signifikante Interaktion zwischen den Faktoren Gruppe und Zeit ( $F_{4,40} = 3,97$ ;  $P = 0,01$ ). Wie in Abbildung 3.14 zu sehen war der Anstieg von ACTH im Plasma 5 Minuten nach Elevated plus-maze-Exposition bei rTMS-behandelten LAB-Tieren signifikant höher als bei LAB-Kontrolltieren ( $p < 0,01$ ). Gleichfalls war der Anstieg der Plasmakonzentrationen von ACTH 15 Minuten nach Exposition signifikant höher bei rTMS-behandelten Tieren ( $P < 0,01$ ). 60 Minuten nach Exposition waren die ACTH Plasmakonzentrationen beider Gruppen statistisch nicht mehr zu unterscheiden. Bei der Freisetzung von Kortikosteron ließ sich statistisch kein Unterschied feststellen.

#### **3.3.4.3 Effekte von Forced Swimming auf HAB-Ratten**

Die basalen Plasmakonzentrationen von ACTH und Kortikosteron vor Forced Swimming wurden 60 Minuten nach der Elevated plus-maze-Exposition bestimmt (Tabelle 3.4). Forced Swimming verursachte in beiden Gruppen einen signifikanten Anstieg von ACTH (Zweiweg-ANOVA, Faktor: Zeit;  $F_{3,30} = 60,66$ ;  $P < 0,0001$ ) und Kortikosteron ( $F_{2,20} = 103,8$ ;  $p < 0,0001$ ). Für ACTH ergab die Zweiweg-ANOVA eine signifikante Interaktion mit dem Faktor Behandlung ( $F_{3,30} = 5,47$ ;  $P = 0,0052$ ). Wie in Abbildung 3.14 zu sehen, war der Anstieg von ACTH im Plasma 5 Minuten nach Forced Swimming bei rTMS-behandelten HAB-Tieren signifikant niedriger als bei scheinbehandelten (sham) HAB-Kontrolltieren ( $p < 0,01$ ). Die Plasmakonzentrationen von ACTH ( $P < 0,01$ ) und Kortikosteron ( $P < 0,05$ ) waren in der Gruppe der rTMS-behandelten Tiere 15 Minuten nach Forced Swimming ebenfalls signifikant niedriger als bei den Kontrolltieren. Im Gegensatz dazu waren ACTH und Kortikosteron 60 Minuten nach Forced Swimming zwischen den Gruppen statistisch nicht mehr voneinander zu unterscheiden.

#### **3.3.4.4 Effekte von Forced Swimming auf LAB-Ratten**

Die basalen Plasmakonzentrationen von ACTH und Kortikosteron wurden 60 Minuten nach der Elevated plus-maze-Exposition bestimmt (Tabelle 3.4). Forced Swimming verursachte bei beiden Gruppen einen signifikanten Anstieg von ACTH ( $F_{3,30} = 16,00$ ;  $P < 0,0001$ ) und Kortikosteron ( $F_{2,20} = 238,8$ ;  $P < 0,0001$ ) im Plasma.

Beim Anstieg von ACTH und Kortikosteron 5 und 15 Minuten nach Forced Swimming ließ sich zwischen rTMS-behandelten LAB-Tieren und scheinbehandelten LAB-Kontrolltieren bei der statistischen Auswertung kein Unterschied feststellen. Auch 60 Minuten nach Forced Swimming lagen die Konzentrationen von ACTH und Kortikosteron auf ähnlichem Niveau (Abbildung 3.14).

### 3.3.4.5 Stimulation mit CRH i.v.

Die basalen Plasmakonzentrationen von ACTH und Kortikosteron waren bei rTMS- und scheinbehandelten (sham) HAB- und LAB-Tieren erneut vergleichbar (Tabelle 3.5). Die Infusion von CRH führte bei allen Gruppen zu einem signifikanten Anstieg von ACTH und Kortikosteron ( $P < 0,05$ ). Der Anstieg von ACTH und Kortikosteron im Plasma bei rTMS und Kontrolltieren (sham) 10 Minuten nach Infusion von CRH war vergleichbar.

**Tabelle 3.5:** i.v. CRH –Stimulation

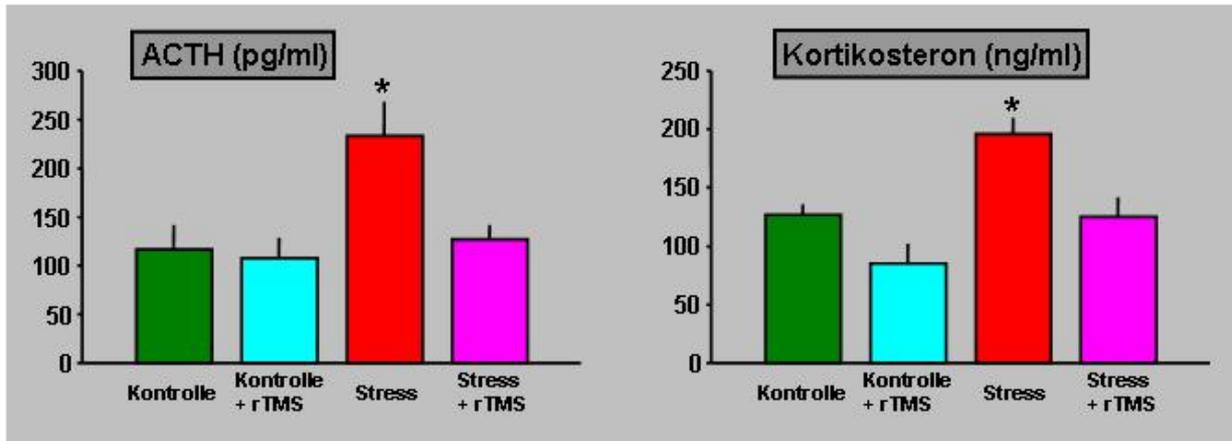
Zuchtlinie	CRH-Stimulation		
	basal	+10 Min	Delta
<b>LAB, sham</b>			
ACTH (pg/ml)	49,3 ± 7,4	80,9 ± 20,1	32 ± 12
Kort (ng/ml)	9,3 ± 4,2	138 ± 12	129 ± 8
<b>LAB, rTMS</b>			
ACTH (pg/ml)	42,1 ± 3,5	72,2 ± 18,2	30 ± 13
Kort (ng/ml)	13,1 ± 5,2	124 ± 25	111 ± 19
<b>HAB, sham</b>			
ACTH (pg/ml)	55,1 ± 16	81,9 ± 12	27 ± 10
Kort (ng/ml)	10,2 ± 3,6	135 ± 19	125 ± 15
<b>HAB, rTMS</b>			
ACTH (pg/ml)	48 ± 4,1	71,1 ± 15,3	23 ± 10
Kort (ng/ml)	15,2 ± 8,3	111 ± 13	96 ± 8

Kort=Kortikosteron; sham=Scheinbehandlung

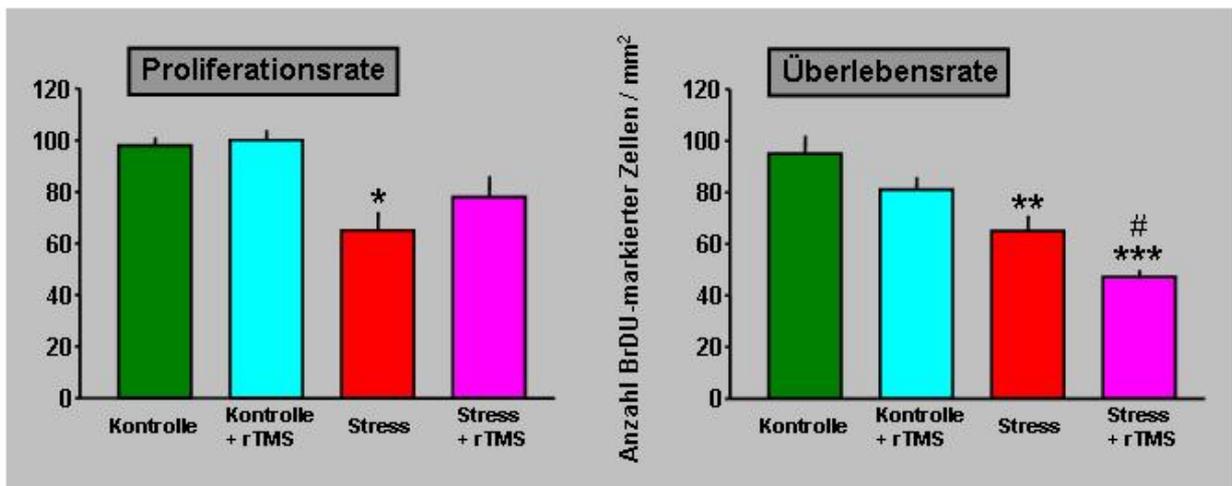
## **3.4 Neurogenese**

### **3.4.1 rTMS normalisiert den stressbedingten Anstieg von ACTH und Kortikosteron im Plasma**

Zur Charakterisierung der basalen Aktivität des HPA-Systems wurden am 17. Tag der Behandlung mit rTMS Blutproben via Schwanzblutentnahme genommen. Die Mittelwerte von ACTH und Kortikosteron werden in Abbildung 3.15 gezeigt. Die basalen Plasmakonzentrationen von ACTH und Kortikosteron waren in der Kontroll- und der rTMS-Kontrollgruppe vergleichbar. Chronisch-psychosozialer Stress induzierte eine substantielle Erhöhung der Plasmakonzentrationen sowohl von ACTH (+94%) als auch von Kortikosteron (+97%). Die Zweiweg-ANOVA (Behandlung x Stress) ergab einen signifikanten Effekt von Stress (ACTH:  $P < 0,05$ ; Kortikosteron:  $P < 0,0001$ ) und Behandlung (ACTH:  $P = 0,05$ ; Kortikosteron:  $P < 0,001$ ). Tukey's post hoc-Vergleich zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Kontroll- und Stress-Gruppen (ACTH:  $P < 0,01$ ; Kortikosteron:  $P < 0,001$ ). Der stressinduzierte Anstieg von ACTH wurde durch die begleitende Behandlung mit rTMS signifikant ( $P < 0,01$ ) gedämpft. Gleichfalls senkte die Behandlung mit rTMS signifikant ( $P < 0,001$ ) die Plasmakonzentration von Kortikosteron in der Gruppe Stress + rTMS.



**Abbildung 3.15:** Auswirkungen von chronisch-psychosozialem Stress und begleitender rTMS-Behandlung auf die Plasmakonzentrationen von stressinduziertem ACTH (A) und Kortikosteron (B) in den vier Gruppen. Um die Hormonkonzentrationen zu bestimmen, wurden am 17. Tag des Experiments Blutentnahmen durchgeführt. Chronisch-psychosozialer Stress erhöhte signifikant die Plasmakonzentrationen von ACTH (A) und Kortikosteron (B), wohingegen die begleitende Behandlung mit rTMS die stressinduzierte Anhebung der Stresshormon-Konzentrationen verhinderte. Die Resultate sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt. \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , versus Kontrollen; ##  $P < 0,01$ ; ###  $P < 0,001$  versus Stress.



**Abbildung 3.16:** Auswirkungen von chronisch-psychosozialem Stress und begleitender Behandlung mit repetitiver transkranieller Magnetstimulation (rTMS) auf die Proliferationsaktivität (A) und das Überleben der neugeborenen Zellen (B) im Gyrus dentatus des Hippocampus der adulten Ratte. Die Gesamtzahl der BrDU-markierten Zellen pro Gyrus dentatus wurde mit Hilfe einer modifizierten stereologischen Methode ermittelt. (A) Chronisch-psychosozialer Stress (Stress) verminderte die Zellproliferation sowohl gegenüber ungestressten (Kontrolle+rTMS) als auch gestressten Tieren (Stress+rTMS) signifikant, wohingegen die Behandlung mit rTMS nur einen schwach steigernden Effekt auf die Proliferationsaktivität der Vorläuferzellen hatte. Die Überlebensrate der neugeborenen Zellen wurde ebenfalls durch chronischen Stress verringert; rTMS senkte diese noch weiter. Die Ergebnisse werden dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , versus Kontrollen; #  $P < 0,05$  versus Stress.

### **3.4.2 Zellproliferation im Hippocampus: kein Einfluss von rTMS auf die stressassoziierte Abnahme der Proliferationsrate**

Um die Effekte von 18 Tagen Stress und/oder rTMS-Behandlung auf die Zellproliferation beurteilen zu können, wurde eine Markierung mit BrDU durchgeführt. Chronisch-psychosoziale Stressexposition führte zu einer im Vergleich zu ungestressten Kontrolltieren signifikanten Verminderung (-29%) der Gesamtzahl von BrDU-markierten Zellen im Gyrus dentatus (Abbildung 3.16 **A**). Die Zweiweg-ANOVA (Behandlung x Stress) ergab einen signifikanten Effekt von Stress ( $P < 0,01$ ), jedoch keinen von Behandlung ( $P = 0,07$ ). Tukey's post hoc-Vergleich zeigte einen signifikanten Unterschied beim Vergleich der Kontroll- und der Stress-Gruppen ( $P < 0,05$ ). Die Anzahl der BrDU-markierten Zellen im Gyrus dentatus war in der Stress + rTMS-Gruppe im Vergleich zur Stress-Gruppe um 18% vermindert. Dies war jedoch nicht signifikant, und ein Vergleich der Stress + rTMS-Gruppe mit der Kontrollgruppe enthüllte ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied. Die Behandlung mit rTMS ohne gleichzeitige Stressexposition hatte keinen Einfluss auf die Zellproliferation. Chronische Stressexposition und/oder rTMS hatten keinen Einfluss auf die Anzahl der BrDU-markierten Zellen pro Abschnitt im Corpus callosum, was darauf hindeutet, dass die verschiedenen Behandlungen keinen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit des Proliferationsmarkers BrDU hatte. Zusätzlich wurde das Volumen der Körnerzellschicht bestimmt, um zu beurteilen, ob Veränderungen der Proliferationsrate der Körnerzell-Vorläufer zu Volumenänderungen führen würden. Die volumetrische Analyse ergab jedoch keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

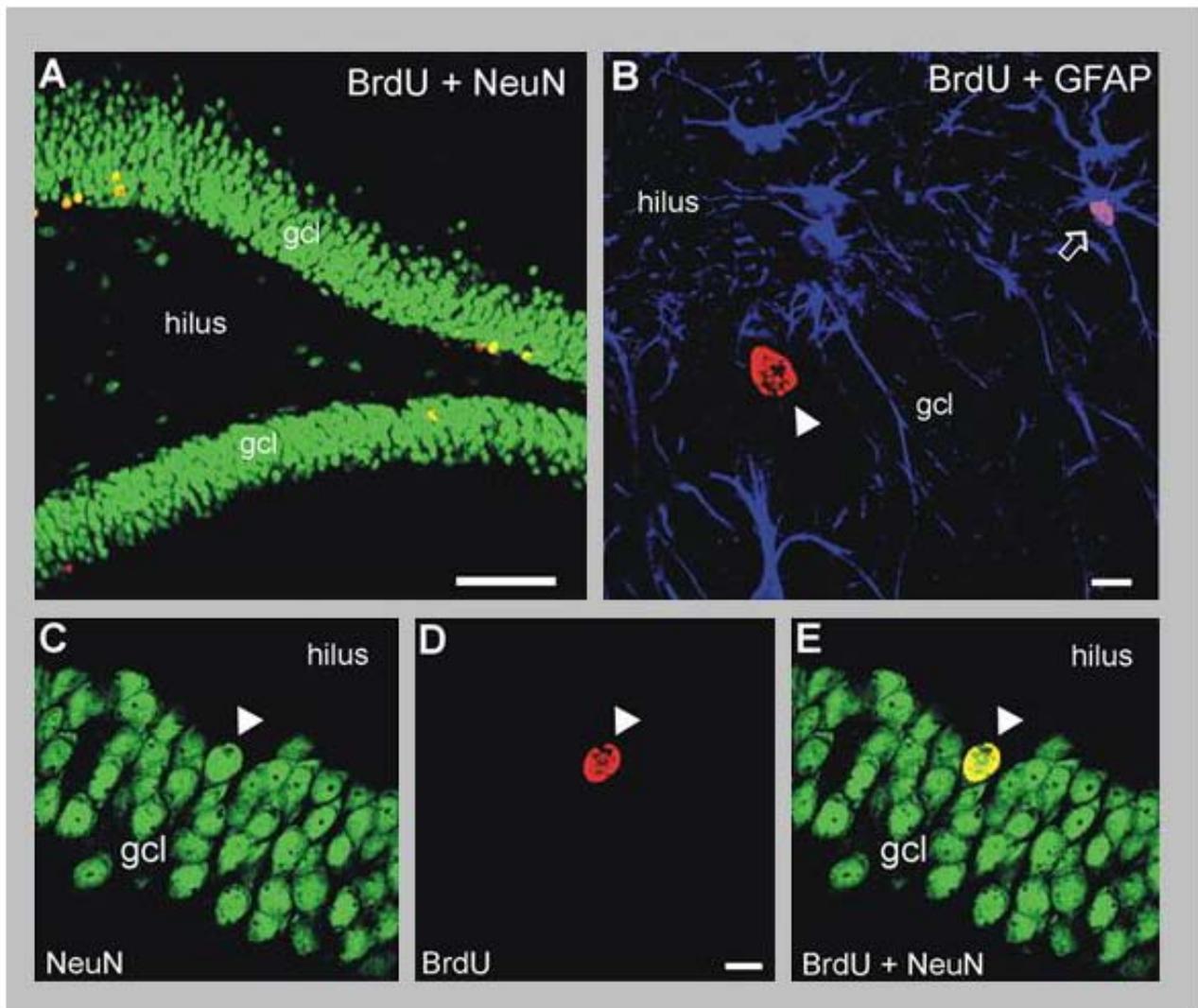
### 3.4.3 rTMS vermindert die Überlebensrate BrDU-markierter Zellen

Um den Effekt von chronisch-psychosozialem Stress und/oder der Behandlung mit rTMS auf das Überleben von zu Beginn des Experimentes neugebildeten Zellen zu ermitteln, wurde den Tieren vor Stressexposition und Behandlung mit rTMS BrDU injiziert. Die Anzahl der überlebenden BrDU-positiven Zellen in jeder Versuchsgruppe wird in Abbildung 3.16 (B) gezeigt. Eine Zweiweg-ANOVA (Behandlung x Stress) zeigte einen signifikanten Effekt von Stress ( $P < 0,001$ ) und Behandlung ( $P < 0,01$ ). Chronisch-psychosozialer Stress führte zu einer 36%igen Verminderung der Anzahl BrDU-markierter Zellen im Gyrus dentatus (Tukey's post hoc:  $P < 0,001$ ). In der Stress + rTMS-Gruppe war die Anzahl der BrDU-markierten Zellen ebenfalls signifikant vermindert ( $-54\%$  ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe und  $-29\%$  ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Stressgruppe. Die Behandlung mit rTMS alleine führte ebenfalls zu einer Reduzierung der BrDU-markierten Zellen um  $14\%$ ; dies erreichte allerdings keine statistische Signifikanz. Volumetrische Analysen der Körnerzellschicht ergaben wiederum keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Wie aus Tabelle 3.6 zu ersehen, exprimierte die Mehrheit der BrDU-markierten Zellen den neuronalen Marker NeuN (Abbildung 3.17), wohingegen lediglich eine sehr geringe Anzahl von Zellen zusätzlich mit GFAP, einem Gliazellmarker, markiert war. Diese Verteilung war zwischen den Versuchsgruppen nicht signifikant unterschiedlich.

**Tabelle 3.6:**

Gruppen	NeuN	GFAP
Kontrolle	72,3 ± 8,8	20,6 ± 2,8
Kontrolle + rTMS	70,4 ± 11,2	18,2 ± 3,1
Stress	68,6 ± 10,5	19,1 ± 2,5
Stress + rTMS	69,7 ± 12,6	21,4 ± 3,4

Prozentualer Anteil der BrdU-positiven Zellen im Gyrus dentatus, welche gleichzeitig Immunreaktivität für den neuronalen Marker NeuN oder Gliamarker GFAP aufwiesen (Doppelmarkierung). Keine Gruppenunterschiede. Mittelwerte ± SEM.



**Abbildung 3.17:** Kolokalisations von BrdU-Immunreaktivität mit dem neuronalen Marker NeuN (**A, C-E**) und dem astrozytären Marker saures Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein; GFAP) (**B**).

(**A**) Repräsentatives Abbildung des hippocampalem Gyrus dentatus bei geringer Vergrößerung (Doppelmarkierung: BrDU: *rot-gelb*, NeuN: *grün*). Die Mehrheit der BrDU-positiven Zellen fand sich in der subgranulären Zone und in der Körnerzellschicht (gcl) des Gyrus dentatus. (**B**) Die Doppelfärbung mit BrDU und dem Astrozyten-Marker GFAP zeigt Astrozyten, die beide Marker exprimieren (Pfeil), und Zellen, die nur BrDU-positiv sind (Pfeilspitze) und daher mögliche neugebildete Neuronen darstellen. (**C-E**) Doppelmarkierung mit BrDU und dem neuronalen Marker NeuN in stärkerer Vergrößerung. (**C**) zeigt eine NeuN-positive Körnerzelle im Gyrus dentatus, (**D**) zeigt eine einzelene BrDU-positive Zelle. Das mittels konfokaler Lasermikroskopie überlagerte Bild (**E**) zeigt das somit identifizierte neugebildete BrDU- und NeuN-positive Neuron (Pfeilspitze). Maßstabsbalken: 100  $\mu\text{m}$  (**A**), 10  $\mu\text{m}$  (**B-D**).

## **4 Diskussion**

### **4.1 Der kombinierte DEX/CRH-Test**

Die Zuchtlinien der HAB- und LAB-Ratten, welche sich deutlich in ihrer angeborenen Ängstlichkeit und ihren akuten Stressbewältigungsstrategien unterscheiden (Liebsch, Linthorst et al. 1998; Liebsch, Montkowski et al. 1998; Keck, Welt et al. 2001; Landgraf and Wigger 2002), stellen ein vielversprechendes Modell zur Untersuchung der Beziehung zwischen angeborener Ängstlichkeit, akuter Stressbewältigungsstrategie, physiologischer und neuroendokriner Stressreaktion und ihren zugrundeliegenden Mechanismen dar. Deswegen können Studien an diesen, für bestimmte Verhaltensstrategien genetisch prädisponierten Labortieren, zu einem besseren Verständnis der humanen Psychopathologie beitragen. Mit Hilfe des kombinierten DEX/CRH-Tests konnten wir eine profunde Fehlregulation des HPA-Systems bei männlichen Ratten mit angeborener Hyperängstlichkeit nachweisen. Die signifikante Erhöhung der basalen Synthese und Ausschüttung von AVP im PVN zeigt, dass AVP unter diesen psychopathologischen Bedingungen eine wichtige Rolle bei der veränderten Reaktivität der HPA-Achse spielt. Entsprechend verhindert die Verabreichung eines selektiven  $V_{1a}$ -Rezeptorantagonisten bei mit Dexamethason vorbehandelten HAB-Tieren die verstärkte Ausschüttung von ACTH und Kortikosteron nach Injektion von CRH. Nach klinischen, indirekten Hinweisen (von Bardeleben, Holsboer et al. 1985; Holsboer, Von Bardeleben et al. 1987) ist dies der erste direkte Beweis, dass eine Aktivierung des vasopressinergen Systems zur Störung des HPA-Systems der HAB-Ratten beiträgt.

#### **4.1.1 Aberrierendes Ergebnis des kombinierten DEX/CRH-Tests bei männlichen HAB-Ratten**

Bei Ratten lassen sich die höchsten Plasmakonzentrationen von ACTH und Glukokortikoiden zu Beginn der normalen Wachperiode am Abend und die niedrigsten Konzentrationen 12-18 Stunden später beobachten (Krieger 1979). Die Besetzung der Glukokortikoidrezeptoren in der Hypophyse, welche auch den Hauptangriffspunkt von Dexamethason darstellen (Schinkel, Wagenaar et al. 1995; De Kloet, Vreugdenhil et al. 1998; Meijer and de Kloet 1998), durch endogene Glukokortikoide ist während des täglichen Tiefstandes minimal. Deswegen wird der

maximale Suppressioneffekt von Dexamethason durch eine Verabreichung um 12.00 Uhr, wenn die endogene Aktivität des HPA-Systems der Ratte am geringsten ist (Krieger 1979; Hatzinger, Reul et al. 1996), erreicht.

Bei den LAB-Tieren zeigte sich das HPA-System 6-7 Stunden nach der Vorbehandlung mit Dexamethason komplett supprimiert. Auch die nachfolgende Stimulation mit CRH führte nicht zu einem Anstieg der Plasmakonzentrationen von ACTH und Kortikosteron, was für eine reziproke Interaktion zwischen exogenen und/oder endogenen Glukokortikoiden und dem Grad der Aktivierung des HPA-Systems durch CRH spricht (Rivier, Brownstein et al. 1982; Hatzinger, Reul et al. 1996). Wie auch bei Patienten, die an Depression leiden, zeigte Dexamethason bei HAB-Tieren einen deutlich verminderten Suppressioneffekt. Die basalen Plasmakonzentrationen von ACTH waren deutlich erhöht und die Injektion von CRH führte zu einem starken Anstieg von ACTH und Kortikosteron im Blut (Holsboer and Barden 1996). Es gelang somit erstmals im Tiermodell ohne vorhergehende Manipulation (z.B. chronischer Stress) eine patientenanalogue neuroendokrine Situation abzubilden. Da die Hypophysen-Nebennieren-Quotienten von HAB- und LAB-Tieren nicht unterscheidbar waren, können Unterschiede auf Ebene der Nebennierenrinde als Ursache für die erhöhte Ausschüttung von ACTH und Kortikosteron nach Verabreichung von CRH ausgeschlossen werden. Außerdem zeigten kortikotrope Zellen der Hypophyse von HAB- und LAB-Tieren in früheren Studien eine vergleichbare Reaktion auf intravenös verabreichtes CRH (Liebsch, Linthorst et al. 1998; Keck, Welt et al. 2001).

#### **4.1.2 Hyperaktivität des vasopressinergen Systems im PVN: Hauptverantwortlich für das aberrierende Ergebnis des DEX/CRH-Tests oder Kompensationsmechanismus?**

Nach der Entdeckung von CRH (Vale, Spiess et al. 1981) hatte sich schnell die Ansicht etabliert, dass AVP in Synergie mit CRH die hypophysäre Ausschüttung von ACTH stimuliert. Wenn AVP und CRH gemeinsam verabreicht werden, ist die Hormonausschüttung sowohl beim Menschen (von Bardeleben, Holsboer et al. 1985) als auch beim Nagetier (Gillies, Linton et al. 1982) wesentlich größer als die addierte Ausschüttung nach jeweils einzelner Verabreichung. AVP wird hauptsächlich in den magnozellulären Neuronen des PVN und im Nucleus supraopticus des Hypothalamus synthetisiert. Zusätzlich sind AVP und CRH in den parvozellulären Neuronen des PVN, welche den hypothalamischen Teil des HPA-Systems darstellen,

kolokalisiert (Tilders, Schmidt et al. 1993). Der Synergismus von CRH und AVP hat funktionelle Relevanz bei Langzeitaktivierungen des HPA-Systems, wie zum Beispiel chronischem Stress bei Ratten (de Goeij, Dijkstra et al. 1992), Altern bei Mensch und Nagetier (Lucassen, Salehi et al. 1994; Hatzinger, Wotjak et al. 2000; Keck, Hatzinger et al. 2000) und Depression (Purba, Hoogendijk et al. 1996; Holsboer 1999).

In der Folge verändert sich das von CRH-Neuronen produzierte hypothalamische Signal zur Ausschüttung von ACTH von einem durch CRH dominierten nach und nach zu einem mehr durch AVP dominierten (Tilders, Schmidt et al. 1993). In der Tat fanden Purba et al. (1996) Anzeichen einer gesteigerten vasopressinergen Aktivität durch den Nachweis einer erhöhten Anzahl AVP-ausschüttender Neurone im PVN depressiver Patienten. Ein weiterer indirekter Hinweis auf die Rolle von AVP bei affektiven Störungen ist die Erkenntnis, dass die Behandlung mit Fluoxetin bei Patienten mit Major Depression zur Verminderung der Konzentration von AVP im Liquor führt (De Bellis, Gold et al. 1993). Nicht nur AVP aus den parvozellulären Neuronen des PVN, sondern auch AVP aus dem magnozellanen neurosekretorischen System kann die Aktivität des HPA-Systems beeinflussen: AVP kann aus den magnozellanen Neuronen in das portale Blutsystem des Hypophysenvorderlappens ausgeschüttet werden, entweder durch *en passant*-Freisetzung in der Zona interna der Eminentia mediana oder über kurze Portalgefäßen aus der Neurohypophyse (Antoni 1993; Wotjak, Kubota et al. 1996; Wotjak, Kubota et al. 1996; Engelmann and Ludwig 2004).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass AVP zur ausgeprägten Fehlregulierung des HPA-Systems bei HAB-Ratten, welche als genetisch prädisponiertes Tiermodell zur Untersuchung neurochemischer Korrelate von Depression und Angst angesehen werden können, beiträgt. Beim DEX/CRH-Test lässt sich die durch die Injektion von CRH bedingte Freisetzung von ACTH und Kortikosteron durch die vorherige periphere Verabreichung eines selektiven V<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten verhindern. Interessanterweise ist sowohl die Synthese von AVP in magnozellanen Neuronen des PVN als auch die Freisetzung von AVP im PVN selber bei HAB-Ratten erhöht, was für eine Hyperaktivität des magnozellanen vasopressinergen Systems als Erklärung für die veränderte Reaktivität des HPA-Systems spricht. Um die Aktivierung magno- und parvozellulärer Neurone zu analysieren, untersuchten wir die AVP-Immunoreaktivität in der Zona interna und externa der Eminentia mediana bei

HAB- und LAB-Ratten. Hierbei ließen sich allerdings keine Unterschiede zwischen den Zuchtlinien feststellen. Deswegen könnte die erhöhte Ausschüttung im PVN und die vermehrte Synthese von AVP in magnozellulären Neuronen dieses Kerns einfach ein Kompensationsmechanismus des Organismus zur Gegenregulation eines per se hyperaktiven HPA-Systems darstellen (Wotjak, Kubota et al. 1996). Hingegen ist die Sekretion von AVP in den Blutkreislauf bei HAB- und LAB-Ratten unter basalen Bedingungen ähnlich, was gegen eine generelle Hyperaktivität des magnozellulären AVP-Systems bei HAB-Tieren spricht (Landgraf, Wigger et al. 1999).

Wie auch für die humane Major Depression vermutet, hebt die vasopressinerge Hyperaktivität bei HAB-Ratten die hemmende Wirkung von DEX auf die Ausschüttung von ACTH durch die erhöhte Freisetzung von AVP auf, welches synergetisch mit dem extern zugeführten CRH im DEX/CRH-Test agiert (Holsboer and Barden 1996).

#### **4.1.3 Die Rolle der Glukokortikoid- und der Mineralokortikoidrezeptoren**

Obwohl die der veränderten Reaktivität des HPA-Systems im kombinierten DEX/CRH-Test bei depressiven Patienten zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt sind, werden Defekte der durch Glukokortikoide vermittelten Feedbackregulation auf das HPA-System vermutet (Modell, Yassouridis et al. 1997; Modell, Lauer et al. 1998; Holsboer 2000). Diese veränderte Feedbackregulation könnte für die in post mortem Studien (Purba, Hoogendijk et al. 1996; Bissette, Klimek et al. 2003) beschriebenen adaptiven Veränderungen hypothalamischer CRH- und AVP-Neuronen, welche das Hypophysen-Nebennierenrinden System kontrollieren, verantwortlich sein. Folglich stellen die HAB-Tiere ein vielversprechendes Modell zur weiteren Charakterisierung der psychopathologischen Signifikanz des dysregulierten HPA-Systems dar.

Bekanntermaßen führt durch „social defeat“ erzeugter Stress zu langanhaltenden Veränderungen in der Regulation des HPA-Systems bei Ratten. Im DEX/CRH-Test war die Freisetzung von ACTH nach Injektion von CRH bei gestressten Tieren signifikant größer als bei ungestressten Kontrolltieren (Buwalda, de Boer et al. 1999). Diese Veränderungen spiegelten sich in zeitlich begrenzten dynamischen Veränderungen der hippocampalen, hypothalamischen und hypophysären Glukokortikoid- und Mineralokortikoidrezeptorbindungen wider. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, sich zu vergegenwärtigen, dass die Übersetzung eines Glukokortikoidsignals in eine zelluläre Antwort mehrere Schritte umfasst:

Rezeptorbindung, Translokation in den Nucleus und in der Folge die durch den Liganden-Rezeptoren-Komplex hervorgerufene Aktivierung des Nucleus (Holsboer 2000). In der vorliegenden Studie konnten wir weder bei der MR- noch bei der GR-Bindung Veränderungen feststellen. Folglich lässt das pathologische Ergebnis der HAB-Ratten im DEX/CRH-Test eher auf ein per se erhöhtes AVP-Signal als auf eine verschlechterte kortikosteroidale Feedbackregulation schließen. Möglich ist jedoch, dass die hier gezeigten Phänomene mit Mechanismen zusammenhängen, die nicht durch Messung von Bindungskapazität ( $B_{max}$ ) und Bindungsaffinität ( $K_d$ ) aufgedeckt werden können. Dies könnte z.B. die Signalkaskade auf Postrezeptorebene (Holsboer 2000) betreffen, was Unterschiede in den Homo- und Heterodimerisationsmustern von Glukokortikoid- und Mineralokortikoidrezeptoren und deren Assoziation mit Transkriptionsfaktoren und Chaperonen einschließt (Truss and Beato 1993). So führte z.B. die Langzeitbehandlung mit dem Antidepressivum Moclobemid bei transgenen Mäusen mit beeinträchtigten Glukokortikoidrezeptoren zu einer verbesserten Funktion der Glukokortikoidrezeptoren ohne nachweisbare Veränderung von  $K_d$  oder  $B_{max}$  (Montkowski, Barden et al. 1995). Des Weiteren konnten *in vitro* Studien zeigen, dass Clomipramin (Pariante, Hye et al. 2003), beispielsweise Fluoxetin (Pariante, Kim et al. 2003) über eine Hemmung des membranständigen Glukokortikoidtransporters zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentration von Glukokortikoiden und somit zu einer verstärkter negativen Feedbackregulation führen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ein hohes Maß an angeborenem Angstverhalten von einer beeinträchtigten Stresshormonregulation, wie sie sich im aberrierendem DEX/CRH-Tests widerspiegelt, begleitet wird. In unseren Experimenten trägt eine basale Hyperaktivität des hypothalamischen vasopressinergen Systems zu diesem Phänomen bei. Folglich vermittelt eine erhöhte Freisetzung von endogenen AVP in die hypophysären Portalgefäße zusammen mit exogenem CRH die erhöhte Freisetzung von ACTH und Kortikosteron im DEX/CRH-Test. Diese Daten liefern einen weiteren Beleg für die Hypothese, dass die bei an Major Depression leidenden Patienten erhöhte intrahypothalamische Freisetzung von AVP sowohl zu den endokrinen als auch zu den psychopathologischen Auffälligkeiten beiträgt (von Bardeleben, Holsboer et al. 1985; Holsboer, Von Bardeleben et al. 1987; Müller, Landgraf et al. 2000).

## **4.2 Paroxetin**

Es besteht zweifellos ein Bedarf an neuen antidepressiven Medikamenten, die sich pharmakologisch durch einen schnelleren Wirkungseintritt und einen kausaleren Therapieansatz von den derzeit verfügbaren Wirkstoffen unterscheiden sollten. Jedoch ist immer noch unklar, durch welche pharmakologische Wirkmechanismen die momentan verfügbaren Antidepressiva ihre klinische Wirkung entfalten. In den letzten Jahren zeigte sich, dass die bei der Major Depression fehlregulierten neuropeptidergen Schaltkreise, wie zum Beispiel das neuronale System von CRH und AVP, einen guten Angriffspunkt für neue Therapieformen darstellen könnten (Hökfelt, Broberger et al. 2000; Keck and Holsboer 2001). In unserer Studie normalisierte Paroxetin, ein klinisch gut etabliertes Antidepressivum, das veränderte Verhalten und die dysregulierte Freisetzung von ACTH und Kortikosteron im psychopathologischen Tiermodell der HAB-Ratten. Da oben schon gezeigt wurde, dass ein verstärkter Antrieb des vasopressinergen Systems auf Ebene des Hypothalamus zu der Störung der Regulation des HPA-System beiträgt, zeigt die von uns erstmals nachgewiesene, durch Behandlung mit Paroxetin hervorgerufene, Verminderung der Überexpression von AVP, dass dieses neuropeptiderge System eine entscheidende Rolle in der antidepressiven Wirkung dieses Medikamentes zu spielen scheint.

### **4.2.1 Langzeitbehandlung mit Paroxetin induziert eine aktivere Stressbewältigungsstrategie**

Nach acht Wochen kontinuierlicher Behandlung mit Paroxetin wurden die Tieren im Forced Swim-Test, der als guter Prädiktor für die klinische Wirksamkeit einer antidepressiven Therapie angesehen wird (Lucki 1997), getestet. Die Behandlung mit Paroxetin hatte nur auf das Verhalten der HAB-Tiere einen deutlichen Einfluss. HAB-Tiere, welche ein passives Verhalten im Forced Swim-Test aufweisen, zeigten eine wesentlich aktivere Stressbewältigungsstrategie, sie „struggelten“ signifikant länger und „floateten“ wesentlich weniger als die unbehandelten HAB-Kontrolltiere.

Da Paroxetin keinen Einfluss auf das Verhalten der LAB-Tiere hatte, scheinen die durch die Behandlung induzierten Verhaltensänderungen von der angeborenen Emotionalität abzuhängen. Auch in der Klinik entfalten Antidepressiva ihre Wirkung nur bei depressiven Patienten und haben keinen Einfluss auf gesunde Probanden,

was darauf hinweist, dass antidepressive Therapien unterschiedliche neurochemische Wirkungen in intakten und gestörten Systemen entfalten (Hökfelt, Broberger et al. 2000; Hökfelt, Bartfai et al. 2003).

Im Open Field, einem Test zur Erfassung der allgemeinen lokomotorischen Aktivität, ließen sich keine Unterschiede zwischen behandelten HAB-Tieren und HAB-Kontrolltieren feststellen, was die Möglichkeit ausschließt, dass die durch Paroxetin hervorgerufenen Verhaltensänderungen im Forced Swim-Test lediglich auf Veränderungen der Lokomotion zurückzuführen sein könnten.

#### **4.2.2 Langzeitbehandlung mit Paroxetin normalisiert den DEX/CRH-Test**

Bei bis zu 90% der depressiven Patienten deckt der DEX/CRH-Test sogar feinste Störungen des Stresshormonhaushaltes auf (Heuser, Yassouridis et al. 1994). Diese sind auf eine zentrale Überexpression von CRH und AVP zurückzuführen, die sich unter physiologischen Bedingungen nicht unbedingt in den peripher abgreifbaren Plasmakonzentrationen von ACTH und Kortikosteron widerspiegeln (Holsboer 2000). Entsprechend waren die basalen und die stressinduzierten Plasmakonzentrationen von ACTH und Kortikosteron aller vier Experimentalgruppen (HAB-Paroxetin, HAB-Kontrolle, LAB-Paroxetin, LAB-Kontrolle) nach achtwöchiger Behandlung vergleichbar. Auch in anderen Studien konnte eine Langzeitbehandlung mit den selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmern Fluoxetin und Paroxetin eine adäquate Reaktion des HPA-System auf heftige Stressoren, wie Forced Swimming, Immobilisation und elektrische Fußschocks, nicht unterbinden (Connor, Kelliher et al. 2000; Zhang, Raap et al. 2000; Stout, Owens et al. 2002). Dennoch konnten wir zeigen, dass die basalen Plasmakonzentrationen von ACTH, nach Vorbehandlung mit DEX, zu Beginn der aktiven Phase um 19.30 Uhr bei HAB-Kontrolltieren signifikant höher als bei LAB-Tieren waren. Auch nach Stimulation mit CRH zeigte sich bei HAB-Kontrolltieren eine signifikant höhere Freisetzung von ACTH und Kortikosteron im Vergleich zu den LAB-Tieren.

Bei Patienten, die an einer Major Depression leiden, kann das Ergebnis des DEX/CRH-Test durch eine klinisch wirksame Behandlung mit antidepressiven Medikamenten normalisiert werden (Zobel, Yassouridis et al. 1999; Holsboer 2000; Zobel, Nickel et al. 2001; Kunzel, Binder et al. 2003; Ising, Kunzel et al. 2005). Wie auch bei Patienten dämpft die Langzeitbehandlung mit Paroxetin bei HAB-Tieren die nach Stimulation mit CRH zu beobachtende erhöhte Freisetzung von ACTH und Kortikosteron. Auch die basalen Plasmakonzentrationen von ACTH und

Kortikosteron zwischen 18.30 und 19.30 Uhr unterschieden sich signifikant zwischen Paroxetin- und scheinbehandelten HAB-Tieren. Ebenso wie beim Schwimmverhalten ließ sich im DEX/CRH-Test kein Unterschied zwischen Paroxetin- und vehikelbehandelten LAB-Tieren feststellen.

#### **4.2.3 Langzeitbehandlung mit Paroxetin reduziert die erhöhte vasopressinerge Genexpression im Hypothalamus**

Oben konnten wir zeigen, dass bei HAB-Ratten die hemmende Wirkung von Dexamethason auf das HPA-System durch deren angeborene erhöhte vasopressinerge Genexpression aufgehoben wird. Bei der humanen Major Depression vermutet man einen ähnlichen Mechanismus (von Bardeleben and Holsboer 1989). Da der Synergismus von CRH und AVP funktionelle Relevanz bei Langzeitaktivierungen des HPA-Systems hat, untersuchten wir, ob die chronische Behandlung mit Paroxetin die Überexpression von AVP im PVN des Hypothalamus bei HAB-Ratten reduzieren und dadurch das Ergebnis des DEX/CRH-Tests normalisieren könnte. Tatsächlich wurde die Expression von magnozellularer AVP-mRNA, die bei HAB-Kontrolltieren signifikant höher als bei LAB-Tieren war, durch die zehnwöchige Behandlung mit Paroxetin vermindert. Auch hier hatte Paroxetin keinen Effekt bei LAB-Tieren. Interessanterweise hatte Paroxetin bei beiden Zuchtlinien keinen Einfluss auf die Expression von AVP-mRNA in magnozellulären Neuronen des SON, was für eine spezifische Wirkung dieser antidepressiven Behandlung auf die Regulation der magnozellulären AVP-Genexpression im PVN spricht. Die physiologische Expression von AVP in parvozellulären Neuronen ist unter basalen Bedingungen jedoch sehr gering (Tilders, Schmidt et al. 1993), deshalb könnten geringe Veränderungen unter das Detektionslimit gefallen sein.

Bisher gab es, im Gegensatz zu CRH und seinen Rezeptoren (Keck and Holsboer 2001), nur indirekte Belege für die Rolle von AVP in der Behandlung affektiver Erkrankungen, zum Beispiel führt die Behandlung mit Fluoxetin zu einer Verminderung der Konzentration von AVP im Liquor von Patienten mit Major Depression (De Bellis, Gold et al. 1993). In Experimenten mit kommerziell erhältlichen Nagetieren konnte keine Verminderung von AVP nach Behandlung mit antidepressiven Medikamenten beobachtet werden (Butterweck, Winterhoff et al. 2001), auch auf LAB-Tiere hatte Paroxetin keinen Effekt. Deshalb untermauern unsere Ergebnisse am psychopathologischen Tiermodell der HAB-Ratten die These, dass Neuropeptide nur unter pathogenen Bedingungen in signifikanten Mengen

freigesetzt werden, was die peptidergen Mechanismen zu einem vielversprechenden Angriffspunkt für die Entwicklung neuer antidepressiver Medikamente macht (Hökfelt, Broberger et al. 2000; Hökfelt, Bartfai et al. 2003).

Der  $V_{1a}$ -Rezeptor spielt bei der Modulation von Emotionalität und der Stressbewältigung eine wichtige Rolle (Landgraf 1995) und wird in hohem Maße im lateralen Septum, den Kernen des Thalamus und amygdalostriatalen Übergangszone exprimiert. Besonders das septale Vasopressin verstärkt das Angstverhalten von Ratten (Landgraf 1995; Liebsch, Wotjak et al. 1996; Ebner, Wotjak et al. 1999). Entsprechend fanden wir bei vehikelbehandelten HAB-Tieren mehr  $V_{1a}$ -Rezeptoren im lateralen Septum als bei LAB-Tieren, was für eine verstärkte angeborene Aktivität des septalen vasopressinergen Systems spricht. Jedoch hatte die Behandlung mit Paroxetin, trotz ihrer deutlichen Wirkung auf die Stressbewältigungsstrategie, weder bei HAB- noch bei LAB-Tieren einen Einfluss auf die Expression von  $V_{1a}$ -Rezeptoren im Septum.

Die Neuronen des PVN erhalten eine schwache serotonerge Innervation aus den Raphékernen (Sawchenko, Swanson et al. 1983) und Ergebnisse sowohl elektrophysiologischer als auch pharmakologischer Studien belegen den Einfluß des serotonergen Inputs auf die Freisetzung von Vasopressin aus der Neurohypophyse (Faull, Charlton et al. 1993). Daher wäre vorstellbar, dass es sich bei den in dieser Studie beobachteten Veränderungen der Genexpression von AVP um das Ergebnis adaptiver Veränderungen im serotonergen System handelt, welche durch die Langzeitbehandlung mit Paroxetin induziert werden könnten (Raap and VanDeKar 1999). In zwei Studien hatte Serotonin, beziehungsweise die Aktivierung von  $5\text{-HT}_{2A}$ -Rezeptoren, allerdings keinen Einfluss auf AVP-freisetzende Neurone (Javed, Kamradt et al. 1999; Van De Kar, Javed et al. 2001). In einem transgenen Mausmodell, bei dem das Gen der Monoaminoxidase A inaktiviert wurde, führte die hierdurch erhöhte Menge von Serotonin im Gehirn zu einem Anstieg der AVP-Genexpression im PVN (Vacher, Frétier et al. 2002). Auch die chronische Behandlung mit Citalopram in Verbindung mit akutem Stress steigerte die AVP-mRNA im PVN (Hesketh, Jessop et al. 2005). Folglich ist es eher unwahrscheinlich, dass adaptive Veränderungen im serotonergen System infolge der Langzeitbehandlung mit Paroxetin für die durch uns beobachtete Verminderung der Genexpression von AVP bei HAB-Tieren verantwortlich sind.

Für die meisten in der Klinik gebräuchlichen Antidepressiva, auch für Paroxetin, sind die primären Effekte auf die biogenen Amine gut dokumentiert. Einige Eigenschaften der Antidepressiva, wie zum Beispiel der allen Medikamenten gemeinsame verspätete Wirkungseintritt, zeigen, dass man die Aufmerksamkeit nicht ausschließlich auf monoaminerge Systeme legen sollte, wenn man Strategien zur Verbesserung der antidepressiven Therapie sucht. Mit Hilfe des psychopathologischen Tiermodells der HAB- und LAB-Ratten ist es uns gelungen zu zeigen, dass die Effekte einer medikamentösen antidepressiven Therapie zumindest zum Teil auf eine Modulation der Genexpression von AVP zurückzuführen sind und dass eine Normalisierung der vasopressinergen Neurotransmission zu einer Rückbildung pathophysiologischer Veränderungen führt. Da die Verabreichung eines  $V_{1a}$ -Rezeptorantagonisten bei HAB-Ratten zu einer Normalisierung des HPA-Systems führt, ist es wahrscheinlicher, dass der Einfluss auf die Genexpression von AVP einen primären Wirkmechanismus von Paroxetin darstellt, als dass es sich hierbei um einen Sekundäreffekt handelt, der den Verhaltensänderungen zuzuschreiben ist. Da die Genexpression von AVP durch Glukokortikoide unterdrückt wird (Antoni 1993; Ma and Aguilera 1999; Kim, Summer et al. 2001; Kuwahara, Arima et al. 2003), könnte auch eine durch Paroxetin induzierte Hochregulierung der Expression und der Bindungskapazitäten von Mineralo- und Glukokortikoidrezeptoren eine Rolle bei unseren Ergebnissen spielen. Tatsächlich konnten im Hippocampus für eine Vielzahl von antidepressiven Medikamenten, wie zum Beispiel trizyklische Antidepressiva und Monoaminoxidase-Hemmstoffe, unabhängig von ihrem primären Wirkmechanismus, eine Hochregulierung dieser Rezeptoren nachgewiesen werden (Reul, Gesing et al. 2000). Nicht ausgeschlossen werden kann, dass Paroxetin auch die intrazelluläre Kaskade, welche die Transkription von AVP reguliert, beeinflusst. Unsere Ergebnisse bestärken die These, dass unter chronischem Stress und unter bestimmten psychopathologischen Bedingungen, AVP eine Hauptrolle in der Regulation des HPA-Systems zukommt.

#### **4.2.4 Serotonin**

Komplexe Interaktionen zwischen dem serotonergen System und der HPA-Achse sind bereits beschrieben worden und Veränderungen beider Systeme konnten sowohl bei Angststörungen als auch bei der Major Depression beobachtet werden (Ressler and Nemeroff 2000; Nemeroff and Owens 2004). Wir untersuchten den Hippocampus aufgrund seiner Schlüsselrolle bei der Koordination von

neuroendokriner Reaktion und Verhaltensantwort auf Stress und seiner postulierten aberrierenden Funktion bei stressabhängigen Erkrankungen, wie z.B. Depression und Angststörungen. HAB-Ratten zeigten im Vergleich zu LAB-Ratten eine verminderte Serotoninfreisetzung im Hippocampus nach emotionalen Stress, aber nicht unter basalen Bedingungen. Außerdem haben HAB-Ratten mehr SERT-Bindungsstellen und weniger 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren im Hippocampus. Paroxetin normalisierte die stressinduzierte serotonerger Neurotransmission bei HAB-Tieren, welche, zumindest teilweise, mit einer Verminderung von SERT-Bindungsstellen im Hippocampus zusammenhängen dürfte. Da Paroxetin sowohl Stressbewältigungsverhalten als auch die Regulation des HPA-System bei HAB-Tieren normalisiert, bieten unsere Daten weitere Einblicke in die komplizierte Beziehung zwischen Aktivität des HPA-System, Stressbewältigung und Serotonin.

#### **4.2.5 Basale und stressinduzierte hippocampale Neurotransmission bei HAB- und LAB-Ratten**

Unter basalen Bedingungen waren keine Unterschiede der extrazellulären Serotoninkonzentrationen zwischen HAB- und LAB-Tieren festzustellen. Auch andere Tiermodelle mit hohem und niedrigem Angstverhalten, welche auf der EPM charakterisiert wurden, differieren nicht bezüglich basaler Konzentration, Freisetzung oder Metabolismus von Serotonin im Hippocampus (Kulikov, Aguerre et al. 1997). Mehrfach wurde gezeigt, unter anderem mit Hilfe von *in vivo* Mikrodialyse, dass die Exposition in Angsttest wie der EPM zu einem Anstieg der Serotoninfreisetzung im Hippocampus führt (Marsden, Beckett et al. 1995; Voigt, Rex et al. 1999). Wir beobachteten einen stressinduzierten Anstieg von 150-200% im Hippocampus unbehandelter und Paroxetinbehandelter LAB-Tiere, was mit den Ergebnissen anderer Gruppen nach Exposition auf der X-maze oder der EPM vergleichbar ist (Rex, Voigt et al. 1999; Voigt, Rex et al. 1999). Bei unbehandelten HAB-Tiere fand sich hingegen eine verminderte stressinduzierte Neurotransmission im dorsalen Hippocampus, bei ihnen ließ sich nach Exposition auf der EPM kein Anstieg der Serotoninfreisetzung beobachten. Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Hyperaktivität der HPA-Achse zu grundlegenden Veränderungen der raphé-hippocampalen Neurotransmission nach Stressexposition führt (Linthorst, Flachskamm et al. 1997; Linthorst, Flachskamm et al. 2000; Penalva, Flachskamm et al. 2002).

Interessanterweise zeigte sich bei einem Vergleich zwischen den zwei Zuchtlinien Fisher- und Wistar-Ratten, die sich in ihrem Angstverhalten unterscheiden, eine höhere stressinduzierte Serotoninfreisetzung im Hippocampus der ängstlicheren Tiere (Rex, Voigt et al. 1999; Bert, Fink et al. 2001). Im Gegensatz zu anderen Mikrodialysestudien, welche den ventralen Hippocampus (Rex, Voigt et al. 1999) oder Homogenate des gesamten Hippocampus untersuchten (Kulikov, Aguerre et al. 1997; Durand, Berton et al. 1999; Bert, Fink et al. 2001), mikrodialysierten wir den dorsalen Hippocampus. Die serotonerge Innervation des Hippocampus besteht aus einem dualen System: Projektionen aus den medianen Raphékernen (MnR) ziehen zum dorsalen Hippocampus, während der ventrale Hippocampus von Projektionen der dorsalen Raphékerne (DR) innerviert wird (Molliver 1987). Dieses duale System erklärt unterschiedliche Ergebnisse von Studien, die verschiedene Bereiche des Hippocampus untersuchten.

Bei den der abgeschwächten Serotoninfreisetzung im dorsalen Hippocampus von HAB-Ratten zugrundeliegenden Mechanismen könnten somadendritische 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptoren, welche für die Kontrolle der Serotoninfreisetzung zwischen MnR und dorsalem Hippocampus wichtig sind, involviert sein (Hjorth et al. 2000). Obwohl sich die Expression von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-mRNA weder im MnR noch im DR zwischen HAB- und LAB-Tieren unterscheidet, kann eine erhöhte Sensitivität dieser Rezeptoren bei HAB-Tieren nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Hierfür könnten z.B. Differenzen in der Proteinexpression der Rezeptoren und/oder Effekte in der intrazellulären Signalkaskade, wie z.B. Unterschiede bei der Kopplung von G-Protein, verantwortlich sein. Mögliche Unterschiede beim Serotonintransporter sollten ebenfalls in Betracht gezogen werden. Tatsächlich fand sich bei HAB-Tieren sowohl in MnR und DR, als auch im Hippocampus eine erhöhte Anzahl von SERT-Bindungsstellen, was auf eine schnellere Clearance von Serotonin aus dem synaptischen Spalt schließen lässt. Auch andere chronische Stressparadigmen führten zu einer erhöhten Expression von SERT im Hippocampus und/oder DR (Pare and Tejani-Butt 1996; Pare, Blair et al. 1999; Filipenko, Beilina et al. 2002). Wistar-Kyoto-Ratten, welche als ängstlich betrachtet werden, haben jedoch im Vergleich zu ihren weniger ängstlichen Gegenstücken, den spontan-hypertensiven-Ratten (SHR), weniger SERT-Bindungsstellen im Hippocampus (Durand, Berton et al. 1999; Pollier, Sarre et al. 2000). Interessanterweise wurden Polymorphismen im humanen SERT-Gen, besonders in der Promoterregion, welche Einfluss auf die transkriptionale

Aktivität und Funktion des SERT zu haben scheint, mit affektiven Erkrankungen in Verbindung gebracht (Neumaier, Edwards et al. 2002).

#### **4.2.6 Langzeitbehandlung mit Paroxetin erhöht die raphé-hippocampale Neurotransmission**

Unsere Beobachtung einer unveränderten Serotoninfreisetzung im Hippocampus unter basalen Bedingungen nach chronischer Paroxetinbehandlung steht in Einklang mit früheren Studien über SSRIs, wie z.B. Citalopram (Invernizzi, Bramante et al. 1995) oder Fluvoxamin (Bosker, Klompmaekers et al. 1995). Auch Paroxetin, in einer Dosierung von 5 mg/kg BW einmal täglich über 14 Tage, hatte keinen Einfluß auf Serotonin im ventralen Hippocampus, 10 mg/kg führten jedoch zu einer gesteigerten Freisetzung (Hajos-Korcsok, McTavish et al. 2000). Andere Gruppen beobachteten erhöhte basale Serotoninkonzentrationen im Hippocampus und im frontalen Kortex nach Langzeitbehandlung mit Fluvoxamin und Fluoxetin (Bel and Artigas 1993; Kreiss and Lucki 1995), inkonstante Ergebnisse bei Studien mit Nagetieren nach Behandlung mit serotonergen Wirkstoffen sind jedoch bekannt (Griebel 1995). Das komplexe Design unsere Studie erforderte, dass HAB- und LAB-Tiere getestet wurden nachdem sie bereits zwei andere Tests durchlaufen hatten, zum einen den Forced Swim-Test (zwei Wochen zuvor), zum anderen den kombinierten Dex/CRH-Test (eine Woche vor dem Mikrodialyse-Experiment), bei dem 30 µg/kg Dexamethason und 50 ng/kg CRH appliziert wurden. Des weiteren wurden den Tieren Jugularvenenkatheter implantiert, um Blutentnahmen zu ermöglichen. Dies alles könnte die Regulation der HPA-Achse und somit die Resultate unserer Studie beeinflusst haben und, zumindest teilweise, die Diskrepanz zu den Ergebnissen anderer Forscher erklären. Andererseits zeigten alle Tiere physiologische Plasmaspiegel von ACTH und Kortikosteron während des Forced Swim-Tests und dem Dex/CRH-Test. Außerdem würde man nach einer Aktivierung des Streß-Hormon-Systems eine gedämpfte Aktivität der serotonergen raphé-hippocampalen Neurotransmission erwarten (Linthorst, Flachskamm et al. 1997; Linthorst, Karanth et al. 1999), wohingegen wir nach chronischer Behandlung mit Paroxetin den gegenteiligen Effekt beobachteten.

Bei Paroxetinbehandelten HAB-Tieren führte die Exposition auf der EPM zu einem ausgeprägten Anstieg der Serotoninfreisetzung, während diese Reaktion in unbehandelten HAB-Tieren ausblieb. Somit konnten wir erstmals zeigen, dass eine

Normalisierung der HPA-Achsenaktivität und der Stressbewältigung durch Behandlung mit Paroxetin in einem psychopathologischen Tiermodell mit einem Anstieg der stressinduzierten Serotoninfreisetzung im Hippocampus einhergeht. Bei behandelten und unbehandelten LAB-Tieren zeigten sich hingegen keine statistisch signifikanten Unterschiede: beide Gruppen zeigten einen physiologischen, wenn auch kleinen, Anstieg der Serotoninfreisetzung nach Stress. Hiermit übereinstimmend hatte auch die Behandlung mit dem SSRI Citalopram keinen Einfluß auf die Serotoninfreisetzung im Hippocampus von SHR im Vergleich zu den ängstlicheren Wistar Kyoto Ratten (Pollier, Sarre et al. 2000). Ebenso wenig beeinflusste die Behandlung mit Paroxetin Stressbewältigung oder HPA-Achsen Regulation bei LAB-Tieren. In ähnlicher Weise ließen sich bei LAB-Ratten keine Veränderungen von Verhalten und/oder Neuroendokrinologie nach Behandlung mit rTMS oder dem CRH<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten R121919 (Keck, Welt et al. 2001) beobachten, während HAB-Tiere deutliche Verhaltensänderungen zeigten. Gleichsam wirken Anxiolytika und Antidepressiva nur bei Patienten, aber nicht bei gesunden Probanden, was dafür spricht, dass sich die Effekte dieser Psychopharmaka in gestörten und intakten Systemen unterscheiden (Hökfelt, Broberger et al. 2000; Hökfelt, Bartfai et al. 2003).

Paroxetin könnte durch Veränderungen an somatodentritischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren zu einer erhöhten stressinduzierten Serotoninfreisetzung bei HAB-Ratten führen, wie auch eine Desensitivierung dieser Autorezeptoren durch chronische Behandlung mit SSRIs die serotonerge Transmission erhöht (Mongeau, Blier et al. 1997; Hjorth, Bengtsson et al. 2000). Andererseits könnte die Verfügbarkeit von SERT, die sich bei HAB- und LAB-Tieren unterscheidet, durch chronische Paroxetinbehandlung beeinflusst werden, was zu einer veränderten Clearance führen würde. Auch wurde bereits gezeigt, dass eine 21tägige Behandlung mit Paroxetin oder Sertralin eine Verringerung der SERT-Bindungsstellen induziert, welche mit einer robusten Verminderung der lokalen Serotoninclearance im Hippocampus assoziiert ist (Benmansour, Cecchi et al. 1999; Benmansour, Owens et al. 2002). In unserer Studie führte die chronische Behandlung mit Paroxetin zu einer starken Reduktion der SERT-Bindungsstellen im Hippocampus bei beiden Zuchtlinien. Die Reduktion war bei HAB-Tieren größer, welche vor Behandlung eine höhere SERT-Expression als LAB-Tiere aufwiesen. Dies könnte, zumindest teilweise, den größeren stressinduzierten Anstieg der Serotoninfreisetzung nach Paroxetinbehandlung bei

HAB-Tieren erklären. Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine höhere Verfügbarkeit von SERT im Dienzephalon und eine stärkere Besetzung der SERT durch SSRIs mit einem besseren Ansprechen auf Therapie mit Psychopharmaka bei Patienten mit Major Depression assoziiert ist (Kugaya, Sanacora et al. 2004).

#### **4.2.7 Die unterschiedliche Expression von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren im Hippocampus zwischen HAB- und LAB-Tieren werden durch die Behandlung mit Paroxetin nicht beeinflusst**

Wir beobachteten bei unbehandelten HAB-Tieren, im Vergleich zu LAB-Tieren, eine verminderte Anzahl von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor mRNA im CA1-Feld des Hippocampus, somit kann die Störung des serotonergen Systems bei HAB-Tieren auch auf der Ebene der transkriptionalen Expression des 5-HT-Rezeptors nachgewiesen werden. Da eine experimentelle Reduktion oder Verstärkung der serotonergen Transmission die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor mRNA oder Bindung im Hippocampus nicht erhöht (Drevets, Frank et al. 1999), scheint es sich hierbei nicht um einen kompensatorischen Mechanismus bei abnormer Serotoninfreisetzung zu handeln. Vielmehr scheint eine Hyperaktivität des HPA-Systems bei der Verminderung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor Gene im Hippocampus involviert zu sein (Zhong and Ciaranello 1995). Kürzlich zeigten postmortem Studien erniedrigte 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor mRNA im Hippocampus von Patienten mit Major Depression (López, Chalmers et al. 1998; Lopez-Figueroa, Norton et al. 2004). Postmortem Rezeptorbindungsstudien kamen zu ähnlichen Ergebnissen (Lowther, De Paermentier et al. 1997), die jedoch nicht immer reproduzierbar waren (Stockmeier, Dilley et al. 1997). In einer PET-Studie ließ sich eine reduzierte Bindung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor im meso-temporalen Kortex (inklusive Hippocampus) bei Patienten mit Major Depression beobachten (Drevets, Frank et al. 1999). Studien an Nagetieren, welche chronische Stressparadigmen zur Induktion von depressivem und/oder ängstlichem Verhalten, wie z.B. learned helplessness, maternal separation, isolation rearing oder chronischen sozialen Stress, benutzten, kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor Genexpression im Hippocampus: Verringerung (McKittrick, Blanchard et al. 1995; López, Chalmers et al. 1998; Schiller, Jahkel et al. 2003), keine Veränderung (Osterlund, Overstreet et al. 1999; Neumaier, Edwards et al. 2002) oder Anstieg

(Neumaier, Edwards et al. 2002). Betrachtet man andere Zuchtlinien, welche sich bezüglich ihres Angstverhaltens auf der EPM unterscheiden, zeigten SHR und Lewis-Ratten eine vergleichbare Anzahl von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor Bindungsstellen im Hippocampus (Kulikov, Aguerre et al. 1997). 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor knock-out Mäuse fielen wiederum durch ein verstärktes Angstverhalten auf (Parks, Robinson et al. 1998).

Da eine erhöhte Freisetzung von Glukokortikoiden die Funktion des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren über Aktivierung von Glukokortikoidrezeptoren dämpft (López, Chalmers et al. 1998; Meijer and de Kloet 1998; Karten, Nair et al. 1999; Fairchild, Leitch et al. 2003; Leitch, Ingram et al. 2003), vermuteten wir, dass chronische Behandlung mit Paroxetin zu einer verbesserten Funktion hippocampaler 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren bei HAB-Tieren führen würde. Paroxetinbehandlung hatte jedoch keinen Einfluss auf die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor Genexpression im Hippocampus von HAB- und LAB-Tieren. Auch in anderen Studien führte die wiederholte Gabe von SSRIs nicht zu Veränderungen der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor Expression (Welner, De Montigny et al. 1989; Le Poul, Boni et al. 2000). Andererseits verstärkten trizyklische Antidepressiva sowohl die basale als auch die stressinduzierte Verringerung von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren (López, Chalmers et al. 1998; Le Poul, Boni et al. 2000; Hensler 2002). Trotz des fehlenden Effekts von Paroxetin auf die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor Expression, berichten einige Autoren von einem Anstieg der durch 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoragonisten [<sup>35</sup>S]-GTPγS vermittelten Bindung im Gyrus dentatus und CA1-Feld im Hippocampus nach Behandlung mit SSRIs (Hensler 2002; Pejchal, Foley et al. 2002; Shen, Li et al. 2002; Elena Castro, Diaz et al. 2003), was nahe legt, dass SSRIs die Funktion des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors über Effekte auf intrazelluläre Signaltransduktion, wie z.B. Kopplung des G-Proteins, beeinflussen.

Zusammenfassend konnten wir mit Hilfe eines psychopathologischen Tiermodells zeigen, dass die angeborene verminderte Empfindlichkeit der raphé-hippocampalen Neurotransmission durch chronische Behandlung mit dem Antidepressivum Paroxetin verbessert werden kann. Dieser Effekt könnte mit einer Verminderung der SERT-Bindungsstellen im Hippocampus bei HAB- im Vergleich zu LAB-Tieren zusammenhängen, während die Expression von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren in dieser Hirnregion unbeeinflusst blieb. Die durch Paroxetin induzierte Modulation der serotonergen Empfindlichkeit geht mit einer Normalisierung der Stressbewältigung und Regulation der HPA-Achse bei diesen Tieren einher.

### **4.3 Repetitive transkranielle Magnetstimulation**

In unserer Studie induziert eine Langzeitbehandlung der frontalen Hirnregionen mit repetitiver transkranieller Magnetstimulation in einem psychopathologischen Tiermodell profunde Änderungen akuter Stressbewältigungsstrategien und dämpft gleichzeitig die Reaktion des HPA-Systems auf Stress. Bei HAB-Ratten, die eine eher passive, angeborene Stressbewältigungsstrategie zeigen, führte rTMS der linken frontalen Hirnregionen zu einer deutlich aktiveren Stressbewältigung, so dass das Verhalten der Tiere nicht länger von dem der LAB-Tiere unterscheidbar war. Auf das Angstverhalten der HAB-Tiere hatte rTMS keinen Einfluss, was für einen spezifischen Effekt von rTMS auf das Stressbewältigungsverhalten spricht. Die durch rTMS hervorgerufenen Verhaltensänderungen sind stabil, was sich darin zeigte, dass wir keine Unterschiede zwischen naiven Tieren und Tieren, denen zuvor Jugularvenenkatheter zur Blutentnahme chirurgisch implantiert wurden, feststellen konnten.

#### **4.3.1 Neuroendokrine Effekte von rTMS: Dämpfung der stressinduzierten Aktivität des HPA-Systems bei HAB-Ratten**

Die Enthemmung des HPA-System ist ein typischer Befund der Major Depression und die klinische Besserung der Symptomatik nach antidepressiver Behandlung ist oft mit einer Normalisierung der Funktion des HPA-Systems assoziiert (Holsboer and Barden 1996; Holsboer 2000). Die Major Depression geht häufig mit einer Hypoaktivität des frontalen Kortex, welchem eine wichtige Rolle in der Regulation der Aktivität des HPA-System zukommt (Diorio, Viau et al. 1993), einher (Soares and Mann 1997; George, Nahas et al. 1999). Bei Ratten zeigte sich nach chronischer Behandlung mit verschiedenen Antidepressiva eine gedämpfte Sekretion von ACTH und Kortikosteron auf Stress (Reul, Stec et al. 1993; Reul, Labeur et al. 1994). Folglich wurde angenommen, dass die Normalisierung der Funktion des HPA-System, da pharmakologisch unterschiedliche Medikamente seine Aktivität dämpfen, eine gemeinsame Endstrecke für klinisch effiziente Antidepressiva darstellt (Holsboer and Barden 1996). Auch die Behandlung mit rTMS führt bei der Major Depression zu Änderungen der Reaktivität des HPA-Systems (Pridmore 1999).

Die durch rTMS induzierten Veränderungen der Hormonplasmakonzentrationen, die wir in unseren Studien beobachten konnten, deuten darauf hin, dass rTMS der

frontalen Hirnregionen zu einer Dämpfung der stressinduzierten Aktivität des HPA-Systems führt: während die basalen Plasmaspiegel von ACTH und Kortikosteron in allen Gruppen beinahe identisch waren, war die neuroendokrine Reaktion auf den ethologisch relevanten, kombinierten physischen und emotionalen Stress des Forced Swim-Test bei HAB-Ratten gedämpft. Dieses Ergebnis ist umso bemerkenswerter, da die mit rTMS behandelten Tiere eine aktivere Stressbewältigungsstrategie und somit auch vermehrte motorische Aktivität zeigten. Bei den LAB-Tieren ließ sich ein solcher Effekt nicht beobachten. Somit untermauern unsere Ergebnisse die Hypothese der positiven Korrelation zwischen Immobilität im Forced Swim Test und den Plasmaspiegeln von Kortikosteron (Báez and Volosin 1994; Korte, De Kloet et al. 1996). Die praktisch identischen Plasmakonzentrationen von ACTH und Kortikosteron nach Injektion von CRH bei rTMS-behandelten HAB-Ratten und HAB-Kontrolltieren machen es unwahrscheinlich, dass Veränderungen der hypophysären CRH-CRH<sub>1</sub>-Rezeptor-Signalkaskade für die nachgewiesenen Unterschiede der neuroendokrinen Stressantwort verantwortlich sind. Auch in früheren Studien wurde eine ähnliche Antwort hypophysärer, kortikotroper Zellen auf eine Bolusinjektion von CRH bei HAB- und LAB-Ratten beschrieben (Liebsch, Linthorst et al. 1998), somit sind die durch Behandlung mit rTMS induzierten Unterschiede in der neuroendokrinen Regulation zwischen den Zuchtlinien eher auf der Ebene des Hypothalamus und/oder dem Hippocampus lokalisiert. In der Tat stützt die Beobachtung einer spezifischen Aktivierung in Form einer immediate-early Genexpression im PVN des Hypothalamus nach rTMS diese Annahme (Ji, Schlaepfer et al. 1998). Auch dass der präfrontale Kortex efferente Projektionen zum perinukleären Bereich des PVN besitzt (Hurley, Herbert et al. 1991; Takagishi and Chiba 1991), an der Regulation der neuroendokrinen Reaktion auf Stressstimuli partizipiert und die Antwort des HPA-Systems auf Stress, das heißt die Synthese und Freisetzung von CRH, hemmen kann, unterstützt unsere Hypothese (Diorio, Viau et al. 1993).

#### **4.3.2 Verhaltenseffekte von rTMS: Veränderungen der Stressbewältigungsstrategie**

Die Zuchtlinien der HAB- und LAB-Ratten, welche genetisch für bestimmte Verhaltensstrategien prädisponiert sind, stellen eine einzigartige Möglichkeit dar, um neue Therapiemöglichkeiten zur Behandlung psychiatrischer Störungen zu

untersuchen (Gentsch, Lichtsteiner et al. 1988). Studien an diesen Labortieren können auch zu einem besseren Verständnis der humanen Psychopathologie beitragen. Im Porsoltschen Schwimmtest korreliert die Entwicklung aktiver Stressbewältigungsstrategien positiv mit der klinischen antidepressiven Wirksamkeit eines Medikamentes (Porsolt, Le Pichon et al. 1977; Cryan, Markou et al. 2002). Mit einem Antidepressivum oder Elektrokrampftherapie behandelte Ratten versuchen aktiv dem Schwimmbottich zu entkommen, Vehikel- oder scheinbehandelte Tiere hingegen zeigen hauptsächlich passive Verhaltensweisen. In unserer Studie zeigten alle rTMS-behandelten HAB-Ratten eine aktivere Stressbewältigungsstrategie, sie „struggelten“ signifikant länger, „floateten“ weniger und zeigten wesentlich später die erste Floating Reaktion. Diese solide Verbesserung der aktiven Stressbewältigung steht in Einklang mit früheren Berichten über eine verminderte Immobilität bei Mäusen (Fleischmann, Prolov et al. 1995) und Ratten (Zyss, Gorka et al. 1997) nach rTMS. Diese Studien wurden allerdings an kommerziell erhältlichen Tieren durchgeführt, welche nicht unbedingt die psychopathologischen Veränderungen widerspiegeln, die sich auch bei Patienten mit psychiatrischen Erkrankungen finden lassen. Noch wichtiger ist jedoch, dass die benutzten Stimulationsparameter nicht auf ihre Vergleichbarkeit mit den in den klinischen Studien verwendeten Stimulationsparametern getestet waren. In klinischen Studien stehen die Effekte von rTMS höchstwahrscheinlich mit einer Stimulation der frontalen Hirnregionen in Zusammenhang (George, Avery et al. 1999). Folglich ist eine Adaption äquivalenter Stimulationsbedingungen, wie in dieser Studie, für eine zuverlässige Untersuchung der zugrundeliegenden neurobiologischen Mechanismen in einem Tiermodell sinnvoll.

rTMS-behandelte HAB-Ratten, welche ursprünglich eine deutlich passivere Stressbewältigungsstrategie zeigten, waren im Verhalten nicht mehr von rTMS- und scheinbehandelten LAB-Tieren zu unterscheiden. Diese durch rTMS induzierte Verschiebung des Verhaltens der HAB-Tiere in Richtung einer aktiveren Stressbewältigungsstrategie war deutlich größer als die vormals berichteten Verhaltensänderungen „normaler“ Wistar Ratten (Zyss, Gorka et al. 1997) oder Sprague-Dawley Ratten (Sachdev, McBride et al. 2002). Somit konnten wir zeigen, dass die Effekte von rTMS bei HAB-Ratten nicht nur nachweisbar, sondern in diesem genetisch prädisponierten Tiermodell sogar verstärkt zu beobachten sind. Im Gegensatz dazu blieb das Verhalten der rTMS-behandelten LAB-Tiere, die von Natur

aus eine aktivere Stressbewältigungsstrategie zeigen (Liebsch, Linthorst et al. 1998; Liebsch, Montkowski et al. 1998), unbeeinflusst. Unsere Beobachtung, dass rTMS die Bewältigungsstrategien von HAB- und LAB-Tieren in unterschiedliche Weise beeinflusst, belegt, dass die durch die Behandlung induzierten Veränderungen von der angeborenen Emotionalität und den angeborenen Stressbewältigungsmechanismen abhängen. Da auch andere antidepressive Therapien ihre Wirkung nur bei depressiven Individuen und nicht bei gesunden Probanden entfalten, liegt es nahe, die Ergebnisse dieser Studie auf die klinische Situation zu übertragen (Holsboer 1995; Holsboer and Barden 1996).

Bekanntermaßen sind Änderungen des Verhaltens, im Sinne einer aktiveren Stressbewältigungsstrategie, während des Forced Swim-Test ein guter Prädiktor für die antidepressive Wirksamkeit einer Therapie bei depressiven Patienten (Borsini and Meli 1988; Lucki 1997). Folglich deutet die hier beschriebene Wirkung von rTMS auf eine potentiell antidepressive Wirksamkeit dieser Behandlung hin. Interessanterweise konnten wir mittels Mikrodialyse auch zeigen, dass rTMS selektiv die extrazelluläre Konzentration von Dopamin im Hippocampus sowie im Nucleus accumbens shell steigert (Keck, Welt et al. 2003). Somit könnte das dopaminerge Neurotransmittersystem einer der wichtigsten Angriffspunkte für eine direkte Beeinflussung durch rTMS sein. Auch in anderen Studien führte die Gabe eines Dopaminagonisten bei Ratten zu einer Verminderung des Floating im Forced Swim-Test (Borsini and Meli 1988). Weiterhin konnten wir zeigen, dass eine chronische Behandlung mit rTMS zu einem Anstieg der Expression der mRNA des Neuropeptids Cholezystokinin (CCK) führt (Müller, Toschi et al. 2000). Der Neuromodulator CCK erhöht die Feuerungsrate dopaminerge Neurone im Ventralen tegmentum und der Substantia nigra. Daneben konnte auch die Fähigkeit von CCK, direkten Einfluss auf die lokale Freisetzung von Dopamin zu nehmen, schon in mehreren Studien belegt werden (Crawley and Corwin 1994; Hamilton, Weddige et al. 2001; Kombian, Ananthakshmi et al. 2004). Demnach könnte auch der Anstieg der Expression von CCK zu den während des Forced Swim-Test beobachteten Verhaltensänderungen beigetragen haben. Auch der von uns beobachtete Anstieg von BDNF-mRNA und -Protein in spezifischen Arealen des Rattenhirns nach chronischer rTMS-Behandlung könnte die Verhaltensänderungen erklären (Müller, Toschi et al. 2000). In Einklang damit stehen Studien, in denen gezeigt wurde, dass die lokale Infusion hoher Konzentrationen von BDNF in das Mittelhirn zu Verhaltensänderungen im Forced

Swim-Test führen, die denen nach einer Behandlung mit antidepressiven Medikamenten sehr ähnlich sind (Siuciak, Lewis et al. 1997; Shirayama, Chen et al. 2002; Hoshaw, Malberg et al. 2005).

#### **4.3.3 rTMS: Unterschiedliche Wirkung auf das Angstverhalten und die Stressbewältigungsstrategie**

Im Gegensatz zu HAB-Ratten waren die mit rTMS behandelten LAB-Ratten ängstlicher als die scheinbehandelten LAB-Kontrolltiere. Entsprechend zeigten die mit rTMS behandelten LAB-Tiere nach EPM-Exposition eine erhöhte stressinduzierte Freisetzung von ACTH. Die Behandlung mit rTMS hat also, abhängig von der angeborenen Emotionalität des Tieres, unterschiedliche Effekte auf das Verhalten und die Neuroendokrinologie. Zusammen mit der Beobachtung, dass rTMS die Stressbewältigungsfähigkeiten von HAB-Tieren verbessert, deuten die vorliegenden Daten darauf hin, dass Angst und Stressbewältigung unabhängig voneinander über verschiedene Mechanismen reguliert werden. Weiter gestützt wird diese These durch die Ergebnisse von Experimenten mit Benzodiazepinen, die keinen Einfluss auf die Stressbewältigungsstrategien im Forced Swim-Test aber einen deutlichen Einfluss auf das Angstverhalten von HAB-Ratten hatten (Liebsch, Linthorst et al. 1998).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Stimulation frontaler Hirnregionen mit rTMS die genetisch determinierte (Liebsch, Linthorst et al. 1998; Liebsch, Montkowski et al. 1998; Landgraf and Wigger 2002) passive Stressbewältigungsstrategie der HAB-Ratten in eine aktive Bewältigungsstrategie umwandeln kann. Zusätzlich zu den Verhaltenseffekten von rTMS konnten wir auch neuroendokrine Wirkungen im Tiermodell nachweisen. Da die Effekte nur bei HAB-Ratten zu beobachten waren, scheint die Wirkung von rTMS von der angeborenen Emotionalität und Stressbewältigungsstrategie der Tiere abhängig zu sein. Folglich gewähren die Daten neue Einblicke in die der antidepressiven Wirkung von rTMS zugrundeliegenden neurobiologischen Mechanismen. Die nachgewiesenen Veränderungen der Aktivität des HPA-Systems stützen die These einer gemeinsamen Endstrecke verschiedener antidepressiver Behandlungsstrategien.

## **4.4 Neurogenese**

Ziel dieser Studie war es, die Wirkung einer Behandlung mit rTMS auf die Plasmakonzentrationen der Stresshormone ACTH und Kortikosteron sowie auf die Neurogenese im Gyrus dentatus im Hippocampus adulter Ratten während chronischen psychosozialen Stresses zu untersuchen. rTMS der frontalen Hirnregionen normalisierte die stressinduzierte Erhöhung der Plasmaspiegel von ACTH und Kortikosteron, was unsere oben gezeigten Ergebnisse repliziert. Interessanterweise hat die Behandlung mit rTMS unterschiedliche Auswirkungen auf das HPA-System und die Neurogenese: rTMS normalisiert die stressinduzierten Veränderungen der Aktivität des HPA-Systems, hat aber keine positive Wirkung auf die stressinduzierte Suppression der hippocampalen Neurogenese. Tatsächlich verminderte sich die Überlebensrate BrDU-markierter Neurone, die Proliferationsrate hippocampaler Vorläuferzellen erhöhte sich nur leicht bei Behandlung mit rTMS. Außerhalb des psychosozialen Stressparadigmas hatte rTMS keinen signifikanten Einfluss auf die Neurogenese im Hippocampus.

### **4.4.1 rTMS dämpft die stressinduzierte Aktivität des HPA-Systems**

Wie oben beschrieben ist die Enthemmung des HPA-Systems ein oft beobachtetes Merkmal der Major Depression und die Besserung der klinischen Symptomatik nach antidepressiver Therapie oft mit einer Normalisierung der Aktivität des HPA-Systems verbunden (Holsboer 2000; Keck and Holsboer 2001). Auch in dieser Studie ließ sich eine dämpfende Wirkung der Behandlung mit rTMS auf die stressinduzierte Aktivität des HPA-Systems beobachten, was als weiterer Hinweis auf die Wirksamkeit von rTMS bei der klinischen Behandlung psychiatrischer Erkrankungen, die mit einer Störung des Stresshormonsystems einhergehen, wie zum Beispiel die Major Depression, angesehen werden kann.

### **4.4.2 Zellproliferation im Hippocampus: kein Einfluss von rTMS auf die stressassoziierte Abnahme der Proliferationsrate**

In unserer Studie hatte die 18tägige Behandlung mit rTMS keinen signifikanten Effekt auf die Proliferationsrate der Vorläuferzellen im Gyrus dentatus des Hippocampus erwachsener, chronisch gestresster Ratten. Jedoch hat rTMS einen suppressiven Effekt auf die Überlebensrate dieser Zellen, welcher sich allerdings nicht in

ungestressten Kontrolltieren, die nur mit rTMS behandelt wurden, beobachten ließ. Frühere Studien in unserem Labor zeigten, dass die Langzeitbehandlung mit rTMS einen neuroprotektiven Effekt, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, hat (Post, Muller et al. 1999). Des weiteren erhöhte eine elfwöchige Behandlung mit rTMS die Expression von BDNF bei Ratten (Müller, Toschi et al. 2000). Diese Veränderungen der Expression von BDNF waren ähnlich denen, die man nach Behandlung mit antidepressiven Medikamenten und Elektrokrampftherapie beobachten kann (Müller, Toschi et al. 2000), was darauf hindeutet, dass diesen unterschiedlichen antidepressiven Behandlungsstrategien ein gemeinsamer molekularer Mechanismus zugrunde liegt. BDNF fördert, zusammen mit anderen Wachstumsfaktoren, die Neurogenese (Collazo, Takahashi et al. 1992; Young, Lawlor et al. 1999; Sairanen, Lucas et al. 2005; Scharfman, Goodman et al. 2005) (Young et al. 1999) und auch einzelne und multiple elektrokonvulsive Schocks erhöhen signifikant und dosisabhängig die Neurogenese im Hippocampus adulter Ratten, was als wichtiges neurobiologisches Element der klinischen Wirksamkeit der Elektrokrampftherapie (EKT) angesehen wird (Scott, Medbak et al. 1998; Madsen, Treschow et al. 2000). Auch verschiedene antidepressive Medikamente, wie Reboxetin und Fluoxetin, verstärken die Neurogenese (Malberg, Eisch et al. 2000; Duman, Nakagawa et al. 2001; Sairanen, Lucas et al. 2005). Es muss jedoch betont werden, dass diese Studien alle an ungestressten Tieren durchgeführt wurden. Derzeit gibt es nur zwei publizierte Studien, die die Wirkung antidepressiver Behandlung in Kombination mit Stress auf die Neurogenese im adulten Hippocampus untersuchten. So wurden Tupaia chronischem psychosozialen Stress ausgesetzt und es gelang, die stressinduzierte Suppression der Zellproliferation im Gyrus dentatus durch gleichzeitige Verabreichung des Antidepressivums Tianeptin zu unterbinden (Czeh, Michaelis et al. 2001). Lee (Lee, Kim et al. 2001) berichtet über einen positiven Effekt von Fluoxetin auf die Zellproliferation im Hippocampus junger Ratten, die maternalem Separationsstress ausgesetzt waren. In beiden Studien, ähnlich wie in unserer Untersuchung, wurde die Anzahl der BrDU-markierten Zellen nach einer relativ kurzen Überlebenszeit von 24 Stunden beziehungsweise einer Woche ausgewertet.

Unser Befund der verminderten Überlebensrate BrDU-markierter Zellen im Hippocampus steht konträr zu den Beobachtungen, dass Elektrokrampftherapie und Antidepressiva die Überlebenswahrscheinlichkeit neu generierter Zellen erhöhen.

Möglicherweise lässt sich diese Diskrepanz zwischen Elektrokrampftherapie und rTMS durch die unterschiedlichen Effekte dieser beiden Behandlungsarten auf verschiedene neurobiologische Schaltkreise erklären (Post and Keck 2001). Zum Beispiel induziert rTMS im Gehirn andere Expressionsmuster von immediate-early Genen als die Elektrokrampftherapie (Ji, Schlaepfer et al. 1998). Des Weiteren belegen die physikalischen Grundlagen diese Vermutung: bei der Elektrokrampftherapie behindern Schädel und Kopfhaut die transkranielle Applikation von Strom, was zu einem deutlichen Abfall der Amplitude und einer Verminderung der fokalen Präzision führt. Deswegen müssen, um spezifische Hirnregionen zu erreichen, hohe Ströme, die einen generalisierten Krampfanfall hervorrufen, verwendet werden (Sackheim et al. 1993). Im Falle der rTMS, die durch ein alternierendes Magnetfeld transkraniell Strom induziert, entfällt dieser Nachteil. Während die kräftige elektrische Stimulation des Hippocampus durch die EKT einen bedeutenden stimulierenden Effekt auf die Neurogenese im adulten Hippocampus (Madsen, Treschow et al. 2000) und auch im frontalen Kortex hat (Madsen, Yeh et al. 2005), scheint die milde Steigerung des exzitatorischen Inputs durch rTMS zu einer Verminderung der Neurogenese im Hippocampus zu führen. In diesem Zusammenhang muss betont werden, dass unter experimentellen Bedingungen rTMS den Hippocampus nicht direkt stimuliert: die gesteigerte Erregung kommt höchstwahrscheinlich auf indirektem Wege über Bahnen zustande, die vom präfrontalen Kortex über entorhinale Bahnen zum Gyrus dentatus projizieren (Post and Keck 2001). Diese grundlegenden Unterschiede könnten zumindest teilweise erklären, warum diese zwei Therapieformen unterschiedliche neurobiologische Effekte haben. Ein Mechanismus, welcher der suppressiven Wirkung von erhöhtem exzitatorischem Input auf das Überleben neugeborener Neurone möglicherweise zugrunde liegt, ist die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren, da es Belege dafür gibt, dass eine Aktivierung dieser Rezeptoren die Zellproliferation im Gyrus dentatus hemmt (Cameron, McEwen et al. 1995; Kitamura, Mishina et al. 2003). Tatsächlich kann rTMS zu einem Anstieg der NMDA-Rezeptoren im Hippocampus führen (Kole, Fuchs et al. 1999).

Eine andere mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Effekte von EKT (Madsen, Treschow et al. 2000; Scott, Wojtowicz et al. 2000) und rTMS ist, dass in allen vorliegenden Studien unterschiedliche Protokolle zur Markierung mit BrDU benutzt wurden. Bisher gibt es keine Übereinkunft hinsichtlich der Menge an BrDU, die

injiziert werden sollte, und der Zeit, die man nach Applikation von BrDU verstreichen lassen sollte, um die Überlebensrate zu bestimmen (Rakic 2002).

#### **4.4.3 Dissoziation von Stresshormonkonzentrationen und Neurogenese im Hippocampus: Relevanz anderer Faktoren**

In der vorliegenden Studie normalisierte die Behandlung mit rTMS die Plasmakonzentrationen von ACTH und Kortikosteron chronisch gestresster Ratten. Obwohl die Proliferationsrate der Vorläuferzellen leicht angehoben wurde, verminderte rTMS die Überlebensrate BrDU-markierter Tochterzellen. Diese Beobachtung steht in Widerspruch zu früheren Studien, die eine deutliche negative Korrelation von Stresshormonausschüttung und Neurogenese im adulten Hippocampus erkennen ließen (Cameron and Gould 1994; Cameron, Tanapat et al. 1998; Kim, Ju et al. 2004). Unsere Ergebnisse belegen, dass in manchen Fällen andere Faktoren eine größere Rolle als die Plasmakonzentrationen von Glukokortikoiden bei der Modulation von Zellproliferation und –überleben im Gyrus dentatus des Hippocampus spielen könnten. Das Fehlen von MR- und GR-Steroidrezeptoren auf den granulären Vorläuferzellen lässt darauf schließen, dass die Effekte auf die Zellproliferation über andere Signaltransduktionen, wie zum Beispiel über Aktivierung von NMDA-Rezeptoren, vermittelt werden (Cameron, Woolley et al. 1993; Cameron, McEwen et al. 1995). Tatsächlich führt eine Blockade der NMDA-Rezeptoren zu einer erhöhten Anzahl von neu generierter Zellen (Gould, McEwen et al. 1997; Nacher, Rosell et al. 2001; Nacher, Alonso-Llosa et al. 2003). Interessanterweise konnten wir in unserer Studie nur eine relativ leichte Suppression (-29%) der Zytogenese nach chronischem Stress beobachten. Tanapat et al. (Tanapat, Hastings et al. 2001) berichteten dagegen von einer stärkeren Suppression (-50%) der Proliferation nach einer einzelnen akuten Stressexposition. Man könnte spekulieren, dass sich die proliferierenden Zellen an den chronischen Stress „gewöhnen“ und deswegen eine geringere Sensitivität gegenüber den Hormonen des HPA-Systems zeigen. Gould et al. (Gould, McEwen et al. 1997) berichteten von einer 76%igen Reduzierung der Proliferation in der subgranulären Zone bei Tupaia nach akutem psychosozialem Stress, wohingegen eine andere Studie an der gleichen Spezies nur von einer leichten Reduktion (-33%) der Zellproliferation im Gyrus dentatus nach chronischem Stress berichtet (Czeh, Michaelis et al. 2001).

Obwohl die endgültige Funktion neu generierter Neurone im Hippocampus noch nicht bekannt ist, scheinen sie für das Lernverhalten eine wichtige Rolle zu spielen (Shors, Miesegaes et al. 2001; Bruel-Jungerman, Laroche et al. 2005). Theoretisch könnte rTMS daher, wenn sie während des chronischen Stresses appliziert wird, die kognitiven Funktionen durch Suppression der Neurogenese beeinträchtigen. Daher wurde von uns in früheren Studien die Wirkung einer Langzeitbehandlung der frontalen Hirnregionen mit rTMS auf Ratten, ähnlich der in dieser Studie verwendeten, untersucht: Mit Hilfe des Morris water-maze Tests, der als guter Indikator der hippocampalen Funktion angesehen wird, wurde gezeigt, dass eine Langzeitbehandlung mit rTMS die kognitiven Funktionen nicht beeinträchtigt (Post, Muller et al. 1999). Folglich ist es unwahrscheinlich, dass eine chronische Behandlung der linken frontalen Hirnregionen mit rTMS zu einer Beeinträchtigung von Lernen und Gedächtnis führt. Andere Autoren kamen zu ähnlichen Ergebnissen (Hedges, Higginbotham et al. 2005) und auch klinische Studien unterstützen diese These (Padberg and Möller 2003).

In der Gruppe Survival wurde die Differenzierung der BrDU-markierten Zellen durch Kolokalisation phänotypischer neuronaler und glialer Marker bestimmt. Die Mehrheit (70%) der überlebenden BrDU-positiven Zellen exprimierte den neuronalen Marker NeuN, eine wesentlich kleinere Anzahl (20%) der Zellen exprimierte den glialen Marker GFAP. Die übrigen 10% der Zellen zeigten keinen der beiden Marker und könnten entweder einem anderen Phänotyp zugehören oder undifferenzierte Zellen im Ruhezustand darstellen. Ein ähnliches Verhältnis der Anzahl von Neuronen zu Gliazellen zeigte sich auch in früheren Studien (Lemaire, Koehl et al. 2000; Malberg, Eisch et al. 2000). Dieser Quotient wurde in unserer Studie durch die verschiedenen Behandlungen nicht signifikant beeinflusst. Auch das Gesamtvolumen der Körnerzellschicht blieb, trotz beträchtlicher Unterschiede von Zellproliferation und – überleben, unbeeinflusst.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass auch in dieser Studie die dämpfende Wirkung einer rTMS-Behandlung der frontalen Hirnregionen auf das HPA-System gezeigt werden konnte. Allerdings ließ sich kein anregender Effekt auf die Neurogenese im Hippocampus nachweisen, daher scheinen andere Faktoren, neben den Glukokortikoiden, eine mindestens genauso große Rolle bei der Regulation der Anzahl und der Ausreifung der Vorläuferzellen im Hippocampus zu spielen. Wir folgern daraus, dass die Dämpfung des HPA-System wahrscheinlich ein wichtiger,

der klinisch beobachteten antidepressiven Wirkung von rTMS zugrundeliegender Mechanismus ist, es mit unserem experimentellen Design jedoch nicht gelang, einen förderlichen Effekt von rTMS auf die Neurogenese im adulten Hippocampus nachzuweisen. Ungeachtet dessen sind weitere Studien, die systematisch den Einfluss veränderter Stimulationsparameter (z.B. Stimulationsfrequenz, Lokalisation der Stimulationsspule etc.) untersuchen, erforderlich um die neurobiologischen Effekte von rTMS, die für die vermutete Effizienz dieser Behandlung bei neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen verantwortlich sein könnten, besser zu charakterisieren.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation untersuchten wir mit Hilfe des psychopathologischen Tiermodells der HAB- und LAB-Ratten, welche sich nicht nur bezüglich ihrer genetisch determinierten Emotionalität und ihrer Stressbewältigungsstrategien, sondern auch hinsichtlich der Reaktivität der HPA-Achse unterscheiden, Effekte des Serotonin-Wiederaufnahmehemmers Paroxetin und von rTMS auf Verhalten und die neuroendokrine Regulation.

Mit Hilfe des kombinierten DEX/CRH-Tests gelang es uns nachzuweisen, dass sich ein hohes Maß an angeborenem Angstverhalten in einer tiefen Fehlregulation des Stresshormonsystems widerspiegelt. HAB-Tiere zeigten nach Verabreichung von Dexamethason einen verminderten Suppressionseffekt und die periphere Injektion von CRH führte zu einem deutlichen Anstieg der Plasmakonzentrationen von ACTH und Kortikosteron. Hierfür scheint intrahypothalamisch überexprimiertes und sezerniertes AVP verantwortlich zu sein, folglich führte auch die periphere Verabreichung eines  $V_1$ -Rezeptorantagonisten zu einer Normalisierung des bei HAB-Tieren dysregulierten HPA-Systems im DEX/CRH-Test.

Bindungskapazität und Bindungsaffinität von Glukokortikoid- und Mineralokortikoidrezeptoren unterschieden sich nicht zwischen den Zuchtlinien, so dass die durch Kortikosteron vermittelte Feedbackregulation des HPA-Systems auf der Ebene der intrazellulären Signalkaskade gestört zu sein scheint.

Die mehrwöchige Behandlung mit dem selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Paroxetin induzierte bei HAB-Tieren nicht nur eine durch die Verminderung der intrahypothalamischen AVP-Genexpression vermittelte Normalisierung des dysregulierten Hormonfreisetzungprofiles im DEX/CRH-Test, sondern auch profunde Verhaltensänderungen im Forced Swim-Test, der als guter Prädiktor für die klinische Wirksamkeit einer antidepressiven Therapie angesehen wird. HAB-Tiere, welche eine passive Stressbewältigungsstrategie im Forced Swim-Test zeigen, struggelten nach Behandlung mit Paroxetin signifikant länger und verbrachten signifikant weniger Zeit mit Floating als unbehandelte HAB-Kontrolltiere. Sie waren in ihrem Verhalten von LAB-Tieren, auf die die Behandlung mit Paroxetin keinen Einfluss hatte, nicht mehr zu unterscheiden.

Mit Hilfe von *in vivo* Mikrodialyse untersuchten wir den Einfluss von chronisch verabreichtem Paroxetin auf die stressinduzierte Freisetzung von Serotonin im dorsalen Hippocampus. Bei HAB-Tieren, welche eine angeborene verminderte Empfindlichkeit der raphé-hippocampalen Neurotransmission zeigen und den bei LAB-Tieren zu beobachtenden stressinduzierten Anstieg der Serotoninfreisetzung vermissen lassen, führte die Behandlung zu einer Normalisierung der serotonergen Neurotransmission. Dieser Effekt könnte mit der gezeigten Verminderung von SERT-Bindungsstellen im Hippocampus bei HAB- im Vergleich zu LAB-Tieren zusammenhängen, während die Expression von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren in dieser Hirnregion unbeeinflusst blieb. Somit konnten wir erstmals zeigen, dass eine Normalisierung der Stresshormonregulation durch Paroxetin mit einem Anstieg der stressinduzierten Freisetzung von Serotonin im Hippocampus assoziiert ist.

Dass rTMS der linken frontalen Hirnregionen antidepressive Effekte hat, konnte bereits in mehreren klinischen Untersuchungen an Patienten, die an Major Depression leiden, beobachtet werden. Unsere im psychopathologischen Modellorganismus der HAB/LAB-Tiere nach Langzeitbehandlung mit rTMS erzielten Ergebnisse gewähren neue Einblicke in die der antidepressiven Wirkung zugrundeliegenden neurobiologischen Mechanismen. Wie auch die Behandlung mit Paroxetin, wandelte rTMS die angeborene passive Stressbewältigungsstrategie der HAB-Tiere in eine signifikant aktivere Stressbewältigungsstrategie im Forced Swim-Test um und dämpfte die endokrine Stressantwort der HPA-Achse. Die frontalen Hirnregionen partizipieren durch efferente Projektionen zum perinukleären Bereich des PVN an der Regulation der neuroendokrinen Reaktion auf Stressstimuli und kann die Synthese und Freisetzung von CRH und somit die Antwort des HPA-Systems hemmen.

Wir konnten ebenfalls zeigen, dass rTMS auch während chronischem psychosozialen Stress eine dämpfende Wirkung auf die basale Aktivität der HPA-Achse hat. Allerdings ließ sich kein anregender Effekt auf die Neurogenese im Hippocampus nachweisen: rTMS erhöhte zwar leicht die Proliferationsrate hippocampaler Vorläuferzellen, verminderte jedoch die Überlebensrate BrDU-markierter Neurone. Daher scheinen andere Faktoren, neben den Glukokortikoiden, eine mindestens genauso große Rolle bei der Regulation der Anzahl und der Ausreifung der Vorläuferzellen im Hippocampus zu spielen. Wir folgern daraus, dass die Dämpfung des HPA-System wahrscheinlich ein wichtiger, der klinisch

beobachteten antidepressiven Wirkung von rTMS zugrundeliegender Mechanismus ist, es mit unserem experimentellen Design jedoch nicht gelang, einen stimulierenden Effekt von rTMS auf die Neurogenese im adulten Hippocampus nachzuweisen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abel, E. L. (1994). "A further analysis of physiological changes in rats in the forced swim test." Physiol Behav **56**(4): 795-800.
- Altemus, M., G. Cizza, et al. (1992). "Chronic fluoxetine treatment reduces hypothalamic vasopressin secretion in vitro." Brain Research **593**: 311-313.
- Antoni, F. A. (1993). "Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age." Frontiers in Neuroendocrinology **14**: 76-122.
- Austin, M. C., J. E. Janosky, et al. (2003). "Increased corticotropin-releasing hormone immunoreactivity in monoamine-containing pontine nuclei of depressed suicide men." Mol Psychiatry **8**(3): 324-32.
- Báez, M. and M. Volosin (1994). "Corticosterone influences forced swim-induced immobility." Pharmacology Biochemistry and Behavior **49**(3): 729-736.
- Barberis, C. and E. Tribollet (1996). "Vasopressin and oxytocin receptors in the central nervous system." Critical Reviews in Neurobiology **10**(1): 119-154.
- Barker, A. T. and R. Jalinous (1985). "Non-invasive stimulation of the human motor cortex." Lancet **1**: 1106-1107.
- Bel, N. and F. Artigas (1993). "Chronic treatment with fluvoxamine increases extracellular serotonin in frontal cortex but not in raphe nuclei." Synapse **15**(3): 243-5.
- Benmansour, S., M. Cecchi, et al. (1999). "Effects of chronic antidepressant treatments on serotonin transporter function, density, and mRNA level." J Neurosci **19**(23): 10494-501.
- Benmansour, S., M. Cecchi, et al. (1999). "Effects of chronic antidepressant treatments on serotonin transporter function, density, and mRNA level." The Journal of Neuroscience **19**(23): 10494-10501.
- Benmansour, S., W. A. Owens, et al. (2002). "Serotonin clearance in vivo is altered to a greater extent by antidepressant-induced downregulation of the serotonin transporter than by acute blockade of this transporter." J Neurosci **22**(15): 6766-72.
- Bergland, R. M. and R. B. Page (1978). "Can the pituitary secrete directly to the brain? (Affirmative anatomical evidence)." Endocrinology **102**(5): 1325-38.
- Bert, B., H. Fink, et al. (2001). "Different effects of diazepam in Fischer rats and two stocks of Wistar rats in tests of anxiety." Pharmacol Biochem Behav **70**(2-3): 411-20.
- Bissette, G., V. Klimek, et al. (2003). "Elevated concentrations of CRF in the locus coeruleus of depressed subjects." Neuropsychopharmacology **28**: 1328-1335.
- Borsini, F. and A. Meli (1988). "Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity?" Psychopharmacology **94**: 147-160.
- Bosker, F. J., A. A. Klompmakers, et al. (1995). "Effects of single and repeated oral administration of fluvoxamine on extracellular serotonin in the median raphe nucleus and dorsal hippocampus of the rat." Neuropharmacology **34**(5): 501-8.
- Brady, L. S., H. J. Whitfield, Jr., et al. (1991). "Long-term antidepressant administration alters corticotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase, and mineralocorticoid receptor gene expression in rat brain. Therapeutic implications." J Clin Invest **87**(3): 831-7.

- Bruel-Jungerman, E., S. Laroche, et al. (2005). "New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment." Eur J Neurosci **21**(2): 513-21.
- Buma, P. and R. Nieuwenhuys (1987). "Ultrastructural demonstration of oxytocin and vasopressin release sites in the neural lobe and median eminence of the rat by tannic acid and immunogold methods." Neurosci Lett **74**(2): 151-7.
- Burnet, P. W., A. Mead, et al. (1995). "Repeated ECS differentially affects rat brain 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptor expression." Neuroreport **6**(6): 901-4.
- Burnet, P. W., T. Sharp, et al. (1999). "Expression of 5-HT receptors and the 5-HT transporter in rat brain after electroconvulsive shock." Neurosci Lett **277**(2): 79-82.
- Butterweck, V., H. Winterhoff, et al. (2001). "St John's wort, hypericin, and imipramine: a comparative analysis of mRNA levels in brain areas involved in HPA axis control following short- term and long- term administration in normal and stressed rats." Molecular Psychiatry **6**: 547-564.
- Buwalda, B., S. F. de Boer, et al. (1999). "Long-lasting deficient dexamethasone suppression of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activation following peripheral CRF challenge in socially defeated rats." Journal of Neuroendocrinology **11**(7): 513-20.
- Cameron, H. A. and E. Gould (1994). "Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus." Neuroscience **61**(2): 203-9.
- Cameron, H. A., B. S. McEwen, et al. (1995). "Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus." The Journal of Neuroscience **15**(6): 4687-4692.
- Cameron, H. A., P. Tanapat, et al. (1998). "Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway." Neuroscience **82**(2): 349-54.
- Cameron, H. A., C. S. Woolley, et al. (1993). "Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat." Neuroscience **56**(2): 337-44.
- Cerri, G., R. De Leo, et al. (1995). "An accurate 3-D model for magnetic stimulation of the brain cortex." Journal of Medical Engineering & Technology **19**: 7-16.
- Chalmers, D. T., S. P. Kwak, et al. (1993). "Corticosteroids regulate brain hippocampal 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA expression." J Neurosci **13**(3): 914-23.
- Chang, J. Y. (2004). "Brain stimulation for neurological and psychiatric disorders, current status and future direction." J Pharmacol Exp Ther **309**(1): 1-7.
- Collazo, D., H. Takahashi, et al. (1992). "Cellular targets and trophic functions of neurotrophin-3 in the developing rat hippocampus." Neuron **9**(4): 643-56.
- Connor, T. J., P. Kelliher, et al. (2000). "Effect of subchronic antidepressant treatments on behavioral, neurochemical, and endocrine changes in the forced swim test." Pharmacology Biochemistry and Behavior **65**(4): 591-597.
- Crawley, J. N. and R. L. Corwin (1994). "Biological actions of CCK." Peptides **15**: 731-755.
- Cryan, J. F., A. Markou, et al. (2002). "Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs." Trends in Pharmacological Sciences **23**(5): 238-245.
- Czeh, B., T. Michaelis, et al. (2001). "Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12796-801.
- De Bellis, M. D., P. W. Gold, et al. (1993). "Association of Fluoxetine treatment with reductions in CSF concentrations of corticotropin-releasing hormone and

- arginine vasopressin in patients with major depression." American Journal of Psychiatry **150**(4): 656-657.
- de Goeij, D. C. E., H. Dijkstra, et al. (1992). "Chronic psychological 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 Kloet, E. R., E. Vreugdenhil, et al. (1998). "Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. [Review] [432 refs]." Endocrine Reviews **19**(3): 269-301.
- De Leo, R., G. Cerri, et al. (1992). "Computer modelling of brain cortex excitation by magnetic field pulses." Journal of Medical Engineering & Technology **16**(4): 149-156.
- Dinan, T. G. (1994). "Glucocorticoids and the genesis of depressive illness: a psychobiological model." British Journal of Psychiatry **164**: 365-371.
- Diorio, D., V. Viau, et al. (1993). "The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress." Journal of Neuroscience **13**: 3839-3847.
- Drevets, W. C., E. Frank, et al. (1999). "PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression." Biol Psychiatry **46**(10): 1375-87.
- Duman, R. S., J. E. Malberg, et al. (1999). "Neural plasticity to stress and antidepressant treatment." Biological Psychiatry **46**: 1181-1191.
- Duman, R. S., S. Nakagawa, et al. (2001). "Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment." Neuropsychopharmacology **25**(6): 836-44.
- Durand, M., O. Berton, et al. (1999). "Effects of repeated fluoxetine on anxiety-related behaviours, central serotonergic systems, and the corticotropic axis axis in SHR and WKY rats." Neuropharmacology **38**(6): 893-907.
- Ebner, K., C. T. Wotjak, et al. (1999). "Vasopressin released within the septal brain area during swim stress modulates the behavioural stress response in rats." European Journal of Neuroscience **11**(3): 997-1002.
- Elena Castro, M., A. Diaz, et al. (2003). "Chronic fluoxetine induces opposite changes in G protein coupling at pre and postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors in rat brain." Neuropharmacology **44**(1): 93-101.
- Engelmann, M. and M. Ludwig (2004). "The activity of the hypothalamo-neurohypophysial system in response to acute stressor exposure: neuroendocrine and electrophysiological observations." Stress **7**(2): 91-6.
- Engelmann, M., C. T. Wotjak, et al. (2000). "Behavioural impact of intraseptally released vasopressin and oxytocin in rats." Experimental Physiology **85**(Special Issue SI): 125S-130S.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, et al. (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." Nature **4**(11): 1313-1317.
- Fairchild, G., M. M. Leitch, et al. (2003). "Acute and chronic effects of corticosterone on 5-HT<sub>1A</sub> receptor-mediated autoinhibition in the rat dorsal raphe nucleus." Neuropharmacology **45**: 925-934.
- Faull, C. M., J. A. Charlton, et al. (1993). "The effect of acute pharmacological manipulation of central serotonin neurotransmission on osmoregulated secretion of arginine vasopressin in the rat." Journal of Endocrinology **139**: 77-87.
- File, S. E., P. J. Kenny, et al. (2000). "The role of the dorsal hippocampal serotonergic and cholinergic systems in the modulation of anxiety." Pharmacology, Biochemistry and Behavior **66**(1): 65-72.

- Filipenko, M. L., A. G. Beilina, et al. (2002). "Repeated experience of social defeats increases serotonin transporter and monoamine oxidase A mRNA levels in raphe nuclei of male mice." Neurosci Lett **321**(1-2): 25-8.
- Fitzgerald, P. (2004). "Repetitive transcranial magnetic stimulation and electroconvulsive therapy: complementary or competitive therapeutic options in depression?" Australas Psychiatry **12**(3): 234-8.
- Flannelly, K. and R. Lore (1977). "The influence of females upon aggression in domesticated male rats (*Rattus norvegicus*)." Animal Behavior **25**: 654-659.
- Fleischmann, A., K. Prolov, et al. (1995). "The effect of transcranial magnetic stimulation of rat brain on behavior models of depression." Brain Research **699**: 130-132.
- Gentsch, C., M. Lichtsteiner, et al. (1988). "Genetic and environmental influences on behavioral and neurochemical aspects of emotionality in rats." Experientia **44**: 482-490.
- George, M. S., D. Avery, et al. (1999). "rTMS studies of mood and emotion." Transcranial Magnetic Sti EEG Suppl. **51**: 304-314.
- George, M. S., S. H. Lisanby, et al. (1999). "TMS: Applications in Neuropsychiatry." Arch Gen Psychiatry **56**: 300-311.
- George, M. S., S. H. Lisanby, et al. (1999). "Transcranial magnetic stimulation: applications in neuropsychiatry." Arch Gen Psychiatry **56**(4): 300-11.
- George, M. S., Z. Nahas, et al. (1999). "Improvement of depression following transcranial magnetic stimulation." Curr Psychiatry Rep **1**(2): 114-24.
- Gershon, A. A., P. N. Dannon, et al. (2003). "Transcranial magnetic stimulation in the treatment of depression." Am J Psychiatry **160**(5): 835-45.
- Gillies, G. E., E. A. Linton, et al. (1982). "Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin." Nature **299**: 355-7.
- Goldman, J. and Z. Nahas (2000). "What is transcranial magnetic stimulation?" Harvard Mental Health Letter **17**(2): 8.
- Gould, E. and E. Fuchs (2000). "In vivo neurogenesis in the adult brain: Regulation and functional implications." European Journal of Neuroscience **12**: 2211-2214.
- Gould, E., B. S. McEwen, et al. (1997). "Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NDMA receptor activation." The Journal of Neuroscience **17**(7): 2492-2498.
- Griebel, G. (1995). "5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research." Pharmacol Ther **65**(3): 319-95.
- Gross, C. G. (2000). "Neurogenesis in the adult brain: Death of dogma." Nature Reviews Neuroscience **1**: 67-73.
- Grunhaus, L., S. Schreiber, et al. (2003). "A randomized controlled comparison of electroconvulsive therapy and repetitive transcranial magnetic stimulation in severe and resistant nonpsychotic major depression." Biol Psychiatry **53**(4): 324-31.
- Hajos-Korcsok, E., S. F. McTavish, et al. (2000). "Effect of a selective 5-hydroxytryptamine reuptake inhibitor on brain extracellular noradrenaline: microdialysis studies using paroxetine." Eur J Pharmacol **407**(1-2): 101-7.
- Hallett, M. (2000). "TMS and the human brain." Nature **406**.
- Hamilton, M. E., F. K. Weddige, et al. (2001). "Effects of forebrain microinjection of cholecystokinin on dopamine cell firing rate." Peptides **22**(7): 1063-9.

- Hatzinger, M., J. M. H. M. Reul, et al. (1996). "Combined dexamethasone/CRH test in rats: hypothalamo-pituitary-adrenocortical system alterations in aging." Neuroendocrinology **64**: 349-356.
- Hatzinger, M., C. T. Wotjak, et al. (2000). "Endogenous vasopressin contributes to hypothalamic-pituitary-adrenocortical alterations in aged rats." Journal of Endocrinology **164**(2): 197-205.
- Hebert, C., A. Habimana, et al. (2001). "Effects of chronic antidepressant treatments on 5-HT and NA transporters in rat brain: an autoradiographic study." Neurochem Int **38**(1): 63-74.
- Hedges, D. W., B. J. Higginbotham, et al. (2005). "Transcranial magnetic stimulation effects on one-trial learning and response to anxiogenic stimuli in adult male rats." J Ect **21**(1): 25-30.
- Hedges, D. W., D. L. Salyer, et al. (2002). "Transcranial magnetic stimulation (TMS) effects on testosterone, prolactin, and corticosterone in adult male rats." Biol Psychiatry **51**(5): 417-21.
- Henninger, M. S. H., F. Ohl, et al. (2000). "Unconditioned anxiety and social behaviour in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behaviour." Behavioural Brain Research **111**: 153-163.
- Hensler, J. G. (2002). "Differential regulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptor-G protein interactions in brain following chronic antidepressant administration." Neuropsychopharmacology **26**(5): 565-73.
- Hesketh, S., D. S. Jessop, et al. (2005). "Differential actions of acute and chronic citalopram on the rodent hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to acute restraint stress." J Endocrinol **185**(3): 373-82.
- Heuser, I. J., U. Schweiger, et al. (1996). "Pituitary-adrenal-system regulation and psychopathology during amitriptyline treatment in elderly depressed patients and normal comparison subjects." Am J Psychiatry **153**(1): 93-9.
- Heuser, I. J., A. Yassouridis, et al. (1994). "The combined DEX/CRH test: A refined laboratory test for psychiatric disorders." Journal of Psychiatric Research **28**(4): 341-356.
- Hjorth, S., H. J. Bengtsson, et al. (2000). "Serotonin autoreceptor function and antidepressant drug action." J Psychopharmacol **14**(2): 177-85.
- Hökfelt, T., T. Bartfai, et al. (2003). "Neuropeptides: opportunities for drug discovery." Lancet Neurology **2**: 463-472.
- Hökfelt, T., C. Broberger, et al. (2000). "Neuropeptides - an overview [Review]." Neuropharmacology **39**(8): 1337-1356.
- Holmes, M. C., F. A. Antoni, et al. (1986). "Magnocellular axons in passage through the median eminence release vasopressin." Nature **319**(6051): 326-9.
- Holsboer, F. (1995). Neuroendocrinology of mood disorders. Psychopharmacology: The fourth generation of progress. F. E. Bloom and D. J. Kupfer. New York, Raven Press: 957-968.
- Holsboer, F. (1999). "The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. [Review] [163 refs]." Journal of Psychiatric Research **33**(3): 181-214.
- Holsboer, F. (2000). "The corticosteroid receptor hypothesis of depression." Neuropsychopharmacology **23**(5): 477-501.
- Holsboer, F. and N. Barden (1996). "Antidepressants and Hypothalamic- Pituitary- Adrenocortical Regulation." Endocrine Reviews **17**(2): 187-205.
- Holsboer, F., U. Von Bardeleben, et al. (1987). "Serial assessment of corticotropin-releasing hormone response after dexamethasone in depression- implications for pathophysiology of DST nonsuppression." Biol Psychiatry **22**: 228-234.

- Horn, T. F. and M. Engelmann (2001). "In vivo microdialysis for nonapeptides in rat brain--a practical guide." Methods **23**(1): 41-53.
- Hoshaw, B. A., J. E. Malberg, et al. (2005). "Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects." Brain Res **1037**(1-2): 204-8.
- Hurley, K. M., H. Herbert, et al. (1991). "Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat." J Comp Neurol **308**(2): 249-76.
- Invernizzi, R., M. Bramante, et al. (1995). "Extracellular concentrations of serotonin in the dorsal hippocampus after acute and chronic treatment with citalopram." Brain Res **696**(1-2): 62-6.
- Ising, M., H. E. Kunzel, et al. (2005). "The combined dexamethasone/CRH test as a potential surrogate marker in depression." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.
- Javed, A., M. C. Kamradt, et al. (1999). "D- fenfluramine induces serotonin- mediated fos expression in CRF and oxytocin neurons of the hypothalamus, and serotonin- independent fos expression in enkephalin and neurotensin neurons of the amygdala." Neuroscience **90**(3): 851-858.
- Ji, R. R., T. E. Schlaepfer, et al. (1998). "Repetitive transcranial magnetic stimulation activates specific regions in rat brain." Medical Sciences **95**: 15635-15640.
- Karten, Y. J. G., S. M. Nair, et al. (1999). "Long-term exposure to high corticosterone levels attenuates serotonin responses in rat hippocampal CA1 neurons." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**: 13456-13461.
- Keck, M. E. (2003). "rTMS as treatment strategy in psychiatric disorders - neurobiological concepts." Clinical Neurophysiology in press.
- Keck, M. E., M. Engelmann, et al. (2000). "Repetitive transcranial magnetic stimulation induces active coping strategies and attenuates the neuroendocrine stress response in rats." Journal of Psychiatric Research **34**(4-5): 265-276.
- Keck, M. E., M. Hatzinger, et al. (2000). "Ageing alters intrahypothalamic release patterns of vasopressin and oxytocin in rats." European Journal of Neuroscience **12**: 1487-1494.
- Keck, M. E. and F. Holsboer (2001). "Hyperactivity of CRH neuronal circuits as a target for therapeutic interventions in affective disorders." Peptides **22**: 835-844.
- Keck, M. E., I. Sillaber, et al. (2000). "Acute transcranial magnetic stimulation of frontal brain regions selectively modulates the release of vasopressin, biogenic amines and amino acids in the rat brain." European Journal of Neuroscience **12**: 3713-3720.
- Keck, M. E., T. Welt, et al. (2003). "Neuroendocrinological changes induced by transcranial magnetic stimulation (rTMS) - a focus on dopamine and vasopressin." Nervenheilkunde **22**: 326-349.
- Keck, M. E., T. Welt, et al. (2003). "Reduction of hypothalamic vasopressinergic hyperdrive contributes to clinically relevant behavioral and neuroendocrine effects of chronic paroxetine treatment in a psychopathological rat model." Neuropsychopharmacology **28**(2): 235-243.
- Keck, M. E., T. Welt, et al. (2001). "Neuroendocrine and behavioral effects of rTMS in a psychopathological animal model are suggestive of antidepressant-like effects." Neuropsychopharmacology **24**(4): 337-349.

- Keck, M. E., T. Welt, et al. (2001). "The anxiolytic effect of the CRH1 receptor antagonist R121919 depends on innate emotionality in rats." European Journal of Neuroscience **13**(2): 373-380.
- Keck, M. E., A. Wigger, et al. (2002). "Vasopressin mediates the response of the combined dexamethasone/CRH test in hyper-anxious rats: Implications for pathogenesis of affective disorders." Neuropsychopharmacology **26**: 94-105.
- Kim, J. B., J. Y. Ju, et al. (2004). "Dexamethasone inhibits proliferation of adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro." Brain Res **1027**(1-2): 1-10.
- Kim, J. K., S. N. Summer, et al. (2001). "Role of glucocorticoid hormones in arginine vasopressin gene regulation." Biochem Biophys Res Commun **289**(5): 1252-6.
- Kitamura, T., M. Mishina, et al. (2003). "Enhancement of neurogenesis by running wheel exercises is suppressed in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit." Neurosci Res **47**(1): 55-63.
- Kole, M. H. P., E. Fuchs, et al. (1999). "Changes in 5-HT 1A and NMDA binding sites by a single rapid transcranial magnetic stimulation procedure in rats." Brain Research **826**: 309-312.
- Kombian, S. B., K. V. Ananthalakshmi, et al. (2004). "Cholecystokinin activates CCKB receptors to excite cells and depress EPSCs in the rat rostral nucleus accumbens in vitro." J Physiol **555**(Pt 1): 71-84.
- Korte, S. M., E. R. De Kloet, et al. (1996). "Antisense to the glucocorticoid receptor in hippocampal dentate gyrus reduces immobility in forced swim test." European Journal of Pharmacology **301**: 19-25.
- Kreiss, D. S. and I. Lucki (1995). "Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo." J Pharmacol Exp Ther **274**(2): 866-76.
- Krieger, D. T. (1979). Endocrine Rhythms. New York.
- Kugaya, A., G. Sanacora, et al. (2004). "Brain serotonin transporter availability predicts treatment response to selective serotonin reuptake inhibitors." Biol Psychiatry **56**(7): 497-502.
- Kulikov, A., S. Aguerre, et al. (1997). "Central serotonergic systems in the spontaneously hypertensive and Lewis rat strains that differ in the elevated plus-maze test of anxiety." J Pharmacol Exp Ther **281**(2): 775-84.
- Kunzel, H. E., E. B. Binder, et al. (2003). "Pharmacological and nonpharmacological factors influencing hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis reactivity in acutely depressed psychiatric in-patients, measured by the Dex-CRH test." Neuropsychopharmacology **28**(12): 2169-78.
- Kuwahara, S., H. Arima, et al. (2003). "Regulation of vasopressin gene expression by cAMP and glucocorticoids in parvocellular neurons of the paraventricular nucleus in rat hypothalamic organotypic cultures." J Neurosci **23**(32): 10231-7.
- Landgraf, R. (1995). "Intracerebrally released vasopressin and oxytocin. Measurement, mechanisms and behavioural consequences." Journal of Neuroendocrinology **7**: 243-253.
- Landgraf, R. and A. Wigger (2002). "High versus low anxiety- related behavior rats: An animal model of extremes in trait anxiety." Behavior Genetics **32**(5): 301-314.
- Landgraf, R., A. Wigger, et al. (1999). "Hyper-reactive hypothalamo-pituitary-adrenal axis in rats bred for high anxiety-related behaviour." Journal of Neuroendocrinology **11**: 405-407.
- Landgraf, R., C. T. Wotjak, et al. (1998). "Release of vasopressin within the brain contributes to neuroendocrine and behavioral regulation." Progress in Brain Research **119**: 201-220.

- Le Poul, E., C. Boni, et al. (2000). "Differential adaptation of brain 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors and 5-HT transporter in rats treated chronically with fluoxetine." Neuropharmacology **39**(1): 110-22.
- Lee, H. J., J. W. Kim, et al. (2001). "Fluoxetine enhances cell proliferation and prevents apoptosis in dentate gyrus of maternally separated rats." Mol Psychiatry **6**(6): 610, 725-8.
- Leitch, M. M., C. D. Ingram, et al. (2003). "Flattening the corticosterone rhythm attenuates 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor function in the rat: relevance for depression." Neuropsychopharmacology **28**: 119-125.
- Lemaire, V., M. Koehl, et al. (2000). "Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 11032-7.
- Liebsch, G., R. Landgraf, et al. (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.
- Liebsch, G., A. C. E. Linthorst, et al. (1998). "Behavioral, physiological, and neuroendocrine stress responses and differential sensitivity to Diazepam in two wistar rat lines selectively bred for high- and low- anxiety related behavior." Neuropsychopharmacology **19**(5): 382-395.
- Liebsch, G., A. Montkowski, et al. (1998). "Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour." Behavioural Brain Research **944**: 301-310.
- Liebsch, G., C. T. Wotjak, et al. (1996). "Septal vasopressin modulates anxiety-related behaviour in rats." Neurosci Lett **217**(2-3): 101-4.
- Linthorst, A. C., R. G. Penalva, et al. (2002). "Forced swim stress activates rat hippocampal serotonergic neurotransmission involving a corticotropin-releasing hormone receptor-dependent mechanism." Eur J Neurosci **16**(12): 2441-52.
- Linthorst, A. C. E., C. Flachskamm, et al. (2000). "Glucocorticoid receptor impairment alters CNS responses to a psychological stressor: an in vivo microdialysis study in transgenic mice." European Journal of Neuroscience **12**(1): 283-291.
- Linthorst, A. C. E., C. Flachskamm, et al. (1997). "Long-term intracerebroventricular infusion of corticotropin-releasing hormone alters neuroendocrine, neurochemical, autonomic, behavioral, and cytokine responses to a systemic inflammatory challenge." J Neurosci **17**: 4448-4460.
- Linthorst, A. C. E., S. Karanth, et al. (1999). "Impaired glucocorticoid receptor function evolves in aberrant physiological responses to bacterial endotoxin." European Journal of Neuroscience **11**(1): 178-186.
- Lopez-Figueroa, A. L., C. S. Norton, et al. (2004). "Serotonin 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, and 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA expression in subjects with major depression, bipolar disorder, and schizophrenia." Biol Psychiatry **55**(3): 225-33.
- López, J. F., D. T. Chalmers, et al. (1998). "Regulation of serotonin 1A, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression." Biol Psychiatry **43**: 547-573.
- Lowther, S., F. De Paermentier, et al. (1997). "5-HT<sub>1A</sub> receptor binding sites in post-mortem brain samples from depressed suicides and controls." J Affect Disord **42**(2-3): 199-207.
- Lucassen, P. J., A. Salehi, et al. (1994). "Activation of vasopressin neurons in aging and Alzheimer's disease." Journal of Neuroendocrinology **6**: 673-679.

- Lucki, I. (1997). "The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs." Behav Pharmacol **8**(6-7): 523-32.
- Ludwig, M. (1998). "Dendritic release of vasopressin and oxytocin [Review]." Journal of Neuroendocrinology **10**(12): 881-895.
- Ma, X.-M. and G. Aguilera (1999). "Differential regulation of corticotropin-releasing hormone and vasopressin transcription by glucocorticoids." Endocrinology **140**: 5642-5650.
- Madsen, T. M., A. Treschow, et al. (2000). "Increased neurogenesis in a model of ECT." Biological Psychiatry **47**: 1043-1049.
- Madsen, T. M., D. D. Yeh, et al. (2005). "Electroconvulsive seizure treatment increases cell proliferation in rat frontal cortex." Neuropsychopharmacology **30**(1): 27-34.
- Malberg, J. E. (2004). "Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action." J Psychiatry Neurosci **29**(3): 196-205.
- Malberg, J. E., A. J. Eisch, et al. (2000). "Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus." The Journal of Neuroscience **20**(24): 9104-9110.
- Marsden, C. D., S. R. G. Beckett, et al. (1995). Serotonin in the Central Nervous System and Periphery. Amsterdam, Elsevier.
- McAllister-Williams, R. H., I. N. Ferrier, et al. (1998). "Mood and neuropsychological function in depression: the role of corticosteroids and serotonin." Psychological Medicine **28**: 573-584.
- McKittrick, C. R., D. C. Blanchard, et al. (1995). "Serotonin receptor binding in a colony model of chronic social stress." Biol Psychiatry **37**(6): 383-93.
- McNamara, B., J. L. Ray, et al. (2001). "Transcranial magnetic stimulation for depression and other psychiatric disorders." Psychol Med **31**(7): 1141-6.
- Meijer, O. C. and E. R. de Kloet (1998). "Corticosterone and serotonergic neurotransmission in the hippocampus: functional implications of central corticosteroid receptor diversity." Critical Reviews in Neurobiology **12**: 1-20.
- Meijer, O. C., R. V. VanOosten, et al. (1997). "Elevated basal trough levels of corticosterone suppress hippocampal 5-HT<sub>1A</sub> receptor expression in adrenalectomized rats: Implication for the pathogenesis of depression." Neuroscience **80**(2): 419-426.
- Miczek, K. A. (1979). "A new test for aggression in rats without aversive stimulation: differential effects of d-amphetamine and cocaine." Psychopharmacology (Berl) **60**(3): 253-9.
- Millan, M. J. (2003). "The neurobiology and control of anxious states." Progress In Neurobiology **70**: 83-244.
- Modell, S., C. J. Lauer, et al. (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**(4): 253-62.
- Modell, S., A. Yassouridis, et al. (1997). "Corticosteroid receptor function is decreased in depressed patients." Neuroendocrinology **65**: 216-222.
- Molliver, M. E. (1987). "Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function." J Clin Psychopharmacol **7**(6 Suppl): 3S-23S.
- Mongeau, R., P. Blier, et al. (1997). "The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments." Brain Res Brain Res Rev **23**(3): 145-95.

- Montkowski, A., N. Barden, et al. (1995). "Long-term antidepressant treatment reduces behavioural deficits in transgenic mice with impaired glucocorticoid receptor function." Journal of Neuroendocrinology **7**: 841-845.
- Morris, J. F., H. Christian, et al. (2000). "Dendritic secretion of peptides from hypothalamic magnocellular neurosecretory neurones: a local dynamic control system and its functions." Exp Physiol **85 Spec No**: 131S-138S.
- Müller, M. B., R. Landgraf, et al. (2000). "Vasopressin, major depression, and hypothalamic-pituitary-adrenocortical desensitization." Biological Psychiatry **48**(4): 330-333.
- Müller, M. B., N. Toschi, et al. (2000). "Long-term repetitive transcranial magnetic stimulation increases the expression of brain-derived neurotrophic factor and cholecystikinin mRNA, but not neuropeptide tyrosine mRNA in specific areas of rat brain." Neuropsychopharmacology **23**: 205-215.
- Nacher, J., G. Alonso-Llosa, et al. (2003). "NMDA receptor antagonist treatment increases the production of new neurons in the aged rat hippocampus." Neurobiol Aging **24**(2): 273-84.
- Nacher, J., D. R. Rosell, et al. (2001). "NMDA receptor antagonist treatment induces a long-lasting increase in the number of proliferating cells, PSA-NCAM-immunoreactive granule neurons and radial glia in the adult rat dentate gyrus." Eur J Neurosci **13**(3): 512-20.
- Nahas, Z., M. Lomarev, et al. (2001). "Unilateral left prefrontal transcranial magnetic stimulation (TMS) produces intensity-dependent bilateral effects as measured by interleaved BOLD fMRI." Biol Psychiatry **50**(9): 712-20.
- Nemeroff, C. B. (1996). "The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new finding and new directions." Molecular Psychiatry **1**: 336-342.
- Nemeroff, C. B. and M. J. Owens (2004). "Pharmacologic differences among the SSRIs: focus on monoamine transporters and the HPA axis." CNS Spectr **9**(6 Suppl 4): 23-31.
- Neumaier, J. F., E. Edwards, et al. (2002). "5-HT(1B) mRNA regulation in two animal models of altered stress reactivity." Biol Psychiatry **51**(11): 902-8.
- Nordmann, J. J. and G. Dayanithi (1988). "Release of neuropeptides does not only occur at nerve terminals." Biosci Rep **8**(5): 471-83.
- Ohl, F., N. Toschi, et al. (2001). "Dimensions of emotionality in a rat model of innate anxiety." Behavioral Neuroscience **115**(2): 429-436.
- Osterlund, M. K., D. H. Overstreet, et al. (1999). "The flinders sensitive line rats, a genetic model of depression, show abnormal serotonin receptor mRNA expression in the brain that is reversed by 17beta-estradiol." Brain Res Mol Brain Res **74**(1-2): 158-66.
- Padberg, F. and H. J. Möller (2003). "rTMS: does it have potential in the treatment of depression?" CNS Drugs **17**(6): 383-403.
- Pare, W. P., G. R. Blair, et al. (1999). "Gender differences in acute and chronic stress in Wistar Kyoto (WKY) rats." Integr Physiol Behav Sci **34**(4): 227-41.
- Pare, W. P. and S. M. Tejani-Butt (1996). "Effect of stress on the behavior and 5-HT system in Sprague-Dawley and Wistar Kyoto rat strains." Integr Physiol Behav Sci **31**(2): 112-21.
- Pariante, C. M., A. Hye, et al. (2003). "The antidepressant clomipramine regulates cortisol intracellular concentrations and glucocorticoid receptor expression in fibroblasts and rat primary neurones." Neuropsychopharmacology **28**(9): 1553-61.

- Pariante, C. M., R. B. Kim, et al. (2003). "Antidepressant fluoxetine enhances glucocorticoid receptor function in vitro by modulating membrane steroid transporters." Br J Pharmacol **139**(6): 1111-8.
- Parks, C. L., P. S. Robinson, et al. (1998). "Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(18): 10734-9.
- Pascual-Leone, A., M. D. Catalá, et al. (1996). "Lateralized effect of rapid-rate transcranial magnetic stimulation of the prefrontal cortex on mood." Neurology **46**: 499-502.
- Pascual-Leone, A., F. Tarazona, et al. (1999). "Transcranial magnetic stimulation and neuroplasticity." Neuropsychologia **37**(2): 207-17.
- Pascual-Leone, A., J. Valls-Sol\*, et al. (1994). "Responses to rapid-rate transcranial magnetic stimulation of the human motor cortex." Brain **117**: 847-858.
- Paxinos, G. and C. Watson (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney, Academic Press.
- Pejchal, T., M. A. Foley, et al. (2002). "Chronic fluoxetine treatment selectively uncouples raphe 5-HT(1A) receptors as measured by [(35)S]-GTP gamma S autoradiography." Br J Pharmacol **135**(5): 1115-22.
- Pellow, S., P. Chopin, et al. (1985). "Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat." Journal of Neuroscience Methods **14**: 149-167.
- Penalva, R. G., C. Flachskamm, et al. (2002). "CRH receptor type 1- deficiency enhances hippocampal serotonergic neurotransmission: An in vitro microdialysis study on mutant mice." Neuroscience **109**(2): 253-266.
- Pollier, F., S. Sarre, et al. (2000). "Serotonin reuptake inhibition by citalopram in rat strains differing for their emotionality." Neuropsychopharmacology **22**: 64-76.
- Porsolt, R. D., M. Le Pichon, et al. (1977). "Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments." Nature **266**(5604): 730-2.
- Porter, R. J., P. Gallagher, et al. (2004). "Corticosteroid-serotonin interactions in depression: a review of the human evidence." Psychopharmacology (Berl) **173**(1-2): 1-17.
- Post, A. and M. E. Keck (2001). "Transcranial magnetic stimulation as a therapeutic tool in psychiatry: what do we know about the neurobiological mechanisms? [Review]." Journal of Psychiatric Research **35**(4): 193-215.
- Post, A., M. B. Muller, et al. (1999). "Repetitive transcranial magnetic stimulation in rats: evidence for a neuroprotective effect in vitro and in vivo." European Journal of Neuroscience **11**(9): 3247-3254.
- Pow, D. V. and J. F. Morris (1989). "Dendrites of hypothalamic magnocellular neurons release neurohypophysial peptides by exocytosis." Neuroscience **32**(2): 435-9.
- Price, M. L., A. L. Curtis, et al. (1998). "Effects of corticotropin-releasing factor on brain serotonergic activity." Neuropsychopharmacology **18**(6): 492.
- Price, M. L. and I. Lucki (2001). "Regulation of serotonin release in the lateral septum and striatum by corticotropin-releasing factor." J Neurosci **21**(8): 2833-41.
- Pridmore, S. (1999). "Rapid transcranial magnetic stimulation (rTMS) and normalisation of the Dexamethasone suppression test (DST)." Psychiatry and Clinical Neurosciences **53**: 33-37.
- Purba, J. S., W. J. G. Hoogendijk, et al. (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, F. C., A. A. Sluiter, et al. (1993). "Localization of CRH neurons in the paraventricular nucleus of the human hypothalamus; age dependent colocalization with vasopressin." Brain Research **615**(1): 50-62.
- Raap, D. K. and L. D. VanDeKar (1999). "MINIREVIEW: Selective serotonin reuptake inhibitors and neuroendocrine function." Life Sciences **65**(12): 1217-1235.
- Rakic, P. (2002). "Adult neurogenesis in mammals: An identity crisis." The Journal of Neuroscience **22**(3): 614-618.
- Ressler, K. J. and C. B. Nemeroff (2000). "Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders." Depression and Anxiety **12**(s1): 2-19.
- Reul, J. M. H. M. and E. R. de Kloet (1985). "Two receptor systems for corticosterone in the rat brain: microdistribution and differential occupation." Endocrinology **117**: 2505-2512.
- Reul, J. M. H. M., A. Gesing, et al. (2000). "The brain mineralocorticoid receptor: greedy for ligand, mysterious in function [Review]." European Journal of Pharmacology **405**(1-3): 235-249.
- Reul, J. M. H. M., M. S. Labeur, et al. (1994). "Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis changes in the rat after long-term treatment with reversible monoamine oxidase-A inhibitor moclobemide." Neuroendocrinology **60**: 509-519.
- Reul, J. M. H. M., I. Stec, et al. (1993). "Chronic treatment of rats with the antidepressant amitriptyline attenuates the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system." Endocrinology **133**: 312-320.
- Rex, A., J. P. Voigt, et al. (1999). "Behavioral and neurochemical differences between Fischer 344 and Harlan-Wistar rats raised identically." Behav Genet **29**(3): 187-92.
- Rivier, C., M. Brownstein, et al. (1982). "*In vivo* corticotropin-releasing factor-induced secretion of adrenocorticotropin,  $\beta$ -endorphin and corticosterone." Endocrinology **110**: 272-278.
- Rossini, P. M., A. T. Barker, et al. (1994). "Non-invasive electrical and magnetic stimulation of the brain, spinal cord and roots: basic principles and procedures for routine clinical application." Electroencephalography and Clinical Neurophysiology **91**: 79-92.
- Sachdev, P. S., R. McBride, et al. (2002). "Effects of different frequencies of transcranial magnetic stimulation (TMS) on the forced swim test model of depression in rats." Biol Psychiatry **51**(6): 474-9.
- Sairanen, M., G. Lucas, et al. (2005). "Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus." J Neurosci **25**(5): 1089-94.
- Salome, N., P. Salchner, et al. (2004). "Neurobiological correlates of high (HAB) versus low anxiety-related behavior (LAB): differential Fos expression in HAB and LAB rats." Biol Psychiatry **55**(7): 715-23.
- Sawchenko, P. E., L. W. Swanson, et al. (1983). "The distribution and cells of origin of the serotonergic inputs to the paraventricular and suprapubic nuclei of the rat." Brain Research **277**: 355-360.
- Scharfman, H., J. Goodman, et al. (2005). "Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats." Exp Neurol **192**(2): 348-56.
- Schiller, L., M. Jahkel, et al. (2003). "Autoradiographic analyses of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors after social isolation in mice." Brain Res **980**(2): 169-78.

- Schinkel, A. H., E. Wagenaar, et al. (1995). "Absence of the mdr1a P-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin and cyclosporin." American Journal of Clinical Investigation **96**: 1698-1705.
- Scott, B. W., J. M. Wojtowicz, et al. (2000). "Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat following electroconvulsive shock seizures." Experimental Neurology **165**: 231-236.
- Scott, L. V. and T. G. Dinan (2002). "Vasopressin as a target for antidepressant development: an assessment of the available evidence." J Affect Disord **72**(2): 113-24.
- Scott, L. V., S. Medbak, et al. (1998). "Blunted adrenocorticotropin and cortisol responses to CRH stimulation in chronic fatigue syndrome." Acta psychiatr Scand **97**: 450-457.
- Shen, C., H. Li, et al. (2002). "Repeated treatment with antidepressants differentially alters 5-HT<sub>1A</sub> agonist-stimulated [<sup>35</sup>S]GTP gamma S binding in rat brain regions." Neuropharmacology **42**(8): 1031-8.
- Shirayama, Y., A. C. Chen, et al. (2002). "Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression." J Neurosci **22**(8): 3251-61.
- Shors, T. J., G. Miesegaes, et al. (2001). "Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories." Nature **410**: 372-376.
- Singewald, N., S. Kaehler, et al. (1997). "Release of serotonin in the rat locus coeruleus: effects of cardiovascular, stressful and noxious stimuli." Eur J Neurosci **9**(3): 556-62.
- Siuciak, J. A., D. R. Lewis, et al. (1997). "Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)." **56**(1): 131-137.
- Soares, J. C. and J. J. Mann (1997). "The functional neuroanatomy of mood disorders." J Psychiatr Res **31**(4): 393-432.
- Stockmeier, C. A., G. E. Dilley, et al. (1997). "Serotonin receptors in suicide victims with major depression." Neuropsychopharmacology **16**(2): 162-73.
- Stout, J. C., M. J. Owens, et al. (2002). "Regulation of CRF neuronal systems and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity by stress and chronic antidepressant treatment." The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **300**: 1085-1092.
- Takagishi, M. and T. Chiba (1991). "Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tracer PHA-L study." Brain Res **566**(1-2): 26-39.
- Tanapat, P., N. B. Hastings, et al. (2001). "Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism." J Comp Neurol **437**(4): 496-504.
- Thrivikraman, K. V., R. L. Huot, et al. (2002). "Jugular vein catheterization for repeated blood sampling in the unrestrained conscious rat." Brain Res Brain Res Protoc **10**: 84-94.
- Tilders, F. J. H., E. D. Schmidt, et al. (1993). "Phenotypic plasticity of CRF neurons during stress." Ann NY Acad Sci **697**: 39-52.
- Truss, M. and M. Beato (1993). "Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors." Endocr Rev **14**(4): 459-79.
- Vacher, C.-M., P. Frétier, et al. (2002). "Activation by serotonin and noradrenaline of vasopressin and oxytocin expression in the mouse paraventricular and supraoptic nuclei." The Journal of Neuroscience **22**(5): 1513-1522.

- Vale, W., J. Spiess, et al. (1981). "Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and  $\beta$ -endorphin." Science **213**: 1394-1397.
- Van De Kar, L. D., A. Javed, et al. (2001). "5-HT<sub>2A</sub> receptors stimulate ACTH, corticosterone, oxytocin, renin, and prolactin release and activate hypothalamic CRF and oxytocin-expressing cells." The Journal of Neuroscience **21**(10): 3572-3579.
- Van Praag, H., A. F. Schinder, et al. (2002). "Functional neurogenesis in the adult hippocampus." Nature **415**: 1030-1034.
- Voigt, J. P., A. Rex, et al. (1999). "Hippocampal 5-HT and NE release in the transgenic rat TGR(mREN2)27 related to behavior on the elevated plus maze." Eur Neuropsychopharmacol **9**(4): 279-85.
- von Bardeleben, U. and F. Holsboer (1989). "Cortisol response to a combined dexamethasone-human corticotropin-releasing hormone challenge in patients with depression." Journal of Neuroendocrinology **1**: 485-488.
- von Bardeleben, U., F. Holsboer, et al. (1985). "Combined administration of human corticotropin-releasing factor and lysine vasopressin induces cortisol escape from dexamethasone suppression in healthy subjects." Life Sciences **37**: 1613-18.
- Wassermann, E. M., A. Pascual-Leone, et al. (1993). "Topography of the inhibitory and excitatory responses to transcranial magnetic stimulation in a hand muscle." Electroencephalography and clinical Neurophysiology **89**: 424.
- Welner, S. A., C. De Montigny, et al. (1989). "Autoradiographic quantification of serotonin<sub>1A</sub> receptors in rat brain following antidepressant drug treatment." Synapse **4**(4): 347-52.
- West, A. P. (1990). "Neurobehavioral studies of forced swimming: the role of learning and memory in the forced swim test." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **14**(6): 863-77.
- Wotjak, C. T., J. Ganster, et al. (1998). "Dissociated central and peripheral release of vasopressin, but not oxytocin, in response to repeated swim stress: new insights into the secretory capacities of peptidergic neurons." Neuroscience **85**(4): 1209-1222.
- Wotjak, C. T., M. Kubota, et al. (1996). "Release of vasopressin from supraoptic neurons within the median eminence in vivo. A combined microdialysis and push-pull perfusion study in the rat." Brain Res **726**(1-2): 237-41.
- Wotjak, C. T., M. Kubota, et al. (1996). "Release of vasopressin within the rat paraventricular nucleus in response to emotional stress: a novel mechanism of regulating adrenocorticotrophic hormone secretion?" The Journal of Neuroscience **16**(23): 7725-7732.
- Wotjak, C. T., M. Ludwig, et al. (2002). "Vasopressin from hypothalamic magnocellular neurons has opposite actions at the adenohypophysis and in the supraoptic nucleus on ACTH secretion." European Journal of Neuroscience **16**: 477-485.
- Wotjak, C. T., T. Naruo, et al. (2001). "Forced swimming stimulates the expression of vasopressin and oxytocin in magnocellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus." European Journal of Neuroscience **13**: 2273-2281.
- Young, D., P. A. Lawlor, et al. (1999). "Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective." Nat Med **5**(4): 448-53.

- Zhang, Y., D. K. Raap, et al. (2000). "Long- term fluoxetine produces behavioral anxiolytic effects without inhibiting neuroendocrine responses to conditioned stress in rats." Brain Research **855**: 58-66.
- Zhong, P. and R. D. Ciaranello (1995). "Transcriptional regulation of hippocampal 5-HT1a receptors by corticosteroid hormones." Brain Res Mol Brain Res **29**(1): 23-34.
- Zobel, A. W., T. Nickel, et al. (2001). "Cortisol response in the combined dexamethasone/CRH test as predictor of relapse in patients with remitted depression. a prospective study." J Psychiatr Res **35**(2): 83-94.
- Zobel, A. W., A. Yassouridis, et al. (1999). "Prediction of medium-term outcome by cortisol response to the comined dexamethasone-CRH test in patients with remitted depression." American Journal of Psychiatry **156**: 949-951.
- Zyss, T., Z. Gorka, et al. (1997). "Preliminary comparison of behavioral and biochemical effects of chronic transcranial magnetic stimulation and electroconvulsive shock in rat." Biological Psychiatry **42**: 920-924.

## 7 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Tobias Welt  
Anschrift: Luisenstr.53  
80333 München  
Geboren am / in: 26.02.1975 / Frankfurt am Main

### Ausbildung:

1994 Abitur am Lessing-Gymnasium Mannheim

1994-1995 Zivildienst im OP-Bereich der St.Hedwig Klinik in Mannheim

Oktober 1995 Aufnahme des Medizinstudiums an der Ruprecht Karls-Universität Heidelberg

Mai 1999 Wechsel an die Technische Universität München

1999-2003 Anstellung als Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der präklinischen Arbeitsgruppe „Verhaltensneuroendokrinologie“ am Max Planck-Institut für Psychiatrie, München

2001-2002 Praktisches Jahr im Rahmen des Medizinstudiums, Neurologie (MRI, München), Chirurgie (MRI, München), Innere Medizin (Ospedale Bolzano, Italien)

November 2002 Abschluss des Medizinstudiums mit dem Staatsexamen (Gesamtnote: gut)

März 2003-2004 Promotionsstudent an der Ludwig Maximilians-Universität München

Juli 2004-September 2004

Arzt im Praktikum am Max Planck-Institut für  
Psychiatrie, München

Seit Oktober 2004

Stipendiat der Max-Planck-Gesellschaft und  
Assistenzarzt am Max-Planck-Institut für  
Psychiatrie, München

## 8 Danksagung

Mein vorrangiger Dank gilt Privat-Dozent Dr. Dr. Martin E. Keck, der durch seine ungewöhnlich engagierte Betreuung optimale Voraussetzungen zur Durchführung der vorliegenden Dissertation schuf. Er führte mich in die Welt neuropeptiderger Systeme ein und erhellte die Zusammenhänge akademischer Hierarchien, ohne deren Kenntnis sich die konkrete Arbeitspraxis wohl wesentlich freudloser gestaltet hätte. Seine unermüdliche Unterstützung nicht nur in experimentellen und theoretisch-wissenschaftlichen sondern auch psychosozialen Angelegenheiten war für die erfolgreiche Fertigstellung dieser Arbeit unabdingbar.

Weiterhin möchte ich Dr. Angelika Erhardt und Dr. Nicola Toschi für ihre tatkräftige und oft nächtelange Unterstützung und Mithilfe bei der Durchführung der Experimente danken. Ihre menschliche Kompetenz machte selbst lange Arbeitszeiten zum Vergnügen.

Ein Großteil der Versuche wurde in der Arbeitsgruppe „Verhaltensneuroendokrinologie“ von Prof. Dr. Rainer Landgraf durchgeführt. Für die Bereitstellung der erforderlichen Geräte, Räumlichkeiten sowie Unterstützung in technischen Fragen möchte ich mich hiermit bedanken.

Meinen Eltern, Erica und Rüdiger Welt, möchte ich für ausdauernde persönliche und finanzielle Unterstützung über all die Jahre danken, ohne die eine akademische Laufbahn in Deutschland wohl kaum möglich gewesen wäre.

Ragnheiður Maren Hafstað danke ich für Geduld, Liebe und psychologische Unterstützung.

Abschließend danke ich Prof. Dr. Dr. Florian Holsboer, dem Direktor des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie in München, für die Bereitstellung der räumlichen und finanziellen Voraussetzungen zur Durchführung dieser Dissertation.