

JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ



**Erforschung von Stressresilienz:
Longitudinale Verhaltensstudien und molekulare
Analyse des mTOR-Signalwegs mit
Interventionsstrategien nach chronisch-sozialem
Stress bei Mäusen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

Marlon Wendelmuth

März 2023

Erstgutachter:

Zweitgutachter:

Datum der mündlichen Prüfung: 12.07.2023

Inhaltsverzeichnis

Abstract	-1-
Zusammenfassung	-3-
1 Einleitung	-5-
1.1 Begriff der Stressresilienz	-5-
1.2 Untersuchung von Resilienz im Tiermodell	-6-
1.3 Resilienz als Folge von Angstlöschung	-7-
1.3.1 Eine CSDS-induzierte soziale Vermeidung kann ausgelöscht werden	-8-
1.4 Stress- und Resilienzmechanismen	-10-
1.4.1 Stress- und Resilienzmechanismen des neuroendokrinen Systems	-10-
1.4.2 Stress- und Resilienzmechanismen des zentralen Nervensystems	-10-
1.4.2.1 Stress- und Resilienzmechanismen von VTA-NAc	-11-
1.4.2.2 Stress- und Resilienzmechanismen im Präfrontalen Cortex	-13-
1.4.2.3 Stress- und Resilienzmechanismen im Hippocampus	-14-
1.5 Die mechanistic target of Rapamycin (mTOR) Signalkaskade	-15-
1.5.1 Die mTOR- Signalkaskade als Resilienzregulator	-17-
1.6 Blut-Hirn-Schranke	-18-
1.6.1 Zellen und Bestandteile der BHS	-20-
1.6.1.1 Endothelzellen	-20-
1.6.1.2 Murale Zellen	21-
1.6.1.3 Basalmembran	-22-
1.6.1.4 Astrozyten	22-
1.6.1.5 Immunzellen	-23-
1.6.2 Mechanismen (einschließlich molekularer und signalisierender Wege die der stressbedingten Störung der Blut-Hirn-Schranke zugrunde liege	-23-
1.6.3 Stressinduzierte Hochregulierung und Transport von proinflammatorischen Molekülen in das Gehirn als kritischer Faktor für die Störung der Blut-Hirn-Schranke	-23-
1.7 Die Blutgerinnungskaskade	-25-
1.7.1 Extrinsischer Weg	-26-
1.7.2 Intrinsischer Weg	-27-
1.7.3 Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin	-27-
1.7.4 Regulierung der Blutgerinnung	-28-
1.7.5 Der Endothel-Protein-C-Rezeptor	-29-
1.7.5.1 EPCR-Expression und Lokalisierung	-29-
1.7.5.2 Signalübertragung und zytoprotektive Effekte von EPCR	-30-
1.7.5.3 Verwendete Endothelzellen-Protein-C-Rezeptor-Mausmodelle	-34-
1.7.6 Nematoden Antikoagulanz Protein c2 (NAPc2)	-34-
1.8 Zielsetzung	-36-
2 Materialien und Methoden	-37-
2.1 Material	-37-
2.1.1 Chemikalien	-37-
2.1.2 Zellkultur	-38-
2.1.3 Enzyme.....	-38-
2.1.3.1 weitere Enzyme	-38-
2.1.4 Zelllinien und Mausstämme	-38-
2.1.5 Längenstandards.....	-38-
2.1.6 Kits	-39-
2.1.7 Oligonukleotide	-39-
2.1.7.1 Primer für qRT-PCR	-39-
2.1.7.2 Primer für die Tsc2 Genotypisierung	-39-

2.1.8 Antikörper	-40-
2.1.9 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	-40-
2.1.9.1 PCR-Geräte	-41-
2.1.9.2 Gelkammern für Agarosegelelektrophorese	-41-
2.1.9.3 Gel-Dokumentationssystem	-41-
2.1.9.4 Pipetten.....	-41-
2.1.9.5 Zentrifugen.....	-41-
2.1.9.6 Binokulare und Mikroskope	-41-
2.1.9.7 Geräte für die Zellkultur.....	-41-
2.1.9.8 Geräte zur DNA-, RNA- und Proteinquantifizierung	-42-
2.1.9.9 Geräte für SDS-PAGE und Western Blot	-42-
2.1.9.10 Geräte für histologische Arbeiten.....	-42-
2.1.10 EDV.....	-42-
2.2 Methoden	-43-
2.2.1 Zellbiologische Methoden	-43-
2.2.1.1 Kultivierung und Passagieren der HEK Zellen	-43-
2.2.1.2 Zellzahlbestimmung.....	-43-
2.2.1.3 Behandlung mit Rapamycin	-43-
2.2.1.4 Zellernte	-44-
2.2.1.5 Kryokonservierung	-44-
2.2.1.6 Auftauen	-44-
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	-44-
2.2.2.1 Arbeiten mit RNA	-44-
2.2.2.1.1 Isolierung von RNA aus Hirngewebe der Maus	-44-
2.2.2.1.2 Reverse Transkription	-45-
2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäurelösungen und Proteinlysate ...	-45-
2.2.2.2.1 Konzentrationsbestimmungen am UV-Vis-Spektrophotometer.....	-45-
2.2.2.2.2 Konzentrationsbestimmungen mit Qubit®	-46-
2.2.2.3 Quantitative PCR (qPCR)	-46-
2.2.2.4 Arbeiten mit DNS	-48-
2.2.2.4.1 Extraktion genomischer DNS aus Ohrlochstanzen.....	-48-
2.2.2.4.2 PCR zur <i>Tsc2</i> -Genotypisierung	-49-
2.2.2.4.3 Agarosegelelektrophorese	-51-
2.2.3 Histologische Methoden	-52-
2.2.3.3 Mikropräparation gefrorener Hirnschnitte nach Palkovits	-52-
2.2.4 Verhaltensexperimente im Mausmodell.....	-52-
2.2.4.1 Induktion des chronisch sozialen Stresses	-52-
2.2.4.1.1 Chronic Social Defeat Paradigm	-52-
2.2.4.2 Sozialverhalten der Mäuse	-53-
2.2.4.2.1 Social Interaction (SI) (2-chamber).....	-53-
2.2.4.2.2 Social Novelty	-54-
2.2.4.3 Angstverhalten der Mäuse	-55-
2.2.4.3.1 Elevated Plus Maze (EPM).....	-55-
2.2.4.3.2 Open Field (OF)	-55-
2.2.4.4 Testung der Gedächtnisleistung	-56-
2.2.4.4.1 24 hour Novel Object Recognition Task (24 h NORT)	-56-
2.2.4.4.2 Y-Maze.....	-57-
2.2.4.5 generelles Wohlbefinden und natürliche Verhaltensweisen	-57-
2.2.4.5.1 Grooming.....	-57-
2.2.4.5.2 Nest Building	-58-
2.2.4.6 Analyse von depressivem Verhalten.....	-58-
2.2.4.6.1 Sucrose Preference	-58-

2.2.4.6.2 Tail Suspension	-59-
2.2.5 Proteinbiochemische Methoden	-59-
2.2.5.1 Herstellung von Proteinlysaten.....	-59-
2.2.5.2 SDS-PAGE	-60-
2.2.5.3 Western Blot	-62-
2.2.5.4 Immunofärbung des Western Blot	-62-
3 Ergebnisse.....	-63-
3.1 Longitudinale Verhaltensanalyse bei C56BL6/JRj nach chronisch sozialem Stress (CSS)	-63-
3.1.1 Verhaltensanalysen in C57BL/JRj zu unterschiedlichen Zeitpunkten	-63-
3.1.1.1 Sozialverhalten und Gedächtnisleistung 24 Stunden nach CSS.....	-63-
3.1.1.2 Sozialverhalten und Gedächtnisleistung 7 Tage nach CSS.....	-65-
3.1.1.3 Sozialverhalten und Gedächtnisleistung 3 Wochen nach CSS	-67-
3.1.1.4 Korrelationsanalyse der Verhaltensdomänen Sozialverhalten und Gedächtnis-	
leistung zu unterschiedlichen Zeitpunkten	-71-
3.1.2 Individuelle Verhaltensanalyse von C57BL6/JRj Mäusen bei wiederholter Testung zu	
verschiedenen Zeitpunkten nach CSS.....	-71-
3.1.2.1 Individuelle Analyse des Sozialverhaltens	-71-
3.1.2.2 Individuelle Analyse der Gedächtnisleistung.....	-74-
3.1.3 Expressionsstudien von aktivitätsabhängigen Genen in gedächtniskonsolidierenden	
Gehirnregionen bei drei Monate alten C57BL/6JRj Mäusen	-78-
3.1.3.1 Gewichtsanalyse bei C57BL/6JRj Mäusen während des chronisch sozialen	
Stresses.....	-78-
3.1.3.2 Sozialverhalten nach chronisch sozialem Stress und Selektion der anfälligen	
und resilienten Mäuse	-80-
3.1.3.3 qPCR-Ergebnisse	-80-
3.1.4 Molekulare Analyse von Proteinen der mTOR-Signalkaskade und der Blut-Hirn-Schranke	
in verschiedenen Hirnregionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach CSS	-82-
3.1.4.1 24 Stunden nach CSS.....	-82-
3.1.4.2 7 Tage nach CSS	-84-
3.1.4.3 3 Wochen nach CSS.....	-86-
3.2 Verhaltensversuche nach Intervention in die mTOR-Signalkaskade	-88-
3.2.1 Sozialverhalten nach chronisch-sozialem Stress und Rapamycin Behandlung	-89-
3.2.1.1 Social Interaction Test (SI)	-89-
3.2.2 Kognitive Leistung nach chronisch-sozialem Stress (CSS) und Rapamycin Behandlung	
3.2.2.1 24 h Novel Object Recognition Task (24 h NORT)	-90-
3.2.3 Nestbauverhalten nach chronisch-sozialem Stress und Rapamycin Behandlung	-91-
3.2.3.1 Nest Building (NB).....	-91-
3.2.4 Molekulare Analyse von Proteinen der mTOR-Signalkaskade nach	
Gabe von Rapamycin	-93-
3.2.5 Gewichtsanalyse nach chronisch-sozialem Stresses bei Tsc2 ^{+/-} Mäusen.....	-95-
3.2.6 Sozialverhalten nach chronisch-sozialem Stresses bei Tsc2 ^{+/-} Mäusen.....	-96-
3.2.6.1 Social Interaction Test (SI)	-96-
3.2.6.2 Social Novelty (SN).....	-97-
3.2.7 Angstverhalten nach CSS bei Tsc2 ^{+/-} Mäusen	-98-
3.2.7.1 Elevated Plus Maze (EPM)	-99-
3.2.7.2 Open Field (OF)	-99-
3.2.8 Kognitive nach CSS in Mäusen bei Tsc2 ^{+/-} Mäusen	-101-
3.2.8.1 Y-Maze	-101-
3.2.9 Generelles Wohlbefinden bei Tsc2 ^{+/-} Mäusen nach CSS.....	-102-
3.2.9.1 Grooming	-102-
3.2.10 Testung auf depressive Verhaltensweisen nach chronisch-sozialem Stresses bei Tsc2 ^{+/-}	
Mäusen	-103-

3.2.10.1 Sugar Preference Test (SSP).....	-103-
3.2.10.2 Tail Suspension.....	-104-
3.3 Verhaltensversuche mit Mäusen mit veränderter Endothel-und Koagulationskaskade nach chronisch sozialem Stress	-106-
3.3.1 Sozialverhalten nach chronisch-sozialem Stress in Mäusen mit Defekt im <i>Procr</i> Gen.....	-106-
3.3.1.1 Social Interaction Test (SI)	-106-
3.3.2 Angstverhalten nach chronisch-sozialem Stress in Mäusen mit Defekt im <i>Procr</i> Gen.....	-109-
3.3.2.1 Elevated Plus Maze (EPM)	-109-
3.3.3 Kognitive Leistung nach CSS in Mäusen mit Defekt im <i>Procr</i> Gen	-111-
3.3.3.1 24 h Novel Object Recognition Task (24 h NORT)	-111-
3.3.4 Nestbauverhalten nach CSS in Mäusen mit Defekt im <i>Procr</i> Gen	-113-
3.3.4.1 Nest Building (NB)	-113-
3.3.5 Sozialverhalten nach chronisch-sozialem Stress in Mäusen mit Defekt im <i>Procr</i> Gen und anschließender NAPc2 Behandlung	-116-
4 Diskussion	-118-
4.1 Longitudinale Verhaltensanalyse bei C56BL6/JRj nach chronisch sozialem Stress (CSS) ...	-118-
4.1.1 Verhaltensanalysen in C57BL/JRj zu unterschiedlichen Zeitpunkten	-118-
4.1.2 Expressionsstudien von aktivitätsabhängigen Genen in Gedächtnis-konsolidierenden Gehirnregionen	-121-
4.1.3 Adulte C57BL6/JRj zeigen geringe Expressionsunterschiede von Proteinen der mTOR-Signalkaskade in stressassoziierten Gehirnregionen	-123-
4.2 Verhaltensversuche nach Intervention in die mTOR-Signalkaskade	-126-
4.2.1 Die Gabe des mTOR-Inhibitors Rapamycin führt zu einer Rettung des stressanfälligen Phänotyps in adulten C57BL6/JRj nach chronisch sozialem Stress	-126-
4.2.2 Die Gabe des mTOR-Inhibitors Rapamycin führt zu einer allgemeinen Herunterregulierung der mTOR Aktivität im Gehirnparenchym	-126-
4.2.3 Heterozygote <i>Tsc2</i> Mäuse zeigen nach chronisch-sozialem Stress im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen geringe Unterschiede im Verhalten	-127-
4.3 Verhaltensversuche mit Mäusen mit veränderter Endothel-und Koagulationskaskade nach chronisch sozialem Stress	-132-
5 Literaturverzeichnis	-136-
6 Anhang.....	-148-
6.1 weitere Informationen.....	-148-
6.2 Abkürzungsverzeichnis	-149-
6.3 Tabellenverzeichnis	-152-
6.4 Abbildungsverzeichnis	-153-
6.5 Eidesstattliche Erklärung.....	-157-
6.5 Danksagung.....	-158-

Abstract

Chronic social stress (CSS) in rodents can lead to impairments in social interaction and other behaviors that may be part of major depressive disorder (MDD). Not all animals exposed to CSS develop these impairments, and maintenance of social interaction skills in some animals is often used as a model of resilience to stress-related mental disorders. To date, animals have been studied primarily shortly after CSD exposure, and longitudinal development of behavioral phenotypes in individual animals has been largely neglected. In this work, social interaction ability and novel object recognition were analyzed in stressed mice at different time points after CSS. Very dynamic behavioral trajectories were found in individual animals. Instead of the two groups, resilient or susceptible, found at early time points, our data suggest four groups, with (i, ii) animals behaving resiliently or susceptibly at early and late time points, respectively, (iii) animals that are initially susceptible and recover over time, or (iv) animals that are resilient at early time points but develop susceptibility later.

Protein biochemical analysis of proteins of the mTOR signaling cascade in different stress-associated brain regions indicated differences in regulation between resilient and susceptible animals, particularly in the nucleus accumbens shortly after termination of the stress paradigm. However, effects in other regions were small. In addition, the effect of manipulating the mTOR signaling cascade was also examined. For this purpose, the mTOR inhibitor rapamycin was used for pharmacological intervention after stress exposure. By this intervention, stress resilience was significantly increased in the animals. We were thus able to confirm the pro-resilient effects of the inhibitor described in the literature. However, protein biochemical analysis of proteins of the mTOR signaling cascade after the intervention showed broad effects and no targeted regulation in the parenchyma of the studied brain regions. It has been previously shown that mTOR inhibition also leads to peripheral effects, in which mTOR appears to be an important mediator of blood-brain barrier (BBB) integrity by regulating the expression of matrix metalloproteases. Rapamycin and other rapalogues can maintain or restore BBB integrity. There has been previous evidence in the literature that BBB integrity is disrupted in susceptible wild-type animals. We used a mouse model with an altered EPCR receptor. EPCR is part of the blood coagulation cascade. It also mediates cytoprotective effects on BBB endothelial cells. Our results showed that loss of the cytoprotective effects of EPCR signaling leads to increased stress vulnerability and, consequently, decreased social interaction capacity after stress exposure. On the one hand, this result confirms that increased BBB permeability leads to a susceptible phenotype. Second, it establishes a direct link between blood coagulation and stress resilience. We subsequently demonstrated that pharmacological inhibition of thrombin, which mediates barrier-disrupting effects, led to an

Abstract

improvement in the social interaction ability of stressed animals. These results provide a basis for further investigation of BBB integrity using tracers, as well as pharmacological interventions with additional thrombin inhibitors and mTOR inhibitors.

Thus, the results of this work indicate new approaches for the therapy of stress-induced depression.

Zusammenfassung

Chronisch sozialer Stress (CSS) kann bei Nagetieren zu Beeinträchtigungen der sozialen Interaktion und anderer Verhaltensweisen führen, die Teil einer schweren depressiven Störung (MDD) sein können. Nicht alle Tiere, die CSS ausgesetzt sind, entwickeln diese Beeinträchtigungen, und die Aufrechterhaltung der sozialen Interaktionsfähigkeit bei einigen Tieren wird häufig als Modell für die Widerstandsfähigkeit gegenüber stressbedingten psychischen Störungen verwendet. Bislang wurden die Tiere hauptsächlich kurz nach der CSD-Exposition untersucht, und die Längsschnittentwicklung von Verhaltensphänotypen bei einzelnen Tieren wurde weitgehend vernachlässigt. In dieser Arbeit wurde das soziale Interaktionsvermögen und das Erkennen neuer Objekte bei gestressten Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach CSS analysiert. Dabei wurden sehr dynamische Verhaltensverläufe bei einzelnen Tieren festgestellt. Anstelle der zwei Gruppen, Resiliente oder Anfällige, die zu frühen Zeitpunkten gefunden werden, deuten unsere Daten auf vier Gruppen hin, mit (i, ii) Tieren, die sich zu frühen und späten Zeitpunkten resilient bzw. anfällig verhalten, (iii) Tieren, die anfangs anfällig sind und sich mit der Zeit erholen oder (iv) Tieren, die zu frühen Zeitpunkten resilient sind, aber später eine Anfälligkeit entwickeln.

Eine proteinbiochemische Analyse von Proteinen der mTOR-Signalkaskade in verschiedenen stressassoziierten Gehirnregionen zeigte Unterschiede in der Regulierung zwischen resilienten und anfälligen Tieren insbesondere im Nucleus accumbens kurz nach Beendigung des Stressparadigmas an. Die Effekte in anderen Regionen waren jedoch gering. Zusätzlich wurde auch der Effekt einer Manipulation der mTOR Signalkaskade untersucht. Dazu wurde der mTOR-Inhibitor Rapamycin nach der Stressexposition zur pharmakologischen Intervention eingesetzt. Durch diese Maßnahme war die Stressresilienz in den Tieren signifikant erhöht. Wir konnten damit die in der Literatur beschriebenen pro-resilienten Effekte des Inhibitors bestätigen. Jedoch zeigte die proteinbiochemische Analyse von Proteinen der mTOR-Signalkaskade nach der Intervention breite Effekte und keine gezielte Regulation im Parenchym der untersuchten Gehirnregionen. Es konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass die mTOR Inhibition auch zu peripheren Effekten führt. mTOR scheint dabei ein wichtiger Vermittler der Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu sein, da es die Expression von Matrix-Metalloproteasen reguliert. Rapamycin und andere Rapaloga können die Integrität der BHS aufrechterhalten bzw. wiederherstellen. Es gab in der Literatur bereits Hinweise darauf, dass bei anfälligen wildtypischen Tieren die Integrität der BHS gestört ist. Wir verwendeten ein Mausmodell mit einem veränderten EPCR Rezeptor. EPCR ist Teil der Blutgerinnungskaskade. Es vermittelt zudem zytoprotektive Effekte an den Endothelzellen der BHS. Unsere Ergebnisse zeigten, dass ein Verlust der zytoprotektiven Effekte der EPCR

Zusammenfassung

Signalisierung zu einer erhöhten Stressanfälligkeit und folglich zu einer verringerten sozialen Interaktionsfähigkeit nach Stressexposition führt. Dieses Ergebnis bestätigt zum Einen, dass eine erhöhte BHS Permeabilität zu einem anfälligen Phänotyp führt. Zum Anderen stellt es eine direkte Verbindung zwischen Blutkoagulation und Stressresilienz her. Wir konnten in der Folge zeigen, dass die pharmakologische Inhibition von Thrombin, welches Barriere-störende Effekte vermittelt, zu einer Verbesserung der sozialen Interaktionsfähigkeit der gestressten Tiere führte. Diese Ergebnisse bilden eine Grundlage für weitere Untersuchungen der BHS Integrität mittels Tracer, sowie pharmakologischer Interventionen mit weiteren Thrombininhibitoren und mTOR Inhibitoren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen somit neue Ansatzmöglichkeiten zur Therapie von stressinduzierten Depressionen auf.

1 Einleitung

1.1 Begriff der Stressresilienz

Der Begriff der „Resilienz“ im Kontext von Stress ist als adaptive Aufrechterhaltung von Physiologie und Verhalten ohne Entwicklung von Krankheitszeichen trotz Stresses, Traumata und Widrigkeiten definiert (Liu et al., 2018). Man könnte zunächst denken, dass hierfür besondere biologische und soziale Fähigkeiten und Bewältigungsstrategien notwendig wären (Bonanno, 2004). Allerdings zeigt sich, dass viele Menschen keine Angstzustände oder Depressionen entwickeln. Das was wir als resilientes Verhalten erleben ist die erfolgreiche Anwendung körpereigener adaptiver Prozesse zur Aufrechterhaltung einer gesunden physiologischen Funktion infolge einer Stressreaktion. Diese biologischen Prozesse die zur Aufrechterhaltung der Homöostase als Reaktion auf einen Stressor dienen, werden in der Literatur als Allostase bezeichnet (McEwen, 2002).

Resilienz wurde dabei lange als statische Persönlichkeitseigenschaft beschrieben, die vor aversiven Stressreaktionen schützt - ein Ja oder Nein in der Fähigkeit des Einzelnen, sich zu verteidigen. Es wird jedoch immer deutlicher, dass Resilienz das Ergebnis eines dynamischen Prozesses ist, der im Laufe der Zeit zu einer erfolgreichen Anpassung an Stressoren führt. Dies wurde in einem Konzeptpapier von Kalisch et al. zusammengefasst, die ein sogenanntes "hybrides Symptom- und Resilienzfaktorenmodell" entworfen haben (Kalisch et al., 2019). Darin werden psychiatrische Symptome in einem gut vernetzten Netzwerk beschrieben, das sich gegenseitig beeinflusst, und Resilienzfaktoren als Knotenpunkte, die an variablen Ankerpunkten in das Netzwerk eingreifen. Dies bedeutet jedoch, dass die Netzwerke zu verschiedenen Zeitpunkten individuell unterschiedliche Stadien erreichen können, indem sie entweder in einen verletzlichen, anfälligen Zustand übergehen oder einen Punkt der Anpassung und Funktionalität erreichen.

Da stressbedingte Störungen wie Angstzustände und Depressionen sowohl für die Patienten als auch die Gesellschaft eine große Belastung darstellen ist die Erforschung der Resilienzmechanismen in den letzten beiden Jahrzehnten immer weiter in den Fokus gerückt. Laut American Psychiatric Association erkrankt in den Vereinigten Staaten von Amerika 1 aus 6 Personen im Laufe ihres Lebens an einer klinischen Depression (major depressive disorder, MDD). Unbehandelt kann eine solche klinische Depression zu einer chronischen Erkrankung werden, die das Leben der Betroffenen stark einschränkt. Eine Behandlung mit Antidepressiva führt nur bei ca. einem Drittel der Patienten zu einer Verbesserung der Symptomatik. Ein besseres Verständnis der allostatischen Resilienzmechanismen könnte hierbei helfen

Therapien und Behandlungsstrategien, bzw. Interventionen zur Resilienzstärkung für besonders vulnerable Gruppen zu finden.

Depressionen und Angstzustände werden zunehmend ganzheitlich betrachtet. Man betrachtet dabei verschiedene Organe und Organsysteme und wie diese reguliert bzw. dysreguliert sind. Im Falle der Stressresilienz sind es insbesondere allostatistische Mechanismen im autonomen Nervensystem, der Hypothalamo-Hypophysen-Nebennieren (HPA) Achse, dem Gehirn und dem Immunsystem (McEwen, 2002).

1.2 Untersuchung von Resilienz im Tiermodell

Die humane Resilienzforschung hat bisher schon viele Erkenntnisse über die Rolle diverser Neurotransmitter, Neuropeptide und Hormone sowie unterschiedlicher genetischer Faktoren erbracht (Russo et al., 2012). Jedoch gibt es in Bezug auf die praktische Durchführung und ethische Richtlinien, Gründe für den Einsatz von Tieren in der Resilienzforschung. Für diese Arbeit wurde als Modell das Chronic Social Defeat Stress (CSDS) Modell verwendet. Das Chronic Social Defeat Paradigma induziert chronisch sozialen Stress in männlichen adulten Nagetieren wie Mäusen und Ratten. Die Tiere zeigen daraufhin einen stressanfälligen oder resilienten Phänotyp. Im ursprünglich im Labor von Eric Nestler entwickelten CSDS-Modell wird eine C57BL/6J-Maus an 10 aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt von einer größeren, aggressiven CD-1-Maus attackiert und sozial unterworfen (Golden et al., 2011). Anschließend an den physischen Kampf werden die Mäuse über Nacht in einem Käfig gehalten. Sie sind dabei, um physische Interaktion zu unterbinden, durch eine Plastikwand vom Tier des Aggressorstammes getrennt. Ein sensorischer Kontakt ist gegeben. Nach chronisch sozialem Stress zeigen etwa 80% der Mäuse einen stressanfälligen Phänotyp (anfällige Tiere). Sie weisen dabei verschiedene depressionsähnliche Verhaltensweisen wie Anhedonie oder ein vermindertes soziales Interesse auf (Krishnan et al., 2007). Neben den Verhaltensänderungen wurde auch das Auftreten eines metabolischen Syndroms, welches durch Gewichtszunahme oder Insulinresistenz gekennzeichnet ist, beobachtet (Chuang et al., 2010). Dabei ist jedoch zu beachten, dass der chronisch soziale Stress bei C57BL/6 Mäusen zu einer Gewichtszunahme führt, bei anderen Stämmen wie den DBA Mäusen jedoch zu einer Gewichtsabnahme (Misiewicz et al., 2019). Die Tiere, die keine stressanfälligen Erscheinungen zeigten, wurden als „resiliente Tiere“ definiert. Sie weisen geringere Corticosteronwerte auf und zeigen geringeres Angstverhalten (Krishnan et al., 2007) als die anfälligen Tiere. Die chronische Gabe von Antidepressiva führt bei den anfälligen Tieren zu einer Remission der CSDS-induzierten Depressionen (Berton et al., 2006, Tsankova et al., 2006). Einige Biomarker, die in Patienten mit MDD gefunden wurden, waren auch bei stressanfälligen Mäusen nach CSD dysreguliert (Krishnan et al., 2007, Golden et al., 2013, Robison et al., 2014). Dies unterstreicht den Nutzen des Paradigmas hinsichtlich der

Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen bei der Untersuchung depressionsähnlicher Verhaltensweisen.

1.3 Resilienz als Folge von Angstlöschung

Die Tiere wurden im Anschluss an das CSD-Modell in einem sozialen Interaktionstest mit einer unbekanntem CD-1 Maus als Interaktionspartner getestet und in Resiliente und suszeptible (anfällige) Tiere unterteilt (Golden et al., 2011). Das Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen, welche das individuelle Abschneiden der Tiere bedingt sind jedoch weitestgehend ungeklärt (Ayash et al., 2020, Journal of psychiatric research). Ayash et al. vermuteten, dass das CSDS Paradigma, wie es im Labor von Prof. Nestler und in der Folge auch in vielen anderen Laboren benutzt wird, auf einer Angstkonditionierung der Tiere beruht. Die Autoren der Studie untersuchten daher inwieweit das durch den CSD verursachte Vermeidungsverhalten durch konditioniertes Lernverhalten bedingt sein könnte. Zudem sollte darauf aufbauend untersucht werden, ob sich diese aversive Erinnerung auch wieder löschen lassen könnte (Extinktion).

Konditioniertes Lernen ist eine evolutionär konservierte Form des Lernens, über die Tiere verfügen, um Bedrohungen zu erkennen und auf sie zu reagieren (Ayash et al., 2020, Journal of psychiatric research). Kontinuität, welches in der Psychologie als das zeitliche Zusammenkommen zweier Reize definiert ist, ist dabei der zentrale Punkt. Konditioniertes Lernen findet nur dann statt, wenn die Wahrscheinlichkeit des unkonditionierten Reizes (potenzieller Angriff) in Anwesenheit des konditionierten Reizes (phänotypische Merkmale des Aggressors) anders ist als in seiner Abwesenheit (Ayash et al. 2020, Journal of psychiatric research; Hofmann, 2008). Dies ist durch die Natur des CSD-Paradigmas gegeben und führt schließlich zu einer konditionierten Reaktion (soziale Vermeidung). Konditioniertes Lernen ist jedoch nicht nur das Ergebnis von Kontinuität, sondern es spielen auch noch andere Faktoren eine Rolle. Neben dem zeitlichen Zusammenkommen der Reize ist zudem entscheidend inwieweit das Individuum die Situation kontrollieren und abschätzen kann (Ayash et al., 2020, Journal of psychiatric research; Mineka und Zinbarg, 2006; Lucas et al., 2014). Generalisierung und Probleme mit der Extinktion der Erinnerungen wurden bereits zuvor als Vulnerabilitätsfaktoren nach dem Auftreten traumatischer Ereignisse diskutiert (Ayash et al., 2020, Journal of psychiatric research; Banerjee et al., 2017). Im Gegensatz dazu wurden die Fähigkeit zur Unterscheidung und Extinktion als resilienzfördernde Faktoren betrachtet (Ayash et al., 2020, Journal of psychiatric research; Banerjee et al., 2017). Ayash et al. entwickelten ein Paradigma bei welchem während des Tests sowohl die Interaktion mit CD1 als auch mit einer unbekanntem Maus des Stammes Sv129 möglich war. Dies ermöglichte die Unterteilung der anfälligen Mäuse anhand ihres Verhaltens gegenüber anderen Artgenossen in Diskriminierer (Interaktion mit Sv129 aber, vermindert gegenüber CD-1) bzw. Generalisierer

(verminderte Interaktion mit beiden Stämmen). Resiliente Mäuse zeigten ein homogenes Verhalten gegenüber allen Mäusen. Eine genauere Untersuchung dieser Unterteilung könnte zu einer Neudefinition der resilienten Untergruppe im Mausmodell führen, und zwar in einer Weise, die mit der menschlichen Literatur übereinstimmt, insbesondere im Hinblick auf Diskriminierung und Löschung als vorgeschlagene Resilienzfördernde Faktoren. Die Autoren schlagen vor, dass Mäuse, die in der Lage sind, den Hinweis/Kontext innerhalb eines traumatischen Ereignisses zu spezifizieren, mit größerer Wahrscheinlichkeit einen resilienten Phänotyp aufweisen als solche mit einer generalisierten Reaktion an beiden Enden des Spektrums. Die Ergebnisse des modifizierten Tests und die Stabilität des Vermeidungsphänotyps in der gestressten Gruppe wurden durch Testung mit dem in der Literatur zuvor beschriebene sozialen Interaktionstest bestätigt. Zudem zeigte sich, dass das Arbeitsgedächtnis, das räumliche Gedächtnis und die Kontaktfreudigkeit mit einem jugendlichen Tier im Vergleich zu einem unbelebten Objekt bei den gestressten Tieren intakt waren. Die Autoren interpretierten die Ergebnisse so, dass das Verhalten während des modifizierten sozialen Interaktionstests nicht auf eine allgemeine, durch chronischen Stress verursachte Beeinträchtigung der kognitiven Fähigkeiten und des Sozialverhaltens zurückzuführen war, sondern auf ein kontextbasiertes Lernverhalten während eines traumatischen Ereignisses. In einem zweiten Experiment untersuchten die Wissenschaftler ob die Löschung der während des CSDs gebildeten negativen Assoziation (soziale Vermeidung) erreicht werden könnte.

1.3.1. Eine CSDS-induzierte soziale Vermeidung kann ausgelöscht werden

Beim konditionierten Lernen wird eine Reaktion auf einen konditionierten Reiz ausgelöst, wenn dieser konsequent das Auftreten eines unkonditionierten Reizes signalisiert. Wird der konditionierte Reiz wiederholt dargeboten, aber nicht mehr mit dem unkonditionierten Reiz kombiniert, wird diese Reaktion anschließend gelöscht (Ayash et al., 2020, Journal of psychiatric research). Um die Hypothese des konditionierten Lernens weiter zu untermauern, untersuchten Ayash et al, ob die Löschung der gebildeten negativen Erinnerung (soziale Vermeidung) erreicht werden könnte. Zu diesem Zweck konzipierten sie ein unabhängiges Experiment, in dem die Tiere nach dem CSDS und dem Test zur sozialen Interaktion zufällig in zwei Gruppen aufgeteilt wurden, von denen eine eine Extinktionsbehandlung erhielt. Expositionstherapie-sitzungen beim Menschen deuten darauf hin, dass eine emotionale Aktivierung des Systems für das Umlernen erforderlich ist (Ayash et al., 2020, Journal of psychiatric research). Bei der Stressinokulation handelt es sich um eine Form der kognitiven Verhaltenstherapie, bei der Menschen, die unter Bedingungen arbeiten, in denen sie trotz widriger Umstände leistungsfähig sein müssen, wie z. B. medizinisches und militärisches Personal, Polizisten, Feuerwehrleute und Rettungskräfte, zeitweise leichten Stresssituationen

Einleitung

ausgesetzt werden (Brockhurst et al., 2015). Auf Tiermodelle übertragene Stressinokulationsstudien wurden in der Literatur schon beschrieben und beeinflussten das Studiendesign bei Ayash et al. entsprechend (Brockhurst et al., 2015). Die Stressinokulationssitzungen zeigten, dass die ausschließliche Verwendung der sensorischen Phase des CSD ausreicht, um das Stressreaktionssystem zu aktivieren (emotionale Aktivierung). Gleichzeitig ermöglichte es den C57BL/6J Mäusen eine Gelegenheit zum Lernen der Kontrollierbarkeit dieser Stresssituation. Die Kontrollierbarkeit der Situation beeinflusst die Wahrnehmung des Stressors und in der Folge die Bewältigung bzw. die Extinktion dieses Stressors. (Ayash et al., 2020, *Journal of psychiatric research*; Lucas et al., 2014; Hofmann, 2008). Die Ergebnisse des modifizierten sozialen Interaktionstests wurden von Ayash et al. so interpretiert, dass die kollektiven phänotypischen Merkmale der Aggressoren der Auslöser für den Stress sind. Die Autoren gehen desweiteren davon aus, dass Mäuse, die in der Lage sind, ihre aversiven Erinnerungen zu löschen einen widerstandsfähigeren Phänotyp aufweisen, als Mäuse die generalisierten. Bei der Extinktion geht es um das Erlernen von Assoziationen zwischen beobachteten Ereignissen, die zu neuen Erwartungen an den konditionierten Stimulus und den unkonditionierten Stimulus führen (Ayash et al., 2020, *Translational psychiatry*). Auf den Ergebnissen ihrer ersten Studie aufbauend sollte in einer zweiten Studie ein Stressinokulationstraining eingesetzt werden. Auch hier war die Annahme, dass eine verlängerte und wiederholte Exposition gegenüber Ereignissen, zu einem erfahrungsabhängigen Lernprozess führt. Die Autoren konnten zeigen, dass die Extinktion durch das Stressinokulationsprogramm verstärkt werden kann. Die durch Stressinokulation induzierte Bewältigung der Stresssituation sollte das Ergebnis von Lern- und Gedächtnismechanismen sein, die auch bei der Extinktion eine Rolle spielten. Ayash et al. vermuteten, dass hier der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)/extrazelluläre signalregulierte Kinase (ERK)-Signalweg involviert sein könnte. Es konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass der MAPK/ERK-Signalweg bei der Gedächtniskonsolidierung in der basolateralen Amygdala, dem dorsalen Hippocampus und dem medialen präfrontalen Cortex eine Rolle spielt (Yamada et al., 2019). Der selektive Delta-Opioidrezeptor-Agonisten (KNT-127) erleichterte das Extinktionslernen des kontextuellen Furchtgedächtnisses. KNT-127 erhöhte hierbei die Menge an phosphoryliertem ERK in der Amygdala und im Hippocampus. Yamada et al. vermuteten daher, dass die MAPK/ERK-Signalübertragung im Amygdaloid und im Hippocampus als Schlüsselvermittler für die Verstärkung des Extinktionslernens des Kontext-bezogenen Furchtgedächtnisses dient. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass drei verschiedene schnell wirkende Antidepressiva die ERK- und mTORC1 Signalisierung sowie die BDNF-Freisetzung in einer aktivitätsabhängigen Weise steigerten, was zu einer erhöhten neuronalen Komplexität führte (Lepack et al. 2016).

1.4 Stress- und Resilienzmechanismen

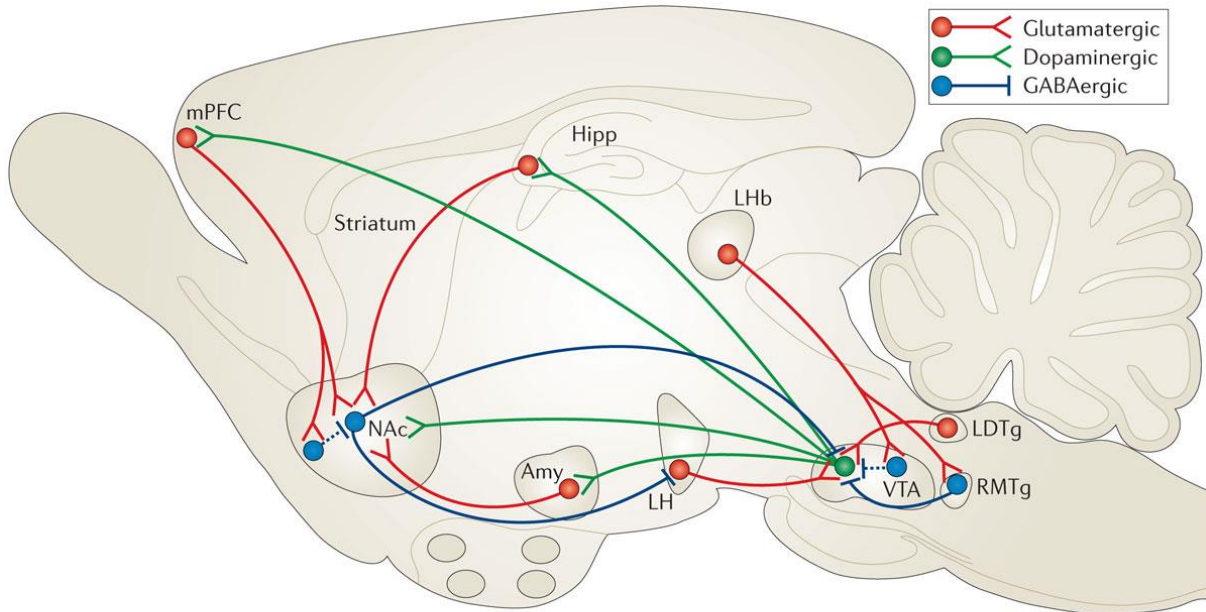
1.4.1 Stress- und Resilienzmechanismen des neuroendokrinen Systems

Stressreaktionen werden vom autonomen Nervensystem, der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA) Achse und neuronalen Schaltkreisen des Hypothalamus, Hirnstamms und Vorderhirns vermittelt (Ulrich-Lai und Herman, 2009). Dabei werden zunächst präganglionäre sympathische Nerven des Rückenmarks aktiviert. Diese wiederum projizieren auf prä- oder paravertebrale ganglionäre Neuronen, welche an kardiovaskulären und viszeralen Organen oder am Nebennierenmark enden und dort die Freisetzung von Adrenalin aus dem Nebennierenmark und Noradrenalin aus sympathischen Nervenfasern stimulieren. Dies führt zu Veränderungen der Herzfrequenz und zu Gefäßverengungen, wodurch der Blutdruck ansteigt. Innerhalb der HPA Achse führt Stress zu einer Aktivierung von Neuronen des paraventriculären Kerns (paraventricular nucleus PVN) des Hypothalamus. Diese produzieren den Corticotropin-Releasing-Faktor (CRF) und Arginin-Vasopressin (AVP) und sondern diese in den Kreislauf ab. Daraufhin wird der Hypophysenvorderlappen zur Ausschüttung von adrenocorticotropem Hormon (ACTH) angeregt. ACTH wiederum aktiviert die Synthese und Freisetzung von Glukokortikoiden aus der Nebennierenrinde. Zwischen dem autonomen Nervensystem und der HPA Achse kommt es so zu verschiedenen Wechselwirkungen. Die Nebennierenrinde wird vom sympathischen Nervensystem innerviert, welches die Glukokortikoidfreisetzung reguliert. Glukokortikoide vermitteln Stressreaktionen des autonomen Nervensystems, einschließlich der Vasokonstriktion. Veränderungen innerhalb dieser Systeme wurden sowohl bei Patienten mit klinischer Depression als auch bei Patienten mit posttraumatischer Belastungsstörung gefunden (Russo et al., 2012).

1.4.2 Stress- und Resilienzmechanismen des zentralen Nervensystems

Die bisherigen Erkenntnisse über Resilienzmechanismen im ZNS beziehen sich insbesondere auf das mesokortikolimbische System des Gehirns. Das mesokortikolimbische System vermittelt positiv motivierte Verhaltensweisen und Verstärkungslernen im Hinblick auf Belohnungsreize (Volman et al., 2013; Russo und Nestler, 2013). Die neuronalen Schaltkreise des mesokortikolimbischen Systems verbinden den lateralen Hypothalamus, das ventrale tegmentale Areal, den Nucleus accumbens, die Amygdala, den Hippocampus, den medialen präfrontalen Cortex und andere Regionen (siehe Abb. 1.1). Diese Gehirnregionen vermitteln verschiedene psychologische und kognitive Prozesse, welche durch Stress beeinträchtigt werden. (Christoffel et al., 2011).

Einleitung



Nature Reviews | Neuroscience

Abbildung 1.1: Ein vereinfachtes Schema der wichtigsten dopaminergen, glutamatergen und GABAergen Verbindungen zum und vom ventralen tegmentalen Areal (VTA) und Nucleus accumbens (NAc) im Nagetiergehirn. Der primäre Belohnungskreislauf umfasst dopaminerge Projektionen vom VTA zum NAc, die Dopamin als Reaktion auf belohnungsbezogene Reize (und in einigen Fällen auch auf abwehrbezogene Reize) freisetzen. Es gibt auch GABAerge Projektionen vom NAc zum VTA; Projektionen über den direkten Weg (vermittelt durch MSNs vom Typ D1) innervieren das VTA direkt, während Projektionen über den indirekten Weg (vermittelt durch MSNs vom Typ D2) das VTA über dazwischenliegende GABAerge Neuronen im ventralen Pallidum innervieren (nicht gezeigt). Der NAc enthält auch zahlreiche Arten von Interneuronen (Abb. 2). Der NAc erhält eine dichte Innervation durch glutamaterge monosynaptische Schaltkreise aus dem medialen präfrontalen Kortex (mPFC), dem Hippocampus (Hipp) und der Amygdala (Amy) sowie aus anderen Regionen. Das VTA erhält solche Inputs vom lateralen dorsalen Tegmentum (LDTg), der lateralen Habenula (LHb) und dem lateralen Hypothalamus (LH) sowie sowohl GABAerge als auch glutamaterge Verbindungen von der erweiterten Amygdala (nicht gezeigt). Diese verschiedenen glutamatergen Eingänge steuern Aspekte der belohnungsbezogenen Wahrnehmung und des Gedächtnisses. Die gestrichelten Linien zeigen interne hemmende Projektionen an. Der glutamaterge Schaltkreis von der LH zum VTA wird auch durch Orexin vermittelt (nicht gezeigt). Weitere Einzelheiten zu diesen monosynaptischen Schaltkreisen für NAc und VTA sind in Abb. 2 dargestellt. RTMg, rostromediales Tegmentum. (aus Scott und Russo, 2013)

1.4.2.1 Stress- und Resilienzmechanismen von VTA-NAc

Innerhalb des mesokortikolimbischen Systems gehören die neuronalen Verknüpfungen des ventralen tegmentalen Areals zum Nucleus accumbens zu den am Besten untersuchten. Hier projizieren dopaminerge Neuronen des ventralen tegmentalen Areals auf GABAerge mittelgroße dornentragende (medium spiny neurons, MSN) Projektionsneurone des Nucleus accumbens. Die Neuronen des ventralen tegmentalen Areals setzen dabei als Antwort auf belohnungsbezogene, aber auch aversive Reize Dopamin frei. Der Nucleus accumbens kann sowohl direkt als auch indirekt wieder Signale an das ventrale tegmentale Areal zurückgeben. Der direkte Weg erfolgt über mittelgroße dornentragende Neurone vom Typ D1. Der indirekte Weg erfolgt über mittelgroße dornentragende Neurone vom Typ D2, welche zunächst GABAerge Interneuronen im Palladium innervieren. Diese Interneuronen wiederum vermitteln

Einleitung

das Signal über ihre Synapsen zu Neuronen innerhalb des ventralen tegmentalen Areals. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass chronisch sozialer Stress die Erregbarkeit und die spontane Feuerrate der dopaminergen Neuronen innerhalb des ventralen tegmentalen Areals, zumindest akut, erhöhte (Krishnan et al., 2007). Diese durch den Stress ausgelösten Veränderungen normalisierten sich in den resilienten Tieren wieder. In den stressanfälligen Tieren hingegen blieben die Veränderungen bestehen. Die Normalisierung bei den resilienten Tieren war dabei das Ergebnis aktiver kompensatorischer Prozesse, die in der Hochregulierung bestimmter Ionenkanäle in den Tagen nach Stressexposition bei den resilienten Tieren bestand (Chaudhury et al., 2013; Friedman et al., 2014). Die Erregbarkeit der dopaminergen VTA Neurone kann sowohl exogen akut (Sekunden bis Minuten) mittels optogenetischer Manipulation, als auch chronisch (mehrere Tage) über Viren herunterreguliert werden. Dies führte zu einer Renormalisierung des beeinträchtigten Verhaltens in anfälligen Mäusen. Durch diese Ergebnisse wurde ein Zusammenhang zwischen der Erregbarkeitsregulation der VTA Neurone und resilientem Verhalten bestätigt. Die Kontrolle der Erregbarkeit erfolgt sowohl auf Netzwerkebene über tausende synaptische Kontakte als auch intrinsisch über die Expression von Ionenkanälen (Paladini und Roeper, 2014). In vivo Aufnahmen von DA-VTA-Neuronen in resilienten und nicht-resilienten Mäusen zeigten, dass die dopaminergen VTA-Neuronen der stressanfälligen Mäuse - im Vergleich zu nicht-gestressten Kontrolltieren - nach einem Zeitraum von 10 Tagen chronisch sozialen Stresses dauerhaft hyperaktiv blieben (Cao et al., 2010). Sie wiesen sowohl eine höhere mittlere Frequenz bei den Aktionspotenzialen, als eine erhöhte Rate an stärkeren Bursts auf (Cao et al., 2010). Bursts sind dabei vorübergehende hochfrequente Phasen von Aktionspotenzialen, die sehr effektiv die Freisetzung von Dopamin steuern können (Paladini und Roeper, 2014). Bei den resilienten Tieren zeigten sich im Vergleich zu den ungestressten Kontrollen keine dauerhaften Unterschiede in der mittleren Frequenz oder dem Burstmuster (Cao et al., 2010). Diese Ergebnisse stützten vergleichbare Resultate aus in vitro Experimenten (Krishnan et al., 2007). Zusammen stellen diese Ergebnisse einen Zusammenhang zwischen dem zellautonomen Feuern der Neuronen und der Aufrechterhaltung ihrer Erregbarkeit hin. Die dopaminergen Neuronen von resilienten Tieren wiesen im Vergleich zu ungestressten Tieren eine verminderte Anzahl an Aktionspotenzialen, erhöhte Kaliumströme und durch HCN Ionenkanäle vermittelte Kationenströme auf (Friedman et al., 2014). Zusammengenommen zeigten die Ergebnisse, dass die intrinsische Erregbarkeit, welche durch veränderte Kalium- und Kationenströme vermittelt wird, einen Mechanismus zur Ausbildung resilienten Verhaltens nach Stressexposition darstellt. Die genauen Signalprozesse, welche eine wiederholte Stressexposition mit Induktion und Aufrechterhaltung des veränderten Erregbarkeitsphänotyps der dopaminergen Neuronen vermitteln, konnten jedoch bisher nicht identifiziert werden. Vergleichende mRNA-Expressionsstudien zeigten die transkriptionelle

Hochregulierung verschiedener Kaliumkanaluntereinheiten bei resilienten aber nicht bei anfälligen oder ungestressten Tieren (Krishnan et al., 2007). Wie bereits zuvor erwähnt, erhält der Nucleus accumbens nicht nur dopaminerge Reize aus dem ventralen tegmental Areal sondern vor Allem auch glutamaterge Reize aus anderen Hirnregionen. So können der präfrontale Cortex, die Amygdala, der Thalamus und der Hippocampus den Nucleus accumbens über glutamaterge Neuronen beeinflussen. Glutamat ist ein erregender Neurotransmitter in afferenten Signalwegen des Nucleus accumbens, welcher beim Belohnungslernen und der Motivation involviert ist. Das glutamaterge System und die synaptische Plastizität der glutamatergen Neuronen haben folglich eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Behandlung von Depressionen sowie auch Suchterkrankungen. (Le et al., 2020). Auch für GABAerge Neuronen des Nucleus accumbens wurden bereits Effekte beschrieben. GABAerge Neurone im Nucleus accumbens von Mäusen mit depressionsähnlichem Verhalten, welcher durch chronisch unvorhersagbaren Stress induziert wurde, zeigten im Vergleich mit GABAergen Neuronen von resilienten Mäusen eine Abnahme ihrer GABA-Freisetzung, ihrer Spike-Fähigkeit und ihrer Erregungsaufnahme (Zhu et al., 2017). Die Menge an Decarboxylase und vesikulären GABA-Transportern nehmen bei Depressiven, nicht aber bei Resilienten, ab.

1.4.2.2 Stress- und Resilienzmechanismen im Präfrontalen Cortex

Die Stresssignalwege im Gehirn werden vom medialen präfrontalen Cortex (mPFC) stark gehemmt. Maladaptive Verhaltensweisen als Reaktion sind somit auf eine Dysfunktion des mPFC zurückzuführen (Wang et al., 2014). Im Tiermodell führte chronischer Stress zu einer Atrophie und Synapsenverlust in glutamatergen Neuronen im präfrontalen Cortex (Christoffel et al., 2011b; McEwen und Morrison, 2013; Duman und Li, 2012). Zudem zeigte sich eine Reduktion in der Expression sogenannter *immediate early genes* (IEGs) *cFos*, *Zif268* und *Arc* sowohl im Mausmodell als auch in postmortalem Gewebe des anterioren zingulären Cortex depressiver Patienten (Covington et al., 2010). IEGs sind Gene, die als Reaktion auf neuronale Aktivität und neuronale Schädigung koordiniert aktiviert (dynamisch reguliert) werden (Zukin et al. 2004). Die verminderte IEG Expression war aber nur im ventromedialen PFC von anfälligen Mäusen nach chronisch sozialem Stress zu finden. Bei resilienten Tieren war sie hingegen unverändert. Da die IEG-Expression als Äquivalent der Gehirnaktivität angesehen werden kann, kann man daraus schließen, dass die Aktivität bei anfälligen Mäusen, wie bei depressiven Patienten, reduziert ist, aber in resilienten Mäusen aufrechterhalten wird. Die optogenetische Stimulation des PFC in anfälligen Tieren konnte den durch soziale Vermeidung und Anhedonie gekennzeichneten depressiven Phänotyp verbessern. Die Ergebnisse zeigten zudem, dass eine erhöhte Burst-Rate in den glutamatergen Neuronen des PFC mit einer erhöhten Expression von *cFos* assoziiert war. Die durch optogenetische Stimulation induzierte

erhöhte Feuerrate der Projektionsneuronen, welche in andere limbische Gehirnregionen und zu subkortikalen monoaminergen Kernen projizierten, führte letztlich zu antidepressiven Effekten.

1.4.2.3 Stress- und Resilienzmechanismen im Hippocampus

Der Hippocampus ist eine der wichtigsten Gehirnregionen, die die HPA-Achse regulieren. Die Stressoren aktivieren die parvozellulären Neuronen des paraventriculären Nukleus des Hypothalamus und regen diese zur Ausschüttung von Corticotropin-releasing Factor und Vasopressin an, was zu einer Ausschüttung von adrenocorticotropem Hormon aus dem Hypophysenvorderlappen führt. Dieses wiederum fördert die Freisetzung von glukokortikoidalen Stresshormonen aus der Nebennierenrinde in den Blutkreislauf. Der Hippocampus hat über polysynaptische Verbindungen sowohl direkten als auch indirekten Kontakt mit dem paraventriculären Nukleus des Hypothalamus und kann so die HPA Achse über Glucocorticoide und Mineralcorticoide regulieren (Franklin et al., 2012; Levone et al., 2015).

Es hat sich gezeigt, dass der Hippocampus eine für Stress besonders anfällige Region ist. Bei Patienten mit stressassoziierten Erkrankungen wie MDD lassen sich maladaptive strukturelle und funktionelle Veränderungen innerhalb der neuronalen Schaltkreise nachweisen. Zudem zeigen sich abnormale glutamaterge synaptische Reize. Auch eine Verringerung des Volumens ist möglich (Franklin et al., 2012). Glutamaterge Projektionen vom ventralen Hippocampus (vHIP) zum Nucleus accumbens (NAc) regulieren die Anfälligkeit für chronisch sozialen Stress. Bagot et al. konnten zeigen, dass resiliente Mäuse eine verringerte Aktivität im Hippocampus aufweisen (Bagot et al., 2015). Eine Unterdrückung der synaptischen Signalisierung vom ventralen Hippocampus zum Nucleus accumbens mittels optogenetischer Hilfsmittel hatte einen pro-resilienten Effekt. Das Gegenteil, also eine Hyperaktivierung der Signalisierung begünstigte hingegen susceptibles Verhalten. Hier zeigte sich auch, dass der Effekt von der jeweiligen Gehirnregion abhängt. Im Gegensatz zum Hippocampus führte eine Aktivierung des mPFC oder der basolateralen Amygdala nämlich zu pro-resilienten Effekten (Bagot et al., 2015).

Diverse postsynaptische Rezeptoren des Hippocampus, wie z.B. G-Protein-gekoppelte Gama-Aminobuttersäure-B (GABA-B)-Rezeptoren sind an der Stressregulation beteiligt. Eine Deletierung der GABA-B 1a Rezeptoruntereinheit führt zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Stress, während eine Deletierung der Rezeptoruntereinheit GABA-B 1b die Resilienz erhöht (O'Leary et al., 2014).

In vielen Studien wurde jedoch nicht untersucht, welche Signalwege an der Regulierung beteiligt sein könnten. Die mTOR-Signalkaskade wurde als vielversprechender Kandidat genannt (Krishnan et al., 2007; Der-Avakian et al., 2014).

1.5 Die mechanistic target of Rapamycin (mTOR) Signalkaskade

Im Jahre 1964 sammelte eine kanadische Expedition auf der Südpazifikinsel Rapa Nui Bodenproben. Die Proben enthielten das Bodenbakterium *Streptomyces hygroscopicus* aus dem die Wissenschaftler ein Makrolid mit antimykotischen, immunsuppressiven und antitumoralen Eigenschaften isolierten (Vezina et al., 1975). Das Makrolid wurde in Anlehnung an seinen Fundort Rapamycin benannt und erste Studien ergaben, dass es einen Komplex mit der Peptidyl-Prolyl-Isomerase FKBP12 bildet und so die Signalisierung für Zellwachstum und Proliferation hemmt (Chung et al., 1992). Der vollständige Wirkmechanismus blieb jedoch zunächst ungeklärt. Erst zwei Jahre später konnten biochemische Studien das mammalian target of Rapamycin (mTOR) als Ziel des Rapamycin-FKBP12 Komplexes identifizieren. (Brown et al., 1994; Sabatini et al., 1994). mTOR ist eine 259 kD große hoch konservierte Serin/Threonin-Kinase aus der Familie der PI3K-verwandten Kinasen, die ubiquitär in allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Die Proteinkinase bildet die katalytische Untereinheit der mTOR-Proteinkomplexe 1 und 2 (mTORC1 und mTORC2). mTORC1 setzt sich aus drei Hauptkomponenten zusammen: mTOR, Raptor und mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8, auch bekannt als GßL) (Kim et al., 2002; Kim et al., 2003; Hara et al., 2002; Yonezawa et al., 2003). Raptor erleichtert die Bindung von Substraten an mTORC1. mLST8 ist mit der katalytischen Domäne von mTOR assoziiert und stabilisiert die Aktivierungsschleife (auch T-Schleife genannt) der Proteinkinase (Yang et al., 2013). mTORC1 enthält zudem auch die hemmenden Untereinheiten PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40 kDa) (Sancak et al., 2007; Vander Haar et al., 2007; Wang et al., 2007) und DEPTOR (DEP domain containing mTOR interacting protein) (Peterson et al. 2009).

Genau wie mTORC1 enthält auch mTORC2 mTOR und mLST8. Im Gegensatz zu mTORC1 enthält dieser Komplex aber Rictor (rapamycin insensitive companion of mTOR), mSIN1 und die mit mTOR assoziierten Proteine PROTOR 1 und 2 (Jacinto et al., 2004; Jacinto et al., 2006; Sarbassov et al., 2004). Der Rapamycin-FKBP12 Komplex kann mTORC1 direkt hemmen. mTORC2 wird hingegen bei einer akuten Gabe von Rapamycin nicht beeinflusst. Eine langfristige Gabe von Rapamycin führt jedoch ebenfalls zu einer Hemmung von mTORC2. Dabei wird anscheinend die Komplexbildung von mTORC2 verhindert (Lamming et al., 2012).

Die mTOR Signalkaskade kann von verschiedenen extrazellulären Faktoren aktiviert werden. Zu diesen Faktoren gehören BDNF (brain derived neurotrophic factor), Insulin, IGF1 (insulin-growth factor 1), VEGF (vascular endothelial growth factor), CNTF (ciliary neurotrophic factor)

Einleitung

und Glutamat (Lenz und Avruch, 2005; Nie et al., 2010; Quevedo et al., 2002; Takei et al. 2004).

Der mTORC1 wird von Rheb (Ras homolog enriched in brain), einer GTPase, aktiviert. Die Aktivität der GTPase selbst wird vom Tuberöse-Sklerose-Komplex (tuberous sclerosis complex; TSC) inhibiert. Der TSC Komplex besteht aus den drei Kompartimenten TSC1 (Hamartin), TSC2 (Tuberin) und TBC1D7. Der TSC wandelt aktives Rheb-GTP in inaktives Rheb-GDP und unterdrückt so die mTOR Aktivität (Inoki et al., 2003; Li et al., 2004). TSC selbst wird wiederum von verschiedenen anderen Kinasen reguliert. Unter anderem wird TSC durch den ERK (extracellular signal-related kinase) Signalweg, durch S6, durch AKT und den Wingless (Wnt) Signalweg gehemmt (Oshiro et al., 2007; Sancak et al., 2007; Van der Haar et al., 2007). Die Hemmung von TSC führt schließlich zu einer erhöhten mTOR Aktivität. Bei AKT gibt es zudem noch eine Besonderheit. Es kann die mTOR-Aktivität nicht nur mittels TSC fördern, sondern auch über PRAS 40 hemmen.

Die Abnahme der zellulären Energieladung, z.B durch Zuckerentzug, aktiviert die AMP-abhängige Kinase (AMPK), welche den mTORC1 direkt über Phosphorylierung von Raptor oder alternativ über die Phosphorylierung von TSC2 hemmt (Gwinn et al., 2008). Die durch Zuckerentzug induzierte Hemmung von mTORC1 kann aber auch ohne AMPK vermittelt werden (Efeyan et al., 2013). Dabei werden die Rag-GTPasen durch einen lysosomal gebundenen Komplex namens "Ragulator" inaktiv gehalten und erst durch einen Multiproteinkomplex aus GATOR1 und GATOR2 aktiviert.

mTOR reguliert die mRNA Translation. Dies geschieht über die p70 ribosomalen S6-Proteinkinasen 1 und 2 und / oder den eukaryotischen Initiationsfaktor 4E-bindende Proteine (4E-BPs). Die p70 Kinasen haben sowohl gemeinsame als auch unterschiedliche Substrate. Das ribosomale Protein S6 kann von Beiden phosphoryliert werden (Fenton und Gout, 2011). Kinase 1 kann zusätzlich noch eIF4B und eEF2K (eukaryotische Elongationsfaktor-2-Kinase) binden, welche die Translation der Proteine weiter verstärken (Ma und Blenis, 2009).

Die Mehrheit der eukaryotischen mRNAs besitzen ein sogenanntes „Cap“. Dabei handelt es sich um methylierte Guanodin-Wiederholungen innerhalb der 5'- untranslatierten Bereichen der mRNA. Die Struktur des „Cap“ wird von eIF4 reguliert. Die von mTOR regulierten 4E-BPs wiederum hemmen die Bindung von eIF4 an das „Cap“ und somit den Start der Translation. mTOR phosphoryliert die 4E-BPs, welche eIF4E nicht mehr binden können. eIF4E kann dann an das „Cap“ binden und zusammen mit eIF4G und eIF4A die Translation anregen.

Neben der Proteinsynthese kann mTOR auch die Genexpression beeinflussen. Unter anderem werden SREBPs (sterol-response-binding-proteins) durch mTORC1 reguliert. Diese sind an der Lipogenese beteiligt (Peterson et al., 2011). Weitere durch mTORC1 beeinflusste Transkriptionsfaktoren sind z.B. der hypoxieinduzierbare Faktor 1 (HIF1 α) (Hudson et al., 2002) oder YY1 (Cunningham et al., 2007).

1.5.1 Die mTOR- Signalkaskade als Resilienzregulator

Die mTOR Signalkaskade nimmt eine Schlüsselrolle bei der Regulation lokaler Proteintranslation in Neuronen ein. Sie setzt dabei neuronale Stimuli in entsprechende Signalkaskaden um. In der Literatur werden verschiedene, zum Teil widersprüchliche Verbindungen zwischen der Aktivität von mTOR und resilientem Verhalten aufgezeigt. mTOR-aktivierende Faktoren wie BDNF, IGF-1, metabotrope Glutamatrezeptoren und Endocannabinoide spielen bei der Stressresilienz nachweislich eine Rolle (Taliaz et al., 2011, Baldini et al., 2013; Harvey und Shahid, 2012; Hill, 2012). Zudem konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis zwischen GluA1- und GluA2 für die Entwicklung Resilienten Verhaltens relevant ist (Schmidt et al., 2010). Beide sind porenbildende Untereinheiten für postsynaptische AMPA-Rezeptoren. Es zeigte sich, dass ein höheres GluA1/A2-Verhältnis zu höherer Resilienz führte. Die Translation von GluA1-haltigen AMPA-Rezeptoren ist nachweislich von der Aktivierung von mTOR abhängig (Peng et al., 2011; Fortin et al., 2012). Desweiteren haben sowohl das GluA1/GluA2 Verhältnis als auch die mTOR-abhängige Synthese von PSD95 und Neuroliginen einen Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit und somit die Stressresilienz (Popoli et al., 2012).

Neben diesen direkten Verbindungen lassen sich aufgrund genetischer Krankheiten, die durch eine Dysregulation von mTOR verursacht werden, ebenfalls Rückschlüsse auf eine Verbindung zwischen der mTOR Kinase und der Fähigkeit zu resilientem Verhalten ziehen. Patienten mit mTOR Hyperaktivität (Fragiles X-Syndrom und Tuberöse Sklerose) oder mTOR-Hypoaktivität (Rett Syndrom) zeigen signifikante Verhaltensveränderungen, die zu einer verminderten Stressresilienz führen (Chen et al., 2014). Auch im Tiermodell wurde gezeigt, dass in Mäusen mit einer heterozygoten Mutation im *Tsc2* Gen (*Tsc2 +/-*) ein höheres Angstverhalten zeigten als wildtypische C57BL6 Mäuse (Ehninger und Silva, 2011). Dies deutet darauf hin, dass die Homöostase der mTOR Aktivität entscheidend für resilientes Verhalten ist. Für diese Arbeit sollte daher ebenfalls ein heterozygoten *Tsc2* Mausmodell genutzt werden um die Auswirkungen der mTOR-Regulation nach chronisch sozialem Stress zu untersuchen.

Der-Avakian et al. konnten zeigen, dass stressanfällige Ratten im Vergleich mit nicht-gestressten Kontrolltieren eine größere Menge an phosphoryliertem mTOR im VTA

aufwiesen (Der-Avakian et al., 2014). Die chronische Gabe des mTOR-Inhibitors Rapamycin hatte bei Mäusen im Forced Swim Test eine resilienzfördernde Wirkung (Cleary et al., 2008). Andere Studien zeigten, dass die Aktivierung des mTOR-Signalwegs nachweislich auch die Expression funktioneller neuronaler Ionenkanäle, wie z.B. spannungsabhängiger Kaliumkanäle, reguliert (Yao et al., 2013; Wang et al., 2014).

Neben seiner Rolle bei der neuronalen Regulation mittels Ionenkanälen, postsynaptischer Rezeptoren und synaptischer Proteine beeinflusst die mTOR-Kinase auch die Integrität der BHS. In verschiedenen Studien wurde festgestellt, dass die Hemmung der mTOR-Kinase die BHS Integrität erhöhen kann (Chi et al., 2017; Chi et al., 2016; Van Skike et al., 2018; van Vliet et al., 2012).

1.6 Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) stellt eine morphologische und funktionelle Einheit dar, die aus den zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen der Gefäße, den Astrozytenfortsätzen, den Perizyten und den Basalmembranen besteht (Baumgärtner 2007). Die Endothelzellen sind dabei über sogenannte „tight junctions“ miteinander verbunden, die den Raum zwischen den Zellen abdichten. Die Zellen der BHS bilden zusammen mit Neuronen eine neurovaskuläre Einheit (NVU) (s. Abb. 1.2). Die BHS schützt das ZNS vor systemischen Einflüssen, insbesondere auch vor immunologischen Reaktionen. Bei einer Schädigung der BHS können entzündliche Prozesse auf das Gehirnparenchym übergreifen. Im Folgenden soll im Detail auf die an der Bildung der BHS beteiligten Zelltypen eingegangen werden.

Einleitung

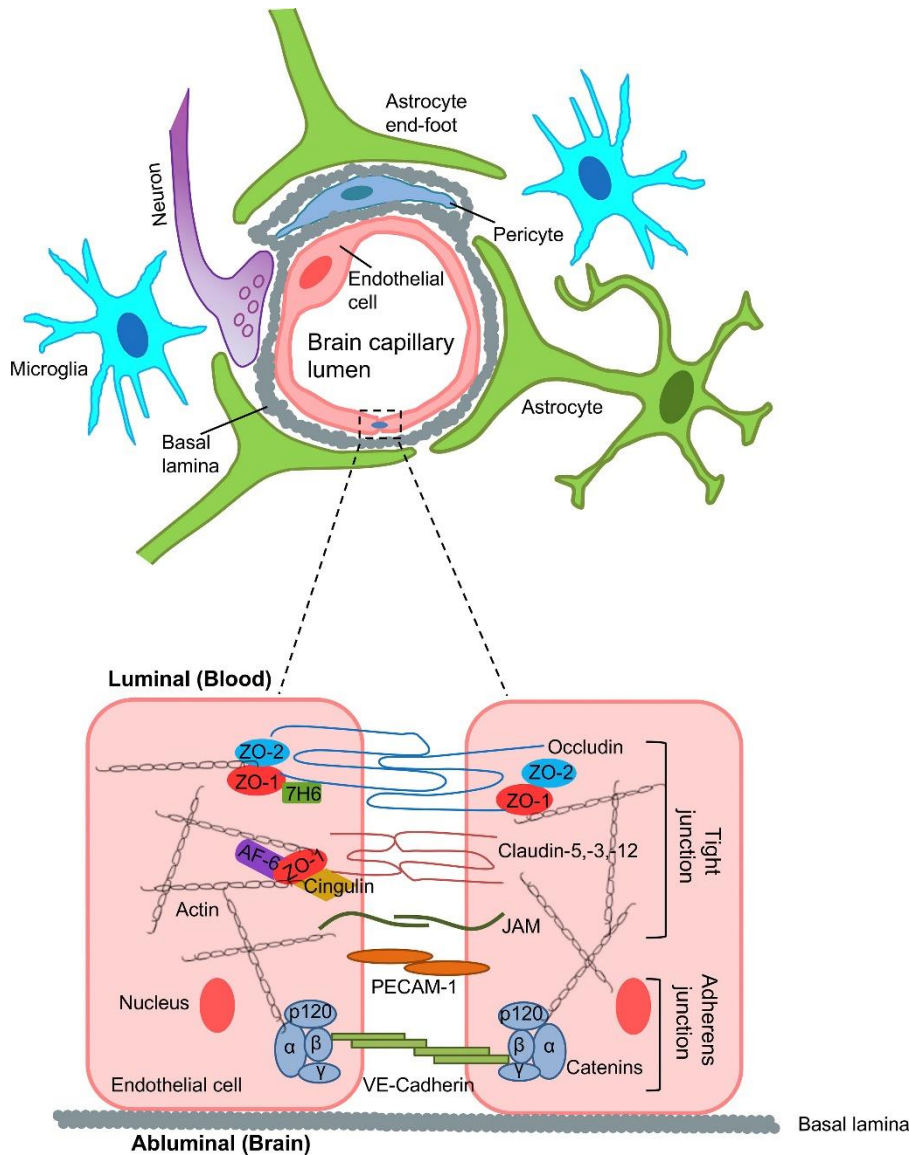


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der neurovaskulären Einheit. Mikrovasculäre Endothelzellen des Gehirns bilden die Blut-Hirn-Schranke (BHS). Das Konzept der neurovaskulären Einheit (NVU) unterstreicht die Bedeutung der engen Wechselwirkungen zwischen Hirnendothel und Astrozyten, Perizyten, Neuronen, perivaskulären Mikroglia und Basallamina. Das perivaskuläre Netzwerk der Astrozyten stellt die Verbindung zwischen den Neuronen und der BHS her. Die Basallamina besteht hauptsächlich aus extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronectin und Heparansulfat. Endothelzellen und Perizyten sind in die Basallamina eingebettet, eine Struktur, die mechanischen Halt bietet und als Barriere fungiert. Perivaskuläre Mikrogliazellen stehen in Kontakt mit der Mikrovasculatur des Gehirns und modulieren die Funktion der BHS. Im Blut befindliche Immunzellen wie Lymphozyten (T- und B-Zellen), Monozyten und Neutrophile können diese Barriere nicht durchdringen. Die geringe parazelluläre Permeabilität der BHS wird durch die engen und adhärenz Verbindungsstellen (Tight Junctions) gewährleistet, die benachbarte Hirnendothelzellen miteinander verbinden. Tight Junction-Proteine (TJP) bilden eine komplexe Matrix von Proteinen, die mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden sind. Claudine und Occludin verbinden zwei benachbarte Endothelzellen miteinander. Diese Proteine sind über akzessorische Proteine wie Zona Occludens (ZO)-1, ZO-2, AF6, 7H6, Cingulin und andere mit dem Zytoskelett verbunden. Als Teil der TJPs vermittelt die Familie der junctionalen Adhäsionsmoleküle (JAM) die Bindung von Zellmembranen über homophile Interaktionen. Vasculäres endotheliales Cadherin (VE-Cadherin), Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül-1 (PECAM-1) und Catenine sind die wichtigsten Komponenten der adhärenz Verbindungen, die für die strukturelle Integrität und Bindung zwischen Endothelzellen sorgen und die Bildung von Tight Junctions erleichtern. (aus Yang et al., 2019)

1.6.1 Zellen und Bestandteile der BHS

1.6.1.1 Endothelzellen

Endothelzellen (ECs) sind mesodermal abgeleitete modifizierte einfache Plattenepithelzellen, welche die Wände der Blutgefäße bilden. Große Arterien und Venen können im Durchmesser aus Dutzenden von ECs bestehen. Die kleinsten Kapillaren hingegen werden nur durch einzelne Endothelzellen gebildet. Die Zellen falten sich dabei so auf, dass sie das Lumen des Gefäßes bilden (Aird, 2007 a, b). Eine weitere Besonderheit der mikrovaskulären Endothelzellen des ZNS besteht darin, dass sie extrem dünn sind (39 % weniger dick als muskuläre Endothelzellen) und das Lumen von der parenchymatösen Oberfläche nur durch einen Abstand von ca. 0,25 µm getrennt ist (Coomer und Stewart, 1985). Außerdem haben die Endothelzellen des ZNS im Vergleich zu den Endothelzellen anderer Gewebe besondere Eigenschaften. Diese Eigenschaften ermöglichen eine genaue Regulation der Passage von Ionen, Molekülen und Zellen zwischen Blut und Gehirngewebe. Die Gehirnendothelzellen werden dabei durch sogenannte „tight junctions“ und „adherens junctions“ miteinander verbunden. Die „tight junctions“ sind Proteinkomplexe, welche zur Abdichtung des Extrazellularraumes dienen und den selektiven Transport von Wasser und anderen Molekülen mittels parazellulärer Diffusion durch die Barriere ermöglichen. Zu den Transmembranproteinen der Tight Junctions gehören Occludin, Claudin-3, Claudin-5, Claudin-12, Tricellulin, marvelD3 sowie JAM-A, JAM-B und JAM-C (Tietz et al. 2015). Die „Adherens Junction“ ist eine Zell-Zell-Adhäsion, die durch enge Aneinanderlagerung der Plasmamembranen benachbarter Zellen entsteht, wobei der Zell-Zell-raum mit stäbchenförmigen Molekülen gefüllt ist. Zu den Transmembranproteinen der „Adherens Junctions“ gehören E-Cadherin, VE-Cadherin und N-Cadherin (Meng und Takeichi, 2009; Hartsock und Nelson, 2008). Zu den zytoplasmatischen Komponenten der „tight und adherens junctions“ gehören Zonula occludens (ZO)-1, ZO-2, ZO-3, Cingulin, Afadin(AF-6) und 7H6 Proteine. Die zytoplasmatischen Proteine stellen Verbindungen mit dem Aktinskelett der Endothelzellen her. Darüber hinaus stellen die „adherens junction“ Proteine häufig auch über Proteine mit Armadillo Repeats Kontakt zum Zytoskelett her. Dabei wird die Funktion der zytoplasmatischen und Transmembranproteine, die für die Zell-Zell-Verbindungen verantwortlich sind, durch verschiedene Signalmoleküle, wie G-Proteine, Proteinkinasen, Phosphatasen und microRNAs beeinflusst (Hawkins und Davis 2005). Um die Integrität der BHS aufrechtzuerhalten, kommunizieren die Endothelzellen mit den Endfüßen von Astrozyten aber auch mit Perizyten, perivaskulären Mikroglia, perivaskulären Oligodendrozyten und den umgebenden Neuronen sowie der Basalmembran durch entsprechende Knotenpunkte, Verbindungskomplexe und Matrixrezeptoren (Maki et al., 2015; Faraco et al., 2017; Abbott et al., 2006). Die Zellen der BHS exprimieren auch zahlreiche Transporter, Ionenkanäle und

Rezeptoren sowie Enzyme, die an der Bildung einer funktionellen Barriere beteiligt sind (Sanchez-Covarrubias et al., 2014). Folglich spielen die Komponenten der BHS eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Zu- und Abflusses von Wasser, Ionen, Nährstoffen, Metaboliten und anderen Molekülen über diese histochemische Barriere hinweg. Auf diese Weise schaffen sie eine hochregulierte Mikroumgebung im ZNS, die für die koordinierte Aktivität von Neuronen und Gliazellen erforderlich ist (McConnell et al., 2017).

1.6.1.2 Murale Zellen

Zu den muralen Zellen gehören zum Einen vaskuläre glatte Muskelzellen, welche die großen Gefäße umgeben und zum Anderen die sogenannten Perizyten, welche die Endothelzellwände der Mikrogefäße unvollständig bedecken. Perizyten sitzen auf der abluminalen Seite des mikrovaskulären Endothelzellschlauches und sind dort in die Basalmembran eingebettet. (Sims, 1986). Perizyten haben lange zelluläre Fortsätze entlang der abluminalen Oberfläche des Endothels, die sich oft über mehrere Endothelzellen erstreckt. Die Zellen haben aufgrund von Proteinen, welche eine Kontraktion ermöglichen, die Möglichkeit sich zusammenzuziehen, und den Kapillardurchmesser entsprechend verändern zu können (Peppiatt et al., 2006; Hall et al., 2014). Die Perizyten ummanteln das Endothelzellrohr. Dabei ist jedoch zu beachten, dass der überwiegende Teil des Zellkörpers und der Fortsätze das Endothel nicht berührt. Stattdessen sind die Perizyten in die Basalmembran eingebettet. Die Zellfortsätze der Perizyten haben stattdessen definierte Kontaktstellen mit dem Endothel. Die Kontakte werden über das Zelladhäsionsmolekül N-Cadherin vermittelt. (Gerhardt et al., 2000). Darüber hinaus wurden weitere zelluläre Adhäsionen zwischen Perizyten und Endothelzellen identifiziert. Dazu gehören Adhäsionsplaques, Gap Junctions und Tight Junctions (Courtoy und Boyles, 1983; Cuevas et al., 1984; Larson et al., 1987; Diaz-Flores et al., 2009). Die Perizyten des ZNS zeigen im Vergleich zu den Perizyten anderer Gewebe spezielle Eigenschaften. Im Gegensatz zu den Perizyten vieler peripherer Gewebe haben die Perizyten des Nervensystems ihren Ursprung nicht im Mesoderm, sondern in der Neuralleiste (Majesky, 2007). Zudem hat sich gezeigt, dass die kleinen Gefäße des ZNS eine große Menge an Perizyten im Verhältnis zu Endothelzellen aufweisen. Während in Muskelzellen das Verhältnis Endothelzellen zu Perizyten bei circa 100 zu 1 liegt, beträgt es im ZNS zwischen 3 zu 1 und 1 zu 1 (Shepro und Morel, 1993). Perizyten spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Angiogenese, der Ablagerung von extrazellulärer Matrix, Wundheilung, Regulierung der Infiltration von Immunzellen und der Regulierung des Blutflusses als Reaktion auf neuronale Aktivität. Außerdem deuten einige wissenschaftlichen Artikel darauf hin, dass sie auch multipotente Stammzellen des ZNS sein können (Armulik et al., 2011). Die Perizyten regulieren zudem die Bildung der BHS während der Entwicklung und sind dann später im Leben an der Aufrechterhaltung ihrer Funktion

beteiligt (Armulik et al., 2010; Daneman et al., 2010b). Hierbei ist jedoch nicht genau geklärt, ob es verschiedene Untergruppen mit jeweils spezialisierten Funktionen gibt oder ob die verschiedenen Aufgaben von denselben Zellen ausgeführt werden. Eventuell könnten auch einige der Funktionen von anderen Zelltypen übernommen werden.

1.6.1.3 Basalmembran

Der Gefäßschlauch ist von zwei Basalmembranen umgeben, der inneren vaskulären Basalmembran und der äußeren parenchymalen Basalmembran (Del Zoppo et al., 2006; Sorokin, 2010). Bei der vaskulären Basalmembran handelt es sich um eine extrazelluläre Matrix, die von Endothelzellen und Perizyten sezerniert wird. Die parenchymale Basalmembran hingegen wird durch Astrozyten sezerniert. Die parenchymale Basalmembran wird aus verschiedenen Bestandteilen wie Kollagenen, Laminin, Nidogen, Heparinsulfatproteoglykanen und anderen Glykoproteinen gebildet. Dabei unterscheiden sich die beiden Membranen jedoch in ihrer Zusammensetzung, durch die Verwendung unterschiedlicher Laminine (Wu et al., 2009; Sorokin, 2010). Die Basalmembranen stellen zum einen einen Ort dar an dem Signalprozesse ablaufen können. Zum anderen stellen sie auch eine weitere physische Barriere für Moleküle und Zellen dar. Die Zerstörung der Basalmembranen durch Matrixmetalloproteasen führt zu einer Störung der Barrierefunktion. Diese Störung ist mit einer Infiltration peripherer Immunzellen verbunden, wie sie bei diversen neurologischen Störungen zu finden ist.

1.6.1.4 Astrozyten

Astrozyten sind spezialisierte Gliazellen, die mit ihren polarisierten Zellfortsätzen neuronale Fortsätze oder Blutgefäße umschließen können (Abbott et al., 2006). Die Endfüße des Basalfortsatzes umhüllen den Gefäßschlauch fast vollständig. Sie enthalten dabei bestimmte Proteine, darunter Dystroglykan, Dystrophin und Aquaporin 4. Dystroglykan und Dystrophin bilden zusammen einen Komplex. Dieser Komplex verbindet das Zytoskelett der Endfüße mittels Agrin mit der Basalmembran (Noell et al., 2011; Wolburg et al., 2011). Die Verbindung koordiniert Aquaporin 4 zu orthogonalen Komplexen. Diese Komplexe regulieren den Wasserhaushalt des ZNS. Die Astrozyten stellen eine zelluläre Verbindung zwischen den neuronalen Schaltkreisen und den Blutgefäßen her. Aufgrund dieser Verbindung können Astrozyten Signale, die den Blutfluss als Reaktion auf neuronale Aktivität regulieren, weiterleiten. (Attwell et al., 2010; Gordon et al., 2011). Zu den Funktionen, die dort reguliert werden, gehört das Kontrahieren bzw. Entspannen der Muskelzellen der Arteriolen oder der Perizyten der Kapillaren. In Transplantationsstudien konnte zudem gezeigt werden, dass Astrozyten wichtig bei der Bildung und Funktion der BHS sind. Die Transplantation von Astrozyten in Blutgefäße, die nicht zum ZNS gehörten, führte zur Induktion von BHS-ähnlichen

Barriereeigenschaften (Janzer und Raff, 1987) Eine Co-kultivierung mit Endothelzellen in vitro induzierte Barriereeigenschaften in diesen Zellen (Abbott et al., 2006). Problematisch bei diesen Studien ist, dass die Astrozyten als Vorläuferzellen aus Mausgehirnen isoliert wurden und zunächst einige Reifeteilungen durchliefen. Es handelte sich also nicht um reife Astrozyten, sondern um Vorläuferzellen. Neuere Daten legen nahe, dass die Bildung der BHS zum Zeitpunkt der Astrozytenreife bereits abgeschlossen ist und die Astrozyten selbst, weniger an der Bildung der BHS als vielmehr ihrer Modulation und Regulation beteiligt sind. (Daneman et al., 2010b)

1.6.1.5 Immunzellen

Es gibt sowohl im Blut als auch im Gehirngewebe Immunzellen die nach ihrer Aktivierung mit den Blutgefäßen interagieren. Innerhalb des ZNS sind perivaskuläre Makrophagen und Mikroglia die wichtigsten Zelltypen. Die perivaskulären Makrophagen stammen von Monozyten ab und befinden sich auf der abluminalen Gefäßseite im Virchow-Robin-Raum. Der Virchow-Robin'sche Raum umschließt Arterien, Arteriolen, Venen und Venolen. (Baumgärtner 2007) Mikroglia sind im ZNS beheimatete parenchymale Immunzellen. Sie entstehen aus Vorläuferzellen des Dottersacks und wandern während der Embryogenese in das Gehirn ein. (Ginhoux et al., 2010). Die Mikroglia übernehmen verschiedene Funktionen in der neuronalen Entwicklung und sind Teil der angeborenen Immunantwort. Sie regulieren die Wundheilung und präsentieren Antigene als Teil des adaptiven Immunsystems (Streit et al., 2005; Ajami et al., 2007) im Hirnparenchym. Neben den Immunzellen des ZNS befinden sich im Blut Immunzellen wie Neutrophile, T-Zellen und Makrophagen, welche ebenfalls mit den Gefäßzellen interagieren können. Eine Aktivierung der Immunzellen ist in der Regel mit einer Erhöhung der Barrierepermeabilität verbunden.

1.6.2 Mechanismen (einschließlich molekularer und signalisierender Wege die der stressbedingten Störung der Blut-Hirn-Schranke zugrunde liegen)

Eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke führt zu einem unkontrollierten Einschwemmen verschiedener Substanzen wie z.B. Zytokinen aus dem Blutkreislauf in das Gehirnparenchym. Diese aktivieren innerhalb des Gehirnparenchyms proinflammatorische Signalwege was letztlich zu einer Schädigung der Neuronen führt. (Ritsner 2010)

1.6.3 Stressinduzierte Hochregulierung und Transport von proinflammatorischen Molekülen in das Gehirn als kritischer Faktor für die Störung der Blut-Hirn-Schranke

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine stressbedingte Beeinträchtigung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke durch den Transport von proinflammatorischen Faktoren u. a. verschiedener Interleukine und Tumornekrosefaktoren vermittelt wird, die aus der

Einleitung

Peripherie in die BHS eingeschwemmt werden. Die Literatur zeigt, dass periphere Entzündungsprozesse ein wichtiger Faktor in der Ätiopathogenese von stressinduzierten Störungen wie der klinischen Depression (MDD) sind. Menard et al. konnten in wildtypischen C57BL/6 Mäusen zeigen, dass es nach chronisch sozialem Stress zu einer erhöhten Permeabilität der BHS im Nucleus accumbens kommt und diese auf eine verminderte Expression des Tight-Junction Proteins Claudin-5 zurückzuführen ist (Menard et al., 2017). Sie konnten zudem zeigen, dass Infiltration von Interleukin 6 (IL-6) zu einem depressionsähnlichen Phänotyp führte. Ein erhöhter IL-1 β -Spiegel im Blutkreislauf führte zu einer verstärkten Signalisierung zum Gehirn, Rekrutierung von Makrophagen und folglich zu einer Aktivierung von Gehirndothelzellen und Mikroglia (Wohleb et al., 2014). Dies wiederum führte zu einer erhöhten Produktion von IL-1 β , IL-6 und TNF-alpha im Gehirn der Mäuse.

Die erhöhten Werte proinflammatorischer Zytokine gingen dabei mit entsprechenden Angst-assoziierten Verhaltensweisen einher (Wohleb et al., 2014). Die Autoren konnten zudem zeigen, dass in Tieren mit Funktionsverlust des IL-1-Rezeptors der Phänotyp in stark abgeschwächter Form auftrat. Eine weitere Studie wies erhöhte TNF-a, IL-17a und IL-23 Spiegel im Hippocampus von gestressten Mäusen nach (Cheng et al., 2018). Die Studie zeigte zudem, dass die Gabe des TNFalpha Inhibitors Etanercept zu einer Reduktion von Zytokinen und zu einer Abschwächung des Stresseffektes auf die BHS führte. Stressinduzierte Neuroinflammation und in der Folge eine Störung der BHS können durch die Aktivierung vieler Signalwege entstehen. Einer dieser Signalwege ist der NF- κ B-Signalweg. NF- κ B ist ein proinflammatorischer Transkriptionsfaktor, der die Expression von Genen aktiviert, die die Aktivitäten des Immun- und Nervensystems als Reaktion auf negative Stimuli aktiviert. Es ist bekannt, dass mehr als 150 verschiedene Stimuli, einschließlich psycho-emotionaler Stressoren, pathogener Produkte, Zytokine und reaktiver Spezies, die NF- κ B aktivieren, die Transkription von über 400 Genen steuern. So induzieren erhöhte proinflammatorische Zytokine (z. B. IL-1 β) aufgrund chronischer Stressbelastung und affektiven Störungen die Aktivierung von NF- κ B. Die Daten zeigen dabei einen Zusammenhang zwischen depressionsähnlichen Verhaltensweisen und der Hochregulierung proinflammatorischer Gene, bei gleichzeitiger Herunterregulierung antimikrobieller Gene durch erhöhte Aktivität von NF- κ B. Wichtig ist, dass die Hemmung von NF- κ B die durch Stress verursachten depressiven Verhaltensweisen unterdrückt und die IL-1 β -Spiegel senkt. NF- κ B wird vermehrt in Mikroglia, Astrozyten, Neuronen und anderen peripheren, auf das Immunsystem reagierenden Zellen exprimiert.

Pan et al. zeigten, dass Ratten, die 12 Wochen lang chronischem unvorhersehbarem mildem Stress ausgesetzt waren, depressionsähnliches Verhalten und eine signifikante Aktivierung

von NF- κ B mit entsprechendem Anstieg der IL-1 β mRNA- und Proteinspiegel im präfrontalen Kortex zeigten (Pan et al., 2014). In einer neueren Studie berichteten Johnson et al., dass akute oder chronische Stressbelastung IL-1 β hochreguliert und IL-6 und TNF- α im Hypothalamus, Hippocampus und präfrontalen Kortex von Versuchstieren erhöht (Johnson et al., 2019).

Folglich stößt die Aktivierung des NF- κ B-Wegs die Entzündungsreaktionen an und es werden in der Folge entzündungsfördernde Faktoren sezerniert. Die stressbedingte Aktivierung des NF- κ B Signalwegs stimuliert daraufhin weitere Signalwege die an der Produktion von porenbildenden Proteinen und der Aktivierung von Alarminen und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) führen (Welcome und Mastorakis, 2020). Diese zerstören zelluläre und extrazelluläre Komponenten der BHS, einschließlich Zell-Zell-Verbindungsproteinen wie Adherens- und Tight Junction-Proteinen. Die Folge ist eine erhöhte Durchlässigkeit der BHS in der betroffenen Hirnregion.

1.7 Die Blutgerinnungskaskade

Blut zirkuliert in den Gefäßen des Körpers normalerweise als Flüssigkeit und ermöglicht so den Transport und die Verteilung von Nährstoffen, Sauerstoff, Wärme und Botenstoffen. Im Falle einer Verletzung der Gefäße muss das Blut jedoch schnell gerinnen können, um so eine Blutung zu verhindern (Norris, 2003). Bei einer Beschädigung des Endothels heften sich Blutplättchen an das Subendothel und dies führt zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade. Die Aktivierung der Gerinnungskaskade führt in der Folge zu einer Produktion von Fibrin, welches ein Netz über dem Thrombozytenpropf bildet und die verletzte Stelle so abdichtet. Die Freisetzung von Chemokinen ermöglicht die Rekrutierung von Leukozyten zur verwundeten Stelle. Die Leukozyten verhindern Infektionen und unterstützen den Heilungsprozess. Die Aktivierung der Blutgerinnungskaskade muss jedoch fein justiert werden. Auf der einen Seite ist eine schnelle explosionsartige Aktivierung des hämostatischen Systems notwendig, um einen zu großen Blutverlust zu verhindern. Andererseits kann eine Überreaktion auch zu thrombotischen Problemen führen. Um das Gleichgewicht herzustellen wirkt das gesunde Epithel als antithrombotische Oberfläche. Die Aktivierung der Gerinnungskaskade wird zunächst durch Freisetzung von Gewebefaktor (Tissue Factor, TF) aus der verletzten Stelle ausgelöst. Bei entsprechendem Vorhandensein von gerinnungsfördernden Zelloberflächen wird die Produktion von Fibrin in wenigen Sekunden ermöglicht. Diese rasche Aktivierung des antikoagulativen Systems wird durch ein Kaskadensystem vermittelt. Hierbei werden verschiedene inaktive Zymogene und Kofaktoren nacheinander durch proteolytische Spaltung aktiviert. Fast sofort wird auch das fibrinolytische System stimuliert und die Ablagerung des Fibrins an der verletzten Stelle begrenzt. Dies führt außerdem zu einer Rückkopplung in einem

Einleitung

System mit verschiedenen natürlichen Antikoagulanzen, welche die weitere Aktivierung der Gerinnungskaskade blockieren.

Es wurden zwei Wege beschrieben über die die Blutgerinnung hauptsächlich vermittelt wird. Der Eine ist der intrinsische Weg (Kontaktweg), der Andere ist der extrinsische Weg (Gewebefaktor Weg) (s. Abb. 1.3).

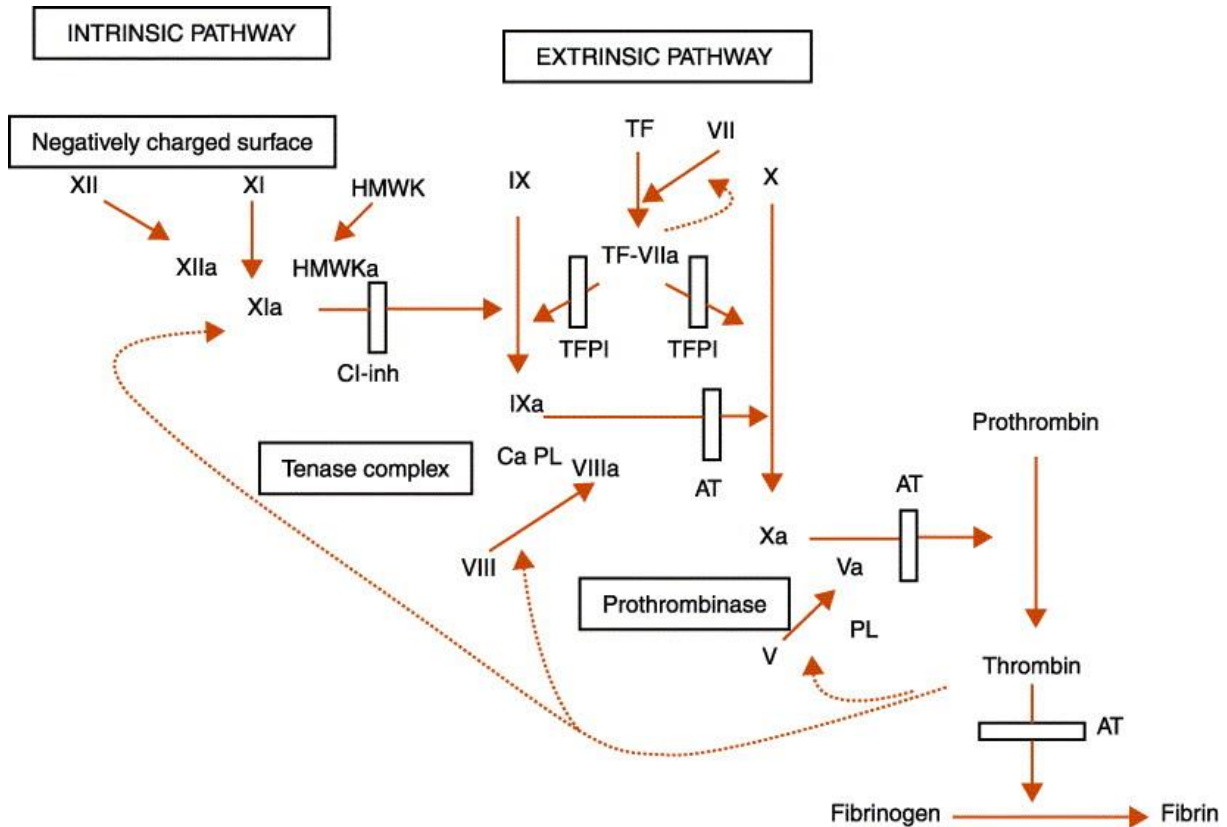


Abbildung 1.3: Extrinsisches und intrinsisches Gerinnungssystem mit Zusammenführung bei der Umwandlung von Faktor X zu Xa (Norris, 2003)

Zunächst ging man davon aus, dass beide Signalwege unabhängig voneinander aktiviert würden. Diese Hypothese wurde mit der Zeit jedoch entkräftet. Der intrinsische Signalweg wird aktiviert, wenn Blut mit einer negativ geladenen Oberfläche in Berührung kommt. Dies führt zu einer Aktivierung von Faktor XII zu Faktor XIIa. Ein Mangel an Faktor XII wurde bisher aber nicht mit einer erhöhten Blutung in Verbindung gebracht, sondern führte im Gegenteil eher zu einem erhöhten Thromboserisiko. Die Aktivierung von Faktor IX kann sowohl über den intrinsischen Signalweg, als auch den extrinsischen Signalweg erfolgen. Der intrinsische Signalweg dient in der Regel dazu, den durch Gewebefaktor initiierte Gerinnungsaktivierung zu verstärken

1.7.1 Extrinsischer Weg

Der extrinsische Weg wird aktiviert, wenn das membrangebundene Gewebefaktorprotein mit Plasma in Berührung kommt, welches Faktor VII oder VIIa enthält. Gewebefaktor ist immer ein

aktiver Kofaktor und entsprechend obligat. Gewebefaktor wird normalerweise nicht in den Zellen exprimiert die mit Plasma in Kontakt kommen. Kommt es jedoch zu einer Gefäßverletzung, können Zellen, welche den membrangebundenen Gewebefaktor exprimieren Faktor VII binden. Außerdem können Monozyten und glatte Muskelzellen durch Zytokine und andere Entzündungsmediatoren zur Produktion von Gewebefaktor angeregt werden. Die Bindung von Faktor VII an den Gewebefaktor führt zur Bildung des Komplexes TF-VIIa. Dieser wird, sofern er an die Zellmembran gebunden ist, zum stärksten Aktivator der Blutgerinnungskaskade. Faktor VII ist ein in der Leber sezerniertes, Vitamin-K-abhängiges Plasmaprotein. Dabei liegt nur 1% des Faktors VII als aktive Serinprotease vor. In freiem Zustand, also ohne Bildung des Komplexes mit TF, hat die Serinprotease jedoch nur eine geringe enzymatische Aktivität. Der TF-VIIa-Komplex hat nach seiner Bildung zwei potentielle Substrate auf der Zelloberfläche. Das ist zum Einen Faktor IX, welcher in Faktor IXa umgewandelt wird und zum Anderen Faktor X, der in Xa überführt wird. Dabei ist vor Allem Faktor X das bevorzugte Substrat.

1.7.2 Intrinsischer Weg

Der intrinsische Signalweg kann ebenfalls Faktor IX aktivieren. Die Bindung von Faktor XII (Hageman-Faktor) an eine negativ geladene Oberfläche führt zu einer lokalen Erhöhung der Konzentration und zu einer Autoaktivierung von Faktor XII zu Faktor XIIa. Nach Bindung auf einer negativ geladenen Oberfläche bewirkt XIIa die Umwandlung von Präkallikrein zu Kallikrein und Faktor XI in Xa. Zudem wird auch hochmolekulares Kininogen gespalten. Dies führt letztlich zur Bildung von Faktor IXa.

Bildung des „Tenase“ Komplexes

Wird Faktor IX über den intrinsischen oder den extrinsischen Weg zu IXa aktiviert, bildet er einen Komplex mit Faktor VIIIa, Kalzium und Phospholipiden. Der Komplex kann dann wiederum Faktor X zu Xa aktivieren. Der Komplex wird als Tenase Komplex bezeichnet und nimmt eine zentrale Rolle bei der Hämostase ein. Faktor VIII liegt im Plasma mit dem von Willebrand Faktor (vWF) als nicht kovalenter Komplex vor. Die Bindung von vWF verhindert dabei die proteolytische Aktivierung zu VIIIa. Die Bindung von vWF an Thrombozyten führt zur Aktivierung von VIII und in der Folge zur Dissoziation der beiden Faktoren. Eine Aktivierung ist außerdem durch Thrombin möglich.

1.7.3 Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin

Im nächsten Schritt wird dann Thrombin gebildet. Hierfür muss zunächst ein sogenannter Prothrombinase-Komplex gebildet werden. Der Komplex besteht aus Faktor Xa, sowie Faktor V mit dem entsprechenden Kofaktor, Kalzium und wieder einer

Einleitung

Phospholipidmembranoberfläche. Anionische Phospholipide initiieren die Umwandlung von Faktor V in seine aktive Form. Thrombin kann Faktor V, ähnlich wie der TF-VIIa-Komplex ebenfalls aktivieren. Faktor V Mutationen gehören zu den an den häufigsten vererbten Risikofaktoren für Thrombose. Bei den Meisten, wie z.B auch dem Faktor V Leiden, wird die Inaktivierung durch den Inhibitor Protein C beeinflusst. Faktor X ist ein Vitamin-K-abhängiger Gerinnungsfaktor, welcher durch den TF-VIIa- Komplex oder den Tenase-Komplex in die aktive Serinprotease Faktor Xa umgewandelt werden kann. Die direkte Aktivierung von Faktor X wird durch TF-VIIa von TFPI (Tissue factor Pathway Inhibitor) vergleichsweise schnell herunterreguliert. Daher gilt der Tenase-Komplex als wichtigster Aktivator von Faktor X. Faktor Xa kann die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin auch allein katalysieren. Diese Reaktion läuft jedoch sehr langsam ab und wird durch die Bildung des Komplexes mit Faktor Va und Bindung an aktivierte Thrombozyten und Monozyten stark beschleunigt. Die Aktivierung von Thrombin erfolgt in mehreren Schritten. Nach der ersten Spaltung entsteht zunächst Meizothrombin als Zwischenprodukt. Nach der zweiten Spaltung entsteht dann das aktive Thrombinenzym und ein Prothrombinfragment als Nebenprodukt. Aktives Thrombin kann dann Fibrinogen in Fibrin umwandeln. Zudem kann aktives Thrombin auch Blutplättchen, die Gerinnungsfaktoren V, VIII und IX sowie die Koagulaninhibitoren Protein C und TAFI (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) aktivieren. Im letzten Schritt wird in mehreren Schritten Fibrinogen durch Thrombin in Fibrin umgewandelt.

1.7.4 Regulierung der Blutgerinnung

Um eine unspezifische Aktivierung des Systems und in der Folge massive Fibrinablagerungen zu vermeiden, muss die Blutgerinnung engmaschig reguliert und kontrolliert werden. Das System darf dabei nur an der verletzten Stelle aktiv sein und nur so viel Fibrin produzieren wie benötigt wird, um die Wunde zu verschließen. Um dies zu erreichen gibt es verschiedene Regulierungsmechanismen. Zu diesen Regulierungsmechanismen gehört auch der Protein C Antikoagulationsweg. Der Protein-C-Antikoagulations-Weg ist vermutlich der wichtigste Mechanismus, um eine Thrombose in der Mikrozirkulation zu verhindern. Beim Protein C handelt es sich um ein Vitamin-K-abhängiges Plasmaprotein, welches zunächst als inaktives Zymogen im Blut zirkuliert. Zur Aktivierung muss es zunächst über seine GLA Domäne an den Transmembranrezeptor EPCR (endothelial protein c receptor) binden. Für die Aktivierung wird zudem Thrombin benötigt. Freies Thrombin bindet an Thrombomodulin, einem weiteren von Endothelzellen exprimierten Transmembranprotein. EPCR präsentiert inaktives Protein C und dieser Komplex wirkt als Inhibitor. Der Thrombin-Thrombomodulin Komplex kann Protein C aktivieren. In seiner aktiven Form kann Protein C von EPCR dissoziieren und an seinen Cofaktor Protein S binden. Dieser Komplex aus aktivem Protein C und Protein S kann wiederum durch Inhibition des Tenase- komplexes bzw. der Prothrombinase sowohl Faktor

Va, als auch Faktor VIIIa inaktivieren. Auf diese Weise verhindert Thrombin durch Aktivierung des Protein-C-Antikoagulationsweges seine eigene Produktion.

1.7.5 Der Endothel-Protein-C-Rezeptor

Ursprünglich wurde der Endothelzellen-Protein-C-Rezeptor (EPCR) als endothelzellenspezifisches Transmembran-Glykoprotein, welches Protein C binden und aktivieren kann, entdeckt (Fukudome und Esmon, 1994). Der EPCR ist ein Transmembranprotein vom Typ 1. Er besitzt eine Sequenz- und dreidimensionale Strukturhomologie mit der Familie der Proteine der Haupthistokompatibilitätsklasse 1/CD1 (Oganessian et al 2002). Es konnte gezeigt werden, dass EPCR eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Protein C durch den Thrombin-Thrombomodulin (TM) Komplex spielt (Stearns-Kurosowa et al 1996). Die primäre Rolle von EPCR bei der Zellsignalisierung besteht darin, seinen Proteaseliganden die Aktivierung von PARs, insbesondere PAR1, zu erleichtern, indem es die Protease in der Nähe der PARs verankert. Der primäre Signalligand von EPCR ist APC. EPCR spielt eine wichtige Rolle bei der Umsetzung von APC-vermittelten zytoprotektiven Effekten, welche durch Protease-aktivierten-Rezeptor (PAR) vermittelte Zell Signalisierung erfolgt.

1.7.5.1. EPCR-Expression und Lokalisierung

Zunächst wurde berichtet, dass die Expression von EPCR bis auf wenige Ausnahmen wie dem sinusoidalen Endothel der Leber und der Milz, vor allem auf das Endothel von großen Blutgefäßen beschränkt bliebe (Laszik et al., 1997). Diese Ergebnisse wurden mit der Zeit ergänzt und es konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor auch im Mikroendothel und weiteren Zelltypen wie Neutrophilen, Monozyten, Keratinozyten, glatten Muskelzellen, Kardiomyozyten und Neuronen exprimiert wird (Gleeson et al 2012). Zudem wird er auch in hematopoetischen, neuronalen und epithelialen Vorläuferzellen exprimiert (Balasz et al., 2006; Park et al., 2010). Die Rezeptoren finden sich dabei vor allem auf der Oberfläche in Mikrodomänen zusammen mit Caveolin-1 und somit Bereichen der Caveolae (Nayak et al., 2009). Der weit geringere Anteil von EPCR ist intrazellulär am Recycling beteiligt. EPCR besitzt nur einen kurzen zytoplasmatischen Schwanz (Arg-Arg-Cys-COOH). Die Induktion einer direkten Zellsignalisierung hierdurch erscheint eher unwahrscheinlich. Allerdings könnte die zytoplasmatische Domäne eine indirekte Rolle bei der Modulation der EPCR-abhängigen Signalkaskade spielen. Dies erscheint schlüssig, da die Palmitoylierung des COOH-terminalen Cys-Rests den Rezeptor wie erwähnt in den Lipid rafts und Caveolae lokalisieren kann und diese mit einer großen Anzahl an Signalmediatoren angereichert sind. Die Bindung eines Liganden an EPCR führt zu einer EPCR-vermittelten Endozytose über die Endothelzellbarriere. Auf diese Weise ist EPCR am Katabolismus und Bioverfügbarkeit seines

Liganden in der Zelle beteiligt. Der nachgeschaltete Transport erfolgt dabei über Rab-GTPasen.

1.7.5.2 Signalübertragung und zytoprotektive Effekte von EPCR

Joyce et al. konnten zeigen, dass aktiviertes Protein C neben seiner klassischen Rolle als rückgekoppelter Inhibitor der Thrombingenerierung innerhalb der Blutgerinnungskaskade auch direkt auf Signalkaskaden und Genexpression der Immunantwort und Apoptose einwirkt (Joyce et al., 2001). Darauf basierend konnte gezeigt werden, dass die Zytoprotektion in den Endothelzellen durch die Aktivierung von PAR1 mittels APC vermittelt wird (Riewald et al., 2002) (s. Abb. 1.4). Dabei wird EPCR als Ko-Rezeptor für die Spaltung von PAR1 verwendet. In entsprechenden Folgestudien konnte in mehreren Zelltypen zytoprotektive Effekte wie (1) die Änderung des Genexpressionsprofils, (2) der anti-inflammatorischen Aktivität, (3) der antiapoptotischen Aktivität und (4) des Schutzes der endothelien Barrierefunktion nachgewiesen werden (Mosnier et al., 2007).

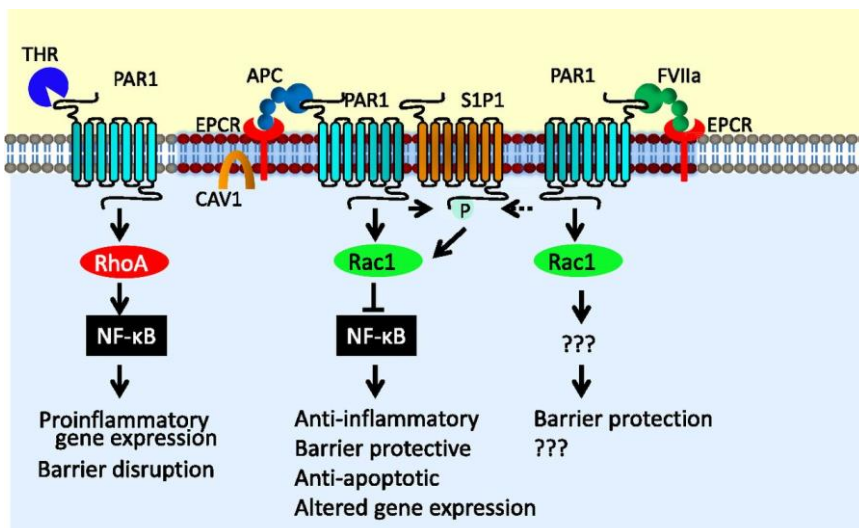


Abbildung 1.4: Die zytoprotektive Signalwirkung von EPCR-APC. EPCR-gebundenes APC spaltet PAR1, und diese PAR1-Spaltung aktiviert spezifisch den Rac1-Signalweg, hemmt die Aktivierung des Nuklearfaktor-κB-Signalwegs (NF-κB) und bietet Barrierschutz. Die Kreuzaktivierung von S1P1 durch Sphingosinkinase-1, die durch die EPCR-APC-Aktivierung von PAR1 stimuliert wird, könnte zur EPCR-APC-vermittelten Barrierschutzwirkung und zum Zellüberleben beitragen. FVIIa, das an EPCR gebunden ist, kann ebenfalls PAR1 spalten und die schützende Wirkung der Barriere bewirken. Die mechanistischen Details der FVIIa-EPCR-induzierten Barrierschutzwirkung sind jedoch unbekannt. Im Gegensatz zur EPCR-abhängigen PAR1-Signalisierung führt die Thrombin-Spaltung von PAR1 zur RhoA-Aktivierung und zur Aktivierung des nuklearen Faktors-κB, was zu einer proinflammatorischen Genexpression und einer Störung der Barriere führt. (Rao et al., 2014)

Zunächst wurde PAR1 als Thrombinrezeptor identifiziert. Im Gegensatz zur Spaltung durch APC führt die Spaltung von PAR1 durch Thrombin zu proinflammatorischen Effekten, Apoptose und zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Barriere. Es erscheint daher zunächst verblüffend, dass die Aktivierung von PAR1 durch EPCR-APC das genaue Gegenteil bewirken soll. Eine entscheidende Beobachtung war, dass EPCR und PAR1 gemeinsam in den LipidRafts bzw. Caveolae der Endothelzellen lokalisiert waren (Bae et al. 2007, Russo et al.

Einleitung

2009). Es wurde daher angenommen, dass die gemeinsame Lokalisierung von EPCR mit PAR1 in den Caveolae oder Caveolin-1-reichen Membranmikrodomänen und die APC-Aktivierung von PAR1 in diesen spezifischen Mikrodomänen für die EPCR-APC-vermittelte Zytoprotektion verantwortlich sind. Dabei sollte die EPCR-APC vermittelte Signalisierung über die Transaktivierung von Sphingosin-1-Phosphat (S1P1) Rezeptor und Tie2 geschehen. Dazu passte, dass die PAR1 Aktivierung durch Thrombin nicht zu einer Aktivierung von S1P1 führte. Jedoch konnte dies noch nicht die vollständige Erklärung für diese komplexe Interaktionsweise mit PAR1 sein. Daher wurde postuliert, dass die Bindung von APC über dessen Gla Domäne zu EPCR die Reaktion des PAR1 Rezeptors bestimmt. Rezaie et al. konnten zeigen, dass eine Bindung von EPCR durch APC zu einer zytoprotektiven Antwort über eine Thrombinvermittelte Spaltung von PAR1 führte (Rezaie 2011; Bae et al. 2007). Normalerweise ist EPCR, wie oben beschrieben in den lipid rafts zu finden und interagiert dort mit Caveolin-1. Die Bindung von APC führt in der Folge zu einer Dissoziation von EPCR und Caveolin-1. Das wiederum beeinflusst die PAR1 abhängige Signaltransduktion von Thrombin und APC. Dies führt in der Folge zu einem Wechsel von einer die Permeabilität erhöhenden zu einer die Barriere stabilisierenden Zellantwort. Die Bindung von EPCR könnte zum Beispiel dazu führen, dass PAR1 an $G_{i/o}$ bindet, anstatt G_q oder $G_{12/13}$ (Rezaie 2011; Bae et al., 2007). Eine andere Möglichkeit der zytoprotektiven Signalkaskade wäre die Bindung von β -Arrestin und Aktivierung von dishevelled-2 (Dvl-2) in den kaveolaren Mikrodomänen und nicht über die G Protein-abhängigen Transduktionsmechanismen wie bei der Aktivierung von PAR1 durch Thrombin. Es könnte sein, dass die Bindung von APC zu einer APC abhängigen Bindung von PAR1 an β -Arrestin führt. Soh und Trejo konnten hier zeigen, dass die APC-Aktivierung von PAR1 über β Arrestin 2 und nicht über die G-Proteine, wie bei Thrombin initiiert (Soh und Trejo, 2011), vermittelt wird. Alternativ wäre hier auch eine Thrombin vermittelte Antwort über PAR1 und β Arrestin/Dishevelled-2 möglich. Die Aktivierung von PAR1 durch APC-EPCR leitet die Signalübertragung von β -Arrestin ein und führt letztlich zur Aktivierung des Phosphatidyl-3-Kinase/Akt/mTOR Signalweges, zur Transaktivierung des Gi-Protein-gekoppelten Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptors (S1P1) und zur Aktivierung der Rac1 GTPase. Zusammengefasst begünstigen alle diese Signalprozesse das Überleben der Zellen, erhöhen den Schutz vor Barrierestörungen und unterdrücken den pro-inflammatorischen NF- κ B-Signalweg (Griffin et al. 2015, Rezaie et al. 2014). Neben der klassischen Signalisierung von APC-EPCR ist dieser zudem in der Lage die Bildung neutrophiler Fallen durch intrazelluläre zytoprotektive Signale zu hemmen (Healy et al., 2017). Dieser Mechanismus wird jedoch nicht über PAR1, sondern über PAR3 und Mac1 vermittelt.

Weitere Studien untersuchten die Bindestellen von PAR1 über die eine Signaltransduktion vermittelt wird. Mosnier zeigten, dass eine Spaltung von PAR1 durch APC sowohl über eine neuartige nicht-kanonische Bindestelle an Arg46 als auch die kanonische Bindestelle an Arg41

vermittelt wird. Thrombin hingegen nutzt die klassische Bindestelle Arg41 zur Spaltung von PAR1. Es ist denkbar, dass die Änderung in der räumlichen Konformation von PAR1, die durch die APC-Spaltung an der alternativen Bindestelle hervorgerufen wird, die β -Arrestin 2/Dvl-2-abhängige Signalgebung spezifisch initiiert. Die Rekrutierung von β -Arrestin statt der Interaktion mit den G Proteinen würde in der Folge zu spezifischen Änderungen in der Signalkaskade mit entsprechenden funktionellen Konsequenzen führen. Die Kopplung von EPCR und seinem Liganden Protein C und verschiedenen Proteinen innerhalb der Caveolae könnten die allosterische Modulation von PAR1 ebenfalls beeinflussen (Bae et al., 2007; Russo et al., 2009). Wie bereits erwähnt konnte gezeigt werden, dass EPCR mit Caveolin-1 in den Lipid rafts der Endothelzellen miteinander interagiert und dass die Bindung von Protein C an EPCR zur Dissoziation von EPCR und Caveolin führt. Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung zytoprotektiver Signalwege. Dabei ist es unwichtig ob PAR1 durch Thrombin oder APC gespalten wurde (Bae et al., 2007, Blood; Rezaie 2014). Roy et al konnten zeigen, dass die Bindung von EPCR durch Protein C eine β -Arrestin-2-vermittelte PAR1-Signalisierung in Gang setzt (Roy et al., 2016) (s. Abb. 1.5)

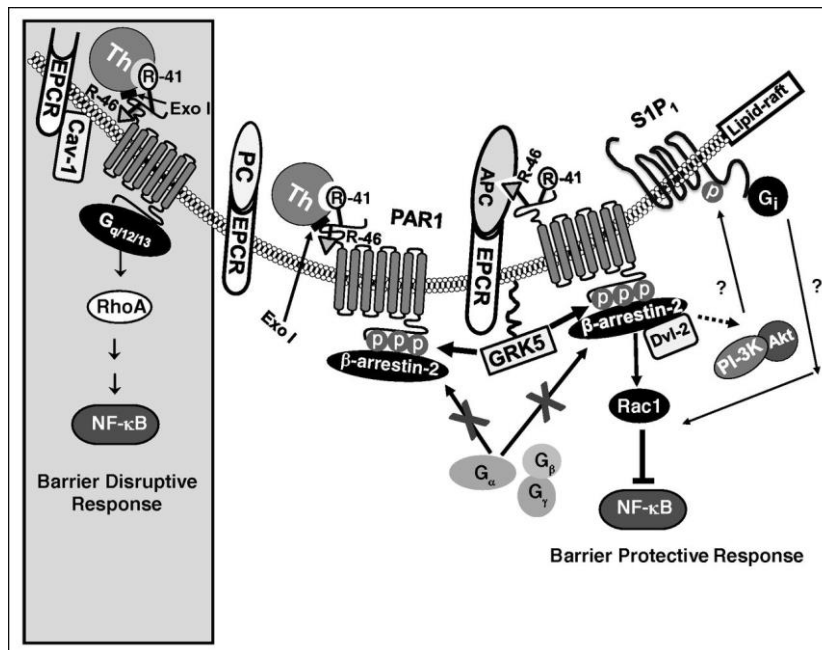


Abbildung 1.5: Hypothetisches Modell der EPCR-abhängigen PAR1-Signalisierung durch APC und Thrombin in Endothelzellen. Wenn EPCR nicht durch Protein C/APC ligiert wird, ist EPCR mit Caveolin-1 in Lipid Rafts von Endothelzellen assoziiert. In diesem Fall koppelt die Thrombin-Spaltung von PAR1 nach der Arg-41-Erkennungsstelle den Rezeptor an Gq und/oder G12/13, wodurch die zelluläre Permeabilität durch die Aktivierung der RhoA GTPase und der NF- κ B-Signalwege erhöht wird. Wenn EPCR durch Protein C/APC besetzt ist, dissoziiert der Rezeptor von Caveolin-1, ein Prozess, der in gewisser Weise mit der Rekrutierung von GRK5 an der Plasmamembran verbunden ist. In diesem Fall führt die Spaltung von PAR1 entweder durch Thrombin nach Arg-41 oder APC nach Arg-46 zu einer GRK-abhängigen Phosphorylierung der N-terminalen zytoplasmatischen Domäne des gespaltenen PAR1 und zur Hemmung seiner Interaktion mit einer der G_{α} -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine. Die EPCR-abhängige Spaltung der Arg-41- oder Arg-46-Stellen rekrutiert β -Arrestin-2 und Dvl-2, wodurch das PAR1-Signal über einen so genannten " β -Arrestin-2-gesteuerten" Signalmechanismus übertragen wird. Die PAR1-abhängige β -Arrestin-2/Dvl-2-Signalisierung aktiviert die Rac1-GTPase, hemmt NF- κ B und erhöht die Barriere-Integrität von Endothelzellen. Die EPCR- und PAR1-abhängigen zytoprotektiven Reaktionen sowohl von APC als auch von Thrombin erfordern ein Cross-Talking mit der Gi-Protein-gekoppelten S1P1-Signalgebung. Ob diese letztere GPCR-Signalisierung direkt über Sphingosin-1-Phosphat selbst oder indirekt über die Phosphorylierung/Aktivierung der

Einleitung

zytoplasmatischen Domäne von S1P1 durch eine aktivierte Kinase (d. h. Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase B [PI-3K/Akt]) vermittelt wird, ist nicht bekannt und bedarf weiterer Untersuchungen. Weitere Einzelheiten sind dem Text zu entnehmen. Cav-1, Caveolin-1; Exo I, Exosit I; PC, Protein C; S1P, Sphingosin-1-Phosphat. (aus Roy et al., 2016)

Hierbei ist es egal ob PAR1 an der klassischen oder der alternativen Bindestelle gespalten wird. Die Autoren zeigten, dass die Bindung von aktivem Protein C oder eines katalytisch inaktiven Zymogen zu einer Rekrutierung von GRK5 (G-Protein-gekoppelte Kinase 5) an die Plasmamembran führte. Wurde GRK5 an die Plasmamembran rekrutiert, führte die Spaltung von PAR1 durch Thrombin an der Arg41 Stelle oder durch APC an der Arg46 Stelle zu einer GRK-abhängigen Phosphorylierung der N-terminalen zytoplasmatischen Domäne von PAR1 durch GRK5 und hemmte die Interaktion zwischen der zytoplasmatischen Domäne und den G-Proteinen. Die Bindung von EPCR durch seinen Liganden Protein C führt zudem zu einer Rekrutierung von β -Arrestin-2 und Disheveled 2 Gerüstproteinen an die zytoplasmatische Domäne von PAR1 und überträgt das PAR1 Signal über den β -Arrestin-abhängigen Signalweg. Die PAR1 vermittelte Signalübertragung über β -Arrestin-2 führt zu einer Aktivierung der Rac1-GTPase und in der Folge zu einer Hemmung des NF- κ B-Signalwegs was letztlich dem Schutz der Barriere der Endothelzellen dient. Bei dieser Signalisierung ist auch eine Signalisierung über S1P1 (Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor 1) notwendig. Ob diese letztere GPCR-Signalkaskade direkt über Sphingosin-1-Phosphat selbst oder indirekt über die Phosphorylierung/Aktivierung der zytoplasmatischen Domäne von S1P1 durch eine aktivierte Kinase (d. h. Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase B PI-3K/Akt) vermittelt wird, ist nicht bekannt.

Da EPCR noch weitere Proteaseliganden binden kann beschränkt sich seine Rolle nicht nur auf die Aktivierung der Protein C induzierten Signalkaskade, sondern schließt auch die von Faktor VIIa induzierten Prozesse mit ein (Lopez-Sagasetta et al., 2007; Ghosh et al., 2007). EPCR wird dabei von Faktor VIIa mit der gleichen Affinität wie Protein C gebunden. Ähnlich wie Protein C führt die Bindung von Faktor VIIa an EPCR ebenfalls zu einer zytoprotektiven Signalgebung über PAR1 in primären Endothelzellen (Sen et al., 2011). Neben den bisher genannten Alternativen der Zellsignalisierung über EPCR gibt es noch die Möglichkeit die Signalisierung des ternären Tissue Factor (TF)-FVIIa-Faktor Xa (FXa)-Komplexes zu modulieren. EPCR begünstigt hier die Spaltung von PAR1 und PAR2 durch TF-FVIIa-FXa (Disse et al., 2011). Dabei scheint EPCR ein wichtiger Korezeptor für die durch den TF-Koagulationskomplex vermittelte Zellsignalisierung zu sein. Hierbei scheint EPCR verschiedene Signalwege wie den p44/42 MAPK (mitogenaktivierter Proteinkinase) Signalweg und den NF- κ B-Signalweg unterschiedlich zu beeinflussen (Yuan et al., 2017). Während die durch TF-FVIIa-FXa initiierte Aktivierung der p44/42 MAPK auf aktivierte Endothelzellen von EPCR abhängig war, wurde die TF-FVIIa-FXa-Inhibition der p65 NF- κ B-Signalisierung nicht von EPCR vermittelt.

1.7.5.3. Verwendete Endothelzellen-Protein-C-Rezeptor-Mausmodelle

Zur Untersuchung des Einflusses der EPCR Signalisierung auf das Verhalten nach chronisch sozialem Stress wurden verschiedene Mausmodelle verwendet. Zum Einen wurde ein Mausstamm (EPCR^{fl/fl}-Tie2-Cre) verwendet bei dem das Gen *Procr*, welches für EPCR kodiert in allen hämatopoetischen und endothelialen Zellen deletiert war. Die EPCR^{fl/fl}-Mäuse wurden aus dem EUCOMM Procr^{tm1a}(EUCOMM)Wtsi Embryonalstammzellen EPD0480_1_A01 durch Blastozysteninjektion und Keimbahnverpaarung mit Albino-C57BL/6-Mäusen generiert (Bochenek et al., 2022). Nach der Umwandlung in das konditionale Procr^{tm1c}-Allel durch Kreuzung mit einer Flippase-exprimierenden Linie wurden die EPCR^{fl/fl} Mäuse mit Tie2.Cre (The Jackson Laboratory; B6.Cg-Tg[Tek-cre]12Flv/J; Nr. 004128) verpaart (Bochenek et al., 2022; Koni et al., 2001). Da Cre im parental Stamm heterozygot vorliegt, erhält man sowohl Tiere bei denen die Cre-Rekombinase vorhanden und *Procr* gewebespezifisch deletiert wird als auch Tiere bei denen *Procr* aufgrund des Fehlens der Cre-Rekombinase exprimiert wird. Bei Ersteren wurde eine erhöhte BHS-Permeabilität angenommen. Zweitere wurden als wildtypische Kontrollen verwendet.

Als zweites Modell wurde ein Mausstamm mit veränderter Lokalisation von EPCR verwendet. Bei diesen Mäusen ist das erste Cystein des carboxyterminalen Rests zu Serin mutiert (Procr^{C/S} oder EPCR C/S). Der Stamm wurde, unter Verwendung eines modifizierten Konstruktes für das Procr^{tm2Cte}, durch Knock-In Mutagenese des aus dem 129er Stammes isolierten Exons 4 erzeugt (Müller-Calleja et al., 2021; Gu et al., 2002). Der Stamm ohne C>S Transition (Procr^{WT}, EPCR^{flox129}) wurde nach Rückkreuzung mit C57BL/6J als Kontrollen für die EPCR^{C/S} Mäuse verwendet. Die Mutation in der Palmitoylierungsstelle von EPCR verursacht eine veränderte subzelluläre Lokalisation und in der Folge einen Funktionsverlust in der Signaltransduktion.

1.7.6 Nematoden Antikoagulant Protein c2 (NAPc2)

Das Nematoden Antikoagulant Protein c2 (NAPc2), ein ein 8,7 kD großes Polypeptid, das ursprünglich aus dem Hakenwurm des Hundes (*Ancylostomacanium*) isoliert wurde (Cappello et al., 1995). Die räumliche Struktur des Proteins weist dabei eine verkürzte Helix, zwei β -Faltblätter sowie extrem flexible Bereiche in der Substratbindestelle und an den C- und N-terminalen Enden auf (Duggan et al., 1999). NAPc2 vermittelt seine Antikoagulantaktivität durch die Inhibition von FXa oder des FVIIa/TF Komplexes (Lee et al., 2003). Es inaktiviert den katalytischen Komplex von FVIIa/TF mittels eines einzigartigen Mechanismus, welcher die initiale Bindung von NAPc2 an FX oder FXa vor der Bildung des finalen quartären hemmenden Komplexes mit FVIIa/TF (FVIIa/TF-Xa-NAPc2) (Lee et al., 2003) vorsieht. Im Gegensatz zum

Einleitung

Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) benötigt NAPc2 dabei keine freie Bindestelle im aktiven Zentrum von FX bzw. FXa, sondern bindet über eine weitere Exo-Bindestelle an das Zymogen (Bergum et al., 2001). Das hat zur Folge, dass das katalytische Zentrum der Protease frei ist und sie innerhalb des Komplexes weiterhin enzymatisch aktiv bleibt. Peptidylsubstrate können also, im Gegensatz zu Prothrombin, weiterhin von FXa, welches über NAPc2 an FVIIa/TF gebunden ist, gespalten werden. Diese Form von FXa (gebunden an FVIIa/TF-NAPc2) ist somit auch in der Lage verschiedene Mitglieder der Protease-aktivierten Rezeptorfamilie (PAR), wie z.B. PAR1 zu spalten.

Die Bindung des FX(a)-NAPc2 Komplexes mit FVIIa/TF hängt dabei spezifisch von den makromolekularen Interaktionen zwischen dem FX Derivat und FVIIa/TF ab. Diese Interaktionen werden über eine γ -Carboxyglutaminsäure-domäne von FX und den anionischen Phosphatidylserinköpfen der Zellmembran vermittelt (Bergum et al., 2011). Die Bindedomäne von NAPc2 bindet nach Präsentation des FVIIa/TF in das aktive Zentrum des FVIIa/TF-Komplexes und erlaubt so die Bildung eines fest gebundenen quartären hemmenden Komplexes (s. Abb. 1.6).

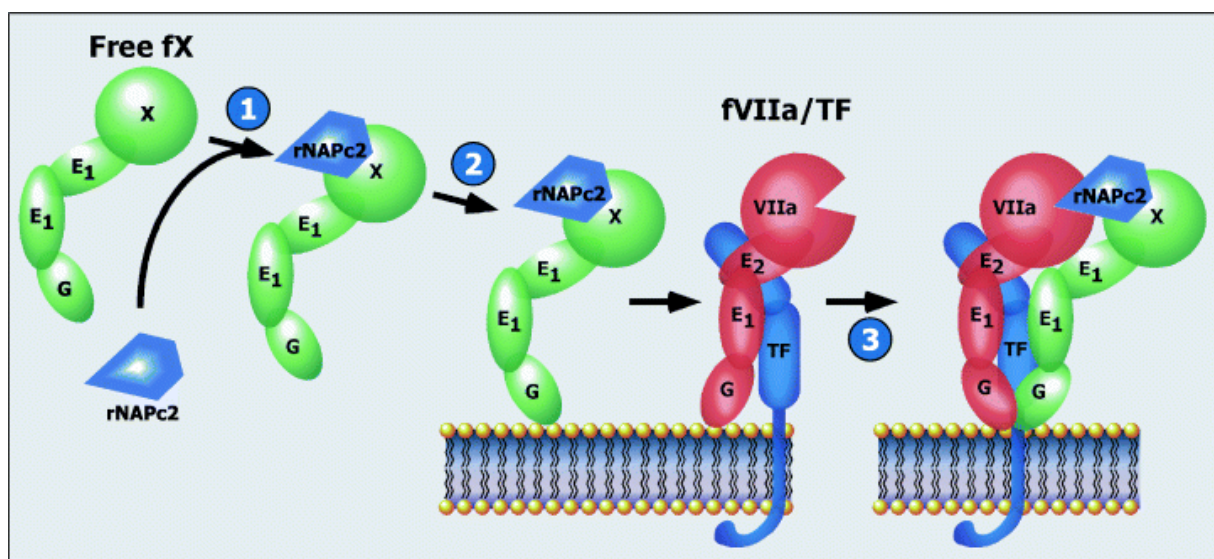


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung eines vorgeschlagenen Mechanismus für die substratvermittelte Freisetzung des rekombinanten Fadenwurm-Antikoagulans-Protein c2 (rNAPc2) an aktivierten Faktor VII/Gewebefaktor (FVIIa/TF) und den Aufbau des quartären Hemmkomplexes. In Schritt 1 des Schemas bindet rNAPc2 mit hoher Affinität an das Zymogen FX in Lösung (die Bindung an FXa als inhibitorisches Gerüst ist nicht dargestellt). In diesem Beispiel wird der Komplex in Lösung (z. B. im Plasma) gebunden, bevor er an die Membran gebunden wird, da dies nachweislich der Hauptmechanismus der Komplexbildung in vivo ist. Der resultierende stabile bimolekulare Komplex zwischen NAPc2/FX dient als hemmendes Gerüst, das das Andocken an den membrangebundenen FVIIa/TF-Komplex erleichtert. Dieses Andocken ist in hohem Maße von spezifischen anionischen Phosphatidylserinkopfgruppen der Membran abhängig und wird durch die Gla-Domäne des hemmenden Gerüsts vermittelt. Die Gla-Domäne des NAPc2/FX-Komplexes dockt dann an eine Bindungsschnittstelle an, die vermutlich durch die Gla-Domäne von FVIIa und TF gebildet wird. Auf diese Weise nutzt die hemmende Struktur sowohl einen ähnlichen Andockmechanismus wie das natürliche Substrat (FX) als auch die anschließende Präsentation an der aktiven Stelle von FVIIa/TF (Schritt 2). Im letzten Schritt des mechanistischen Schemas dockt die kanonische reaktive Schleife von NAPc2 an das aktive Zentrum von FVIIa/TF an und ermöglicht die Bildung eines fest gebundenen quartären Hemmkomplexes (aus Lee et al. 2003)

1.8 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war das Studium der longitudinalen Phänotypentwicklung hinsichtlich Sozialverhalten und Gedächtniskonsolidierung nach chronisch sozialem Stress im Mausmodell und die anschließende Analyse der Aktivität der mTOR-Signalkaskade im suszeptiblen wie im resilienten Tier. Desweiteren sollte untersucht werden inwieweit eine Dysregulation mittels pharmakologischer Intervention oder aufgrund genetischer Disposition im Mausstamm das Verhalten nach chronisch sozialem Stress beeinflusst. Für die Experimente wurden hierfür der mTOR Inhibitor Rapamycin und das konstitutive Tsc2^{+/-} - Mausmodell des Stamms B6;129S4-Tsc2^{tmDjk}/J verwendet. Im letzten Abschnitt sollte dann noch die Rolle des Protein-C Antikoagulanzenweges im Kontext der BHS-Permeabilität und der Stressanfälligkeit untersucht werden. Hierfür wurde zum einen ein Mausmodell mit komplettem Funktionsverlust des endothelialen Protein C Rezeptors in allen endothelialen und hämatopoetischen Zellen verwendet. Zum anderen wurde ein Mausmodell verwendet bei dem aufgrund einer Mutation in der Palmitoylierungsstelle die Lokalisation von des EPCR in der Zellmembran verhindert wird. Die Mausstämme sollten in verschiedenen Verhaltensdomänen getestet werden und ein Zusammenhang zwischen BHS-Permeabilität und Stressresilienz bzw. Stressanfälligkeit hergestellt werden. Auch hier sollte durch pharmakologische Intervention mithilfe des Thrombin Inhibitors NAPc2 der Einfluss der Blutgerinnungskaskade auf die Stressresilienz weiter untersucht werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2.1.1: Chemikalien

Agarose	Carl Roth
Albumin Fraktion V, proteasefrei	Carl Roth
Ampuwa Sterilwasser	Fresenius-Kabi
Bromphenolblau	Carl Roth
Calciumchlorid	Carl Roth
β -Mercaptoethanol	Carl Roth
cOmplete Tablets EASYpack (Protease Inhibitor Cocktail Tablets)	Roche
DPBS	Gibco® Life Technologies
EDTA	AppliChem GmbH
Essigsäure 100 %	AppliChem GmbH
Ethanol absolut	Honeywell
Ethanol denaturated	AppliChem GmbH
Ethidiumbromid	Carl Roth
Glycerin	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Harnstoff	Carl Roth
Isopropanol/2-Propanol	Carl Roth
Magnesiumchlorid	Carl Roth
Milchpulver	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
Natronlauge	Merk
PBS Tabletten	Gibco (life technologies™)
PhosSTOP EASYpack (Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets)	Roche
Rapamycin	LC Laboratories (Biozol)
RNase AWAY	Molecular Bioproducts
RotiphoreseR Gel 30 (Acrylamidstammlösung)	Carl Roth
Salzsäure 32 %	Carl Roth
SDS	Carl Roth
Sucrose	Sigma
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura
TRIS	Carl Roth
Trizol	Ambion (life technologies)
Tween-20	Carl Roth
TEMED	Invitrogen
Wasserstoffperoxid 30 %	Merk
Western Lightning Plus-ECL-Detektionsreagenz	PerkinElmer

2.1.2 Zellkultur

Tabelle 2.1.2: Zellkultur

DMEM	Sigma Aldrich
DMSO	Sigma-Aldrich
DPBS	Gibco® Life Technologies
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco® Life Technologies
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Gibco® Life Technologies

2.1.3 Enzyme

2.1.3.1 weitere Enzyme

Tabelle 2.1.3: weitere Enzyme

FastStart Taq DNA Polymerase	Roche Diagnostics GmbH
Proteinase K	AppliChem GmbH

2.1.4 Zelllinien und Mausstämme

Für diese Arbeit wurden die nachstehenden Zelllinien und Mausstämme verwendet.

Tabelle 2.1.4.1: Zelllinien

Name	Herkunft
HEK293-T	AG Schweiger

Tabelle 2.1.4.2: Mausstämme

Name	Herkunft
Hsd:ICR (CD1)	Envigo
C57BL/6JRj	Janvier
EPCRflfl-TieCre	AG Ruf
R16neu EPCR/S	AG Ruf
R17neu EPCRflfl WT	AG Ruf
Tsc2	AG Schweiger

2.1.5 Längenstandards

Tabelle 2.1.5: Bakterienkultivierung

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Thermo Scientific
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific

2.1.6 Kits

Tabelle 2.1.6: Kits

High Pure RNA Isolation Kit	Roche
Qubit™ Protein Assay Kit	Thermo Fisher
QIAshredder	Qiagen
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher
SYBR® Premix Ex Taq™	Takara/Clontech

2.1.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. In den nachfolgenden Tabellen sind die verwendeten Primer aufgeführt.

2.1.7.1 Primer für qRT-PCR

Tabelle 2.1.7.1.1: Primer Referenzgen

Name	Sequenz 5'→ 3'
GAPDH-qPCR_f	TCCATGACAACCTTTGGCATT
GAPDH-qPCR_r	GTTGCTGTTGAAGTCGCAGG

Tabelle 2.1.7.1.2: Primer Kandidatengene

Name	Sequenz 5'→ 3'
Arc_qPCR_f	AGCAGCAGACCTGACATCCT
Arc_qPCR_r	GGCTTGCTTTCACCTTCAGC
Zif268-qPCR_f_1	ATGAGAAGGCGATGGTGGAG
Zif268-qPCR_r_1	CTCACGAGGCCACTGACTAG
Zif268-qPCR_f_intronspanning	ccctatgagcacctgaccac
Zif268-qPCR_r_intronspanning	tcgttggctgggataactc
c-Fos-qPCR_f_1	GGGCTGCACTACTTACACGT
c-Fos-qPCR_r_1	TGCCTTGCCCTTCTGACTG
c-Fos-qPCR_f_2	gggacagcctttcctactacc
c-Fos-qPCR_r_2	agatctgcgcaaaagtctctg

2.1.7.2 Primer für die Tsc2 Genotypisierung

Tabelle 2.1.7.2.1: Primer Tsc2 Genotypisierung

Name	Sequenz 5'→ 3'
H-164 (forward)	AGACTGCCTTGGGAAAAGCG
H-163 (reverse)	AATGCGGCCTCAACAATCG
H-162 (reverse)	CAAACCCACCTCCTCAAGCTTC

2.1.8 Antikörper

Tabelle 2.1.8.1: Primäre Antikörper

Primäre Antikörper						
Name	MW (kD)	Spezies	Klonalität	Verdünnung	Hersteller	
Akt	60 kD	Rabbit	poly	1:1000	Cell Signaling	
p-Akt	60 kD	Rabbit	poly	1:1000	Cell Signaling	
Gapdh	37 kD (~40kD)	Mouse	poly	1:3 und 1:6000	Abcam	
GluA1	100 kD	rabbit	poly	1:500	Cell Signalling	
GluA2	100 kD	rabbit	poly	1:500	Cell Signalling	
mTOR	289 kD	rabbit	poly	1:1000	Cell Signalling	
p-mTOR	289 kD	rabbit	poly	1:1000	Cell Signalling	
p70	70,85kD	Rabbit	poly	1:1000	Cell Signaling	
p-p70	70,85kD	Rabbit	poly	1:1000	Cell Signaling	
PSD 95	95 kD	mouse	poly	1:1000	Invitrogen	
S6	32 kD	Mouse	mono	1:1000	Cell Signaling	
p-S6	32 kD	rabbit	poly	1:2000	Cell Signalling	

Tabelle 2.1.8.2: Sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper						
Name	Ziel	Wirt	Klonalität	Verdünnung	Hersteller	
Peroxidase AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG, F(ab') ₂ fragment specific	Maus	Ziege	poly	1:6000	Jackson ImmunoResearch Laboratories	
Peroxidase AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG, F(ab') ₂ fragment specific	Kaninchen	Ziege	poly	1:6000	Jackson ImmunoResearch Laboratories	

2.1.9 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Kleinere Laborgeräte, wie Thermoblöcke, Waagen, Vortexer, Schüttler etc. wurden von Eppendorf und Starlab bezogen. Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße etc. wurden von Sarstedt, Eppendorf, Greiner Bio-One und Starlab bezogen.

2.1.9.1. PCR-Geräte

Tabelle 2.1.9.1: PCR-Geräte

Mastercycler Gradient	Eppendorf
peqSTAR Thermocycler	Peqlab
Primus 96 advanced® Thermocycler	Peqlab
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems

2.1.9.2 Gelkammern für Gelelektrophorese

Tabelle 2.1.9.2: Gelkammern für Gelelektrophorese

PerfectBlue™ Gelsystem Mini S	peqlab
PerfectBlue™ Gelsystem Mini M	peqlab
PerfectBlue™ Gel System Mini L	peqlab

2.1.9.3 Agarosegel-Dokumentationssystem

Tabelle 2.1.9.3: Gel-Dokumentationssystem

Gel Jet Imager	Intas
----------------	-------

2.1.9.4 Pipetten

Tabelle 2.1.9.4: Pipetten

Research® plus 100-1000 µl	Eppendorf
Research® plus 20-200 µl	Eppendorf
Research® plus 2-20 µl	Eppendorf
Research® plus 0.5–10 µL	Eppendorf

2.1.9.5 Zentrifugen

Tabelle 2.1.9.5: Zentrifugen

PerfectSpin 24R Refridgerated microcentrifuge	peqlab
Microfuge 16 Centrifuge	Beckman Coulter

2.1.9.6 Binokulare und Mikroskope

Tabelle 2.1.9.6: Binokulare und Mikroskope

Stemi 305 Stereomikroskop	Zeiss
---------------------------	-------

2.1.9.7 Geräte für die Zellkultur

Tabelle 2.1.9.7: Geräte für die Zellkultur

HeraSafe Sterilbank	Heraeus
CO2-Inkubator Serie CB	Binder
Wasserbad VWB26	VWR

2.1.9.8 Geräte zur DNA-, RNA- und Proteinquantifizierung

Tabelle 2.1.9.8: Geräte zur DNA-, RNA- und Proteinquantifizierung

NanoDrop™ One/O Mikrovolumen-UV/VIS-Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific
Qubit® 2.0 Fluorometer	Life Technologies

2.1.9.9 Geräte für SDS-PAGE und Western Blot

Tabelle 2.1.9.9: Geräte für SDS-PAGE und Western Blot

Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad

2.1.9.10 Geräte für histologische Arbeiten

Tabelle 2.1.9.10: Geräte für histologische Arbeiten

Kryostat Leica CM3050 S	Leica
Punch Set #39443001	Leica

2.1.10 EDV

Tabelle 2.1.10.1: Computerprogramme und Onlinetools

BORIS	Olivier Friard, Abteilung Lebenswissenschaften und Systembiologie, Universität von Turin
EthoVision XT	Noldus
Excel 2013	Microsoft
ImageJ	Wayne Rasband, Public domain
Image Lab	BioRad
Photoshop CS5	Adobe
Prism 8	Graphpad
Universal ProbeLibrary Assay Design Center	qpcr.probefinder.com
Word 2013	Microsoft

Tabelle 2.1.10.2: Datenbanken

Pubmed	NCBI
UCSC Genome Browser on Mouse Dec. 2011 (GRCm38/mm10) Assembly	genome.ucsc.edu

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5%.

2.2.1.1 Kultivierung und Passagieren der HEK Zellen

Die HEK-T293 Zellen wurden in Zellkulturschalen in DMEM mit 10% FBS kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde am inversen Mikroskop verfolgt. Zum Passagieren der Zellen wurde das Nährmedium zunächst abgenommen und die Zellen einmal mit PBS-Dulbecco gewaschen. Im Anschluss wurde Trypsin-EDTA zu den Zellen gegeben, um diese vom Gefäß zu lösen. Die Inkubation dauerte fünf Minuten und wurde daraufhin mit Kulturmedium beendet. Zum Entfernen des Mediums wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon überführt, bei 200 g zentrifugiert und der Überstand abgezogen. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden nun auf eine neue Zellkulturschale mit vorgelegtem Nährmedium ausgesät.

Tabelle 2.2.1.1: Medium zur Kultivierung neuraler Vorläuferzellen

Kulturmedium	IMDM
	10% FBS

2.2.1.2. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden ähnlich dem Passagieren (s. 2.2.1.1) zunächst von der Gefäßwand gelöst und in Nährmedium resuspendiert. Für die Zählung wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt. Anschließend wurde das Gemisch in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Die Zellen in vier Quadranten wurden ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellen pro ml} = \text{Durchschnitt der Zellzahl aus 4 Quadranten} * 2 (\text{Verdünnungsfaktor}) * 10^4$$

2.2.1.3 Behandlung mit Rapamycin

Für eine Behandlung wurden die HEK-T293 Zellen zunächst passagiert und gezählt. Die HEK-T293 Zellen wurden dann auf 6 well Platten ausgesät. Dabei wurden pro well 300.000 Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurde frisches Kulturmedium mit einer Rapamycinlösung versetzt. Dieses Kulturmedium enthielt Rapamycin in einer finalen Konzentration von 100 nM. Das Medium des Vortages wurde zunächst abgesaugt und durch das Kulturmedium mit Rapamycin ersetzt. Für die Kontrollen wurde statt der Rapamycinlösung nur das Vehikel DMSO in äquivalentem Volumen verwendet. Die Inkubation erfolgte für 24 h. Danach wurden die Zellen geerntet.

2.2.1.4 Zellernte

Das Medium wurde abgesaugt und die wells der Mikrotiterplatte einmal mit PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und erneut PBS zu den Zellen pipettiert. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Oberfläche gelöst und die in PBS befindlichen Zellen wurden in ein 15 ml Falcon überführt und für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Zu dem Zellpellet wurden je nach Menge der Zellen 50 – 100 µl 2x Magic Mix (mit 10% PhosStop, 1% Mercaptoethanol) hinzugegeben und die Zellen darin lysiert.

2.2.1.5 Kryokonservierung

Die Zellen wurden ähnlich dem Passagieren (s. 2.2.1.1) zunächst von der Gefäßwand gelöst und in Einfriermedium (s.Tab. 2.2.2) resuspendiert. Je 1 ml wurden in Kryoröhrchen pipettiert und diese daraufhin in einer Kryodose bei -80°C gelagert. Dies ermöglichte eine langsame, kontinuierliche Abkühlung und Perfusion des DMSO in die Zellen. Nach zwei Tagen wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt und dort bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Tabelle 2.2.1.2: Einfriermedium für HEK-T293 Zellen

Einfriermedium	Kulturmedium
	10% DMSO

2.2.1.6 Auftauen

Es wurde darauf geachtet zügig zu arbeiten. Ein Kryoröhrchen mit Zellen wurde im Wasserbad bei 37°C aufgewärmt, bis es fast komplett aufgetaut war. Die Zellsuspension wurde in ein vorbereitetes 15ml-Falcon mit Stoppmedium gegeben. Das Falcon wurde für 3 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen und das Zellpellet in einer entsprechenden Menge Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden nun ausgesät.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Arbeiten mit RNA

2.2.2.1.1 Isolierung von RNA aus Hirngewebe der Maus

Dieser Vorgang diente der Gewinnung der gewünschten RNA aus eukaryotischen Zellen. Für die Isolierung aus Gewebe des präfrontalen Cortex oder des Hippocampus wurde die Trizol-Chloroform Methode verwendet. Zunächst wurden 100 µl Trizol auf das Gewebe gegeben und dieses daraufhin mit einem Pistill zerkleinert. Nachdem das Gewebe ausreichend zerkleinert war wurden weitere 900 µl Trizol hinzugegeben. Das Gemisch wurde gevortext um eine homogene Suspension zu erhalten. Anschließend wurde die Suspension für 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und die Lösung so lange geschüttelt bis sie rosa-milchig erschien. Daraufhin wurde erneut bei RT für

2 Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Proben für 15 Minuten bei 12000 g 4 °C in einer auf 4 °C heruntergekühlten Tischzentrifuge zentrifugiert. Dies führte zu einer Phasentrennung. Die oberste, klare Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf Gefäß mit vorgelegten 500 µl kaltem Isopropanol überführt. Das Gemisch wurde leicht geschwenkt und für weitere 10 Minuten bei RT inkubiert. Dies führte zu einer Fällung der RNA. Es wurde bei 12000 g und 4° C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das erhaltene Pellet mit 1 ml kaltem 70% Ethanol gewaschen. Im Folgenden wurde bei 12000 g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und der Waschschrift wiederholt. Es wurde zum dritten Mal der Überstand abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Es wurde gewartet bis das Pellet komplett getrocknet war. Rückstände von Ethanol beeinträchtigen die Messung von RNA Konzentrationen und die weitere Verwendung der RNA in anschließenden Experimenten. Das trockene Pellet wurde in 50 µl Elutionspuffer gelöst. Für die Isolierung aus Proben des Nucleus accumbens wurde das High Pure RNA Isolation Kit von Roche verwendet. Es wurde nach Angaben des Protokolls vorgegangen.

2.2.2.1.2 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase eingesetzt. Sie dient dazu DNA-Kopien eines RNA-Moleküls zu synthetisieren. Es wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit verwendet. Für die reverse Transkription wurde 1 µg der isolierten RNA aus Zellen mit einem 1µl Random Hexamer Primer versetzt und mit nukleasefreiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Um Sekundärstrukturen des RNA-Templates aufzulösen, wurde der Ansatz für 5 Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 4 µl 5x Reaction Buffer, 1 µl RiboLock RNase Inhibitor (20U/µl), 2 µl 10 mM dNTP Mix und 1 µl RevertAid M-MuLV RT (200 U/µl). Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 5 Minuten bei 25°C und dann für 60 Minuten bei 42°C inkubiert. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Erhitzen auf 70°C für 5 Minuten. Nach einem Abkühlen auf 4°C wurde der Reaktionsansatz bei -20°C gelagert. Es wurde davon ausgegangen, dass sich nun eine äquivalente Menge an cDNA im Ansatz befand.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäurelösungen

2.2.2.2.1 Konzentrationsbestimmungen am UV-Vis Spektrophotometer

Nukleinsäuren absorbieren UV-Licht. Im Nanodrop wird die zu untersuchende Lösung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 260 nm durchstrahlt und ein Photosensor misst die Größe der austretenden Strahlung. Je größer die Absorption der Lösung desto größer die Nukleinsäurekonzentration. Mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes lässt sich die Menge des Lichtes in Relation zur Konzentration der Nukleinsäuren setzen. Eine optische Dichte von 1 entspricht einer Nukleinsäurekonzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA, 37 µg/ml

für einzelsträngige DNA und 40 µg/ml für einzelsträngige RNA. Die Reinheit der Nukleinsäurelösung lässt sich aus dem Absorptionsverhältnis bei 260 und 280 nm bestimmen. Für proteinfreie Lösungen liegt dieser bei 1,8-2,0.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmungen mit Qubit®

Die in 2.2.2.1 vorgestellte Konzentrationsbestimmung mittels UV-Spektrophotometer findet zwar häufig Anwendung, ist aber oft ungenau. Die UV-Absorption kann nicht zwischen DNA, RNA und Proteinen unterscheiden. Zudem werden die Werte durch andere Kontaminanten wie Einzelnukleotide, Salze und organische Bestandteile beeinflusst. Auch ist das UV-Spektrophotometer bei geringen DNA- bzw. RNA-Gehalten nicht sehr selektiv. Daher bietet sich eine Methode an, die sich fluoreszierende Farbstoffe zu Nutze macht um Nukleinsäuren zu quantifizieren. Im Vergleich zur Konzentrationsbestimmung mittels UV-Spektrophotometer ist die fluorometrische Bestimmung durch ein Qubit selektiver, sensitiver und genauer. Einen Überblick zum Ablauf ist in Abb. 2.2.1 zu sehen.

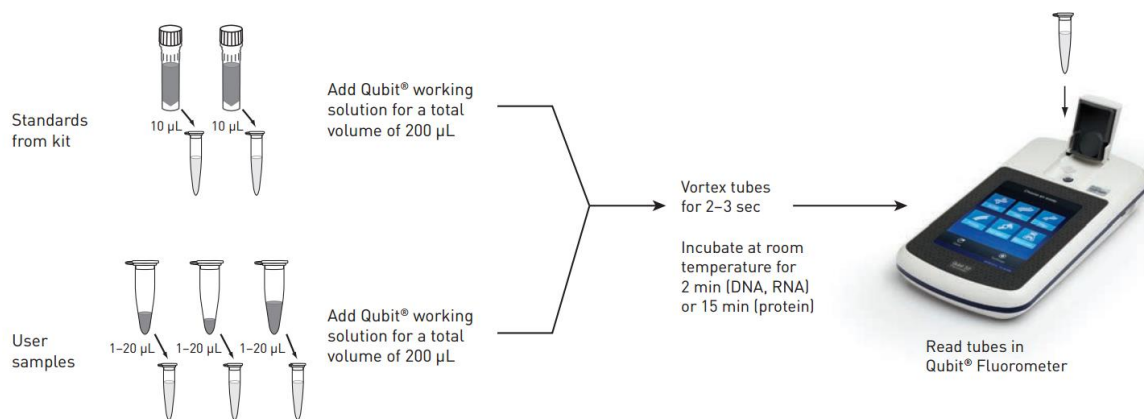


Abbildung 2.2.1: Ablauf Qubit®-Messung

2.2.2.3 Quantitative PCR (qPCR)

Mithilfe der real-time PCR lässt sich die Akkumulation von Amplifikationsprodukten bereits während der Reaktion nachvollziehen. Nutzt man die Methode zudem um die Menge der anfänglich vorhandenen DNA-Kopien eines Zielgens zu bestimmen spricht man von einer quantitativen PCR. Während der Amplifikation ist durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes, wie z.B. SYBR-Green, die Detektion des PCR-Produkts möglich. Bei SYBR-Green handelt es sich um ein fluoreszierendes Molekül, welches sich unspezifisch in die kleine Furche doppelsträngiger DNA einlagern kann. Eingelagerte Moleküle können bei 498nm angeregt werden und emittieren dann Licht einer Wellenlänge von 522nm. Das Fluoreszenzsignal verhält sich hierbei proportional zur Menge an doppelsträngiger DNA, d.h. je mehr PCR-Produkt amplifiziert wurde, desto stärker ist das Fluoreszenzsignal.

Die quantitative PCR der immediate early genes wurde mittels eines Step One Plus Real-Time-PCR-Systems von Applied Biosciences durchgeführt. In den Wells einer 96-well Titerplatte wurden zunächst 2 µl einer 5 ng/µl cDNA-Verdünnung vorgelegt. Dazu wurden 8 µl eines Mastermixes pipettiert. Dieser bestand pro Well aus 2,6 µl dH₂O, 0,4 µl Primer-Mix und 5 µl 2x TaKaRa SYBR® Premix Ex Taq™ II. SYBR® Premix Ex Taq™ II von TaKaRa enthielt Puffer, DNA-Polymerase, dNTPs, und den SYBR Green-Farbstoff. Mit Verwendung dieser optimierten Lösung sollte der Nachteil, dass sich SYBR Green unspezifisch in alle doppelsträngigen DNA-Moleküle, also auch Artefakte, einlagert minimiert werden. Die Titerplatte wurde mit einer Folie verschlossen, in das Step One Plus Real-Time-PCR-System verbracht und das Programm gestartet (s.Tab.2.2.5).

Nach der Amplifikation wurde eine Schmelzkurve von 55-95°C mit einem Anstieg von 0,5°C pro 30 s erstellt. Mithilfe der Schmelzkurve lässt sich feststellen ob nur das gewünschte Produkt oder auch Artefakte entstanden sind. An die PCR anschließend wurde ein Amplifikationsplot erstellt. Dabei wird die Anzahl der Zyklen auf der x-Achse gegen die Stärke des Fluoreszenzsignals auf der y-Achse aufgetragen. Aus der Grundlage des bestehenden Hintergrunds wird ein Schwellenwert für das Signal der Proben berechnet. Der am Ende angegebene C_T-Wert (engl. cycle threshold) gibt den Zyklus an, bei dem zum ersten Mal ausreichend Produkt vorhanden ist um ein Signal zu erhalten, welches sich klar vom Hintergrund unterscheidet. Auf diese Weise lassen sich die cDNA-Mengen aus unterschiedlichen Proben miteinander vergleichen. Ein kleiner C_T-Wert sagt aus, dass nur wenige Zyklen notwendig waren um den Grenzwert zu erreichen. Folglich muss in der Probe zu Beginn bereits eine hohe Menge an zu untersuchender cDNA vorhanden gewesen sein. Ist der C_T-Wert groß, verhält es sich genau gegenteilig. Allerdings ist zu beachten, dass es nicht gewährleistet ist, dass sich vor der Amplifikation gleiche Mengen an cDNA in den Reaktionen befunden haben. Neben Mess- und Pipettierfehlern ist die Tatsache problematisch, dass eine cDNA-Synthese unterschiedlich effizient verlaufen kann. Die Werte schwanken zwischen 5% und 90%. Folglich erhält man einen Hinweis zur Mindestmenge an mRNA im ursprünglichen Ansatz, aber keinen genauen Wert. Bei der relativen Quantifizierung, welche in dieser Arbeit angewendet wurde, wird versucht dieses Problem zu lösen in dem man die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres, konstant exprimiertes „Haushaltsgen“, als internen Standard, bezieht (Mülhardt, 2013). Dieses Vorgehen nennt man Normalisierung der Expressionsresultate. Nach der Normalisierung gegen das Haushaltsgen wurde dann noch ein Kalibrator innerhalb der Proben festgelegt. Der Wert des Kalibrators wurde auf 1 gesetzt und die Expression des Zielgens in den zu vergleichenden Proben relativ dazu bestimmt. Auf diese Weise lässt sich eine Aussage darüber treffen ob die Expression eines Zielgens in einer Probe im Vergleich zum Kalibrator zu- oder abnimmt.

Für jedes biologische Replikat wurde wie folgt verfahren. Zunächst wurde der Mittelwert der CT-Werte aus allen positiven PCR-Läufen jeder Probe berechnet. War die Standardabweichung schlechter als 5 % wurde der schlechteste Wert herausgenommen. Im nächsten Schritt wurden die zu untersuchenden Gene über die Expression des Referenzgens *Gapdh* normalisiert. Dazu wurde der C_T -Wert des Zielgens der verschiedenen Proben vom entsprechenden C_T -Wert des Referenzgens subtrahiert. Dann wurde ein biologisches Replikat der Gruppen ungestresste Kontrollen, Resiliente und Anfällige ausgewählt, gegen den kalibriert werden sollte. Aus praktischen Gründen wurden aus der Gruppe der ungestressten Kontrollen als Kalibrator ausgewählt. Der ΔC_T -Wert der Kalibratorprobe wurde für jedes Gen vom ΔC_T -Wert der zu vergleichenden Proben abgezogen. Aus dem so gebildeten $\Delta\Delta C_T$ -Wert wurde abschließend die Potenz mit der Basis 2 gebildet. Der sich durch diese Berechnung ergebende Zahlenwert gibt die relative Expression des einzelnen Zielgens normalisiert zu dieser Kontrollprobe und dem Referenzgen *Gapdh* wieder. Die erhaltenen Werte wurden für die drei biologischen Replikate gemittelt.

Tabelle 2.2.2.1: Programm qPCR

Holding Stage	Cycling Stage			Melt Curve		
95°C	94°C	60°C	72°C	60°C	95,5°C	20°C
30 s	15 s	30 s	30 s	15 s	15 s	10 s

2.2.2.4 Arbeiten mit DNA

2.2.2.4.1 Extraktion genomischer DNS aus Ohrlochstanzen

Die Ohrstanzen wurden je Probe mit 200 μ l Verdaupuffers und 25 μ l Proteinase K (Stammlösung 4 mg/ml) versetzt. Alle Proben wurden kurz gevortext. Dann wurden sie über Nacht bei 56°C und 650 rpm auf einem Thermoblock mit Schüttelfunktion inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Proben erneut kurz gevortext und dann bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge für 10 Minuten zentrifugiert. 50 μ l des Verdaus wurden mit 100 μ l dH₂O 1:3 verdünnt. Dieser Schritt diente der Verdünnung des enthaltenen SDS, welches in der nachgeschalteten PCR störte. Die Verdünnung wurde für die PCR zur Genotypisierung verwendet.

Tabelle 2.2.2.2.1: Zusammensetzung Verdaupuffer

1M Tris-Cl pH 8	3 ml
0,5 M EDTA pH 8	400 μ l
1M NaCl	6 ml
10% SDS	60 μ l
dH ₂ O	20,54
Total	30ml

2.2.2.4.2 PCR zur Tsc2-Genotypisierung

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Verfielfältigung eines ausgewählten DNA-Bereiches. Zudem lassen sich durch entsprechendes Primerdesign auch Modifikationen wie zum Beispiel Schnittstellen in den Verfielfältigungen generieren. Eine PCR lässt sich grundsätzlich in drei Schritte unterteilen. Im ersten Schritt, der Denaturierung, müssen die DNA-Stränge voneinander gelöst werden. Dies geschieht durch Erhitzung auf 98°C. Beim Annealing, dem zweiten Schritt, binden die Primer ihre jeweils komplementäre Sequenz auf den Matrizensträngen. Die zu wählende Temperatur ist dabei von den Eigenschaften der Primer abhängig. Beim dritten Schritt, der Elongation bindet eine Polymerase an den Primer und verlängert diesen an dessen 3'Ende komplementär zum gebundenen Matrizenstrang. Die Dauer der Elongation richtet sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes, wobei häufig von 1kb pro Minute ausgegangen wird. Die drei Schritte werden mehrfach wiederholt. Dabei kommt es zu einer exponentiellen Zunahme des zu vervielfältigenden Fragments. Die Bestimmung der Schmelztemperaturen und damit indirekt der Annealingtemperaturen für die Primer erfolgt näherungsweise nach der folgenden Formel:

$$(T_m) = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

Es wurde ein Mastermix aus den in Tabelle 2.2.2.2.2 genannten Ingredienzien (außer DNA) hergestellt. Von jeder DNA Probe wurden je 1 µl in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß vorgelegt. Dann wurden je 24 µl des vorbereiteten Mastermixes hinzupipettiert und das Gemisch kurz gevortext und zentrifugiert. Anschließend wurde eine PCR wie in Tabelle 2.2.2.3 angegeben durchgeführt.

Tabelle 2.2.2.2.2: Zusammensetzung Ansatz der PCR zur Tsc2-Genotypisierung

H ₂ O	15 µl
10x Puffer	2,5 µl
MgCl ₂	1,5 µl
*10 mM dNTP	0,5 µl
*10 µM Primer 164	1 µl
*10 µM Primer 163	1 µl
*10 µM Primer 162	2 µl
Taq polymerase	0,5 µl
DNA	1 µl
Total	

Material und Methoden

Tabelle 2.2.2.2.3: Programm der PCR zur Genotypisierung von *Tsc2*

Schritt	Temperatur (in °C)	Dauer	Kommentar
1	94	3 Minuten	
2	94	30 Sekunden	
3	62	30 Sekunden	
4	72	30 Sekunden	
5			Schritte 2-4, 35 mal
6	72	10 Minuten	
7	4	halten	

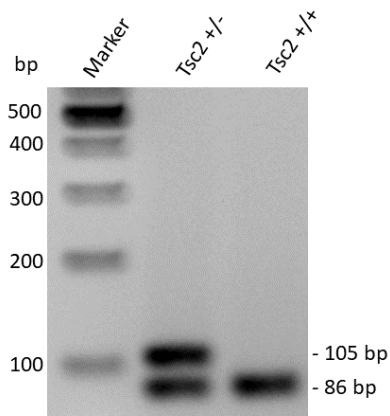


Abbildung 2.2.2: Beispielhafte Darstellung des Ergebnisses einer Gelelektrophorese einer *Tsc2*-Genotypisierung. Die heterozygoten Tiere (*Tsc2 +/-*) zeigen neben einer Bande des wildtypischen Allels bei 86 bp eine weitere Bande bei 105 bp auf. Diese Bande wird durch das mutierte Allel, bei dem eine Neomycin-Kassette in das zweite Exon des *Tsc2* Gens eingefügt wurde, verursacht (Onda et al., 1999).

2.2.2.4.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient dazu Nukleinsäuren ihrer Größe entsprechend aufzutrennen. Es wurde zunächst ein 2%-iges (w/v) Agarosegel gegossen. Hierfür wurden 6 g Agarose in 400 ml 1x TAE, mittels Aufkochens, gelöst und mit 8 µl Ethidiumbromidlösung versetzt. Anschließend wurde eine adäquate Menge der Agaroselösung in einen präparierten Schlitten gegossen. Durch Einsetzen des geeigneten Probenkammes ließ sich das Gel der Anzahl der Proben entsprechend herrichten. Das Gel sollte nun für ca. eine halbe Stunde auspolymerisieren. Abhängig vom Volumen der aufzutragenden Probe wurde ihr Ladepuffer beigefügt. Nach dem Auspolymerisieren des Agarosegels wurde dieses in die Elektrophoresekammer überführt, sodass es mit 1xTAE (Laufpuffer) (s.Tab. 2.2.2.2.4 und 2.2.2.2.5) bedeckt war. Die Proben und ein Marker wurden in die Taschen pipettiert. Es wurde entsprechend der Gelgröße für ca. 20 Minuten eine Spannung von 150 bis 180 V angelegt. Die negative Ladung der Nukleinsäuremoleküle führt dazu, dass diese zur Anode wandern. Kleinere Moleküle können sich dabei schneller durch das Agarosegel bewegen als große und es kommt zur Auftrennung nach der Größe. Ethidiumbromid interkaliert in die große Furche der DNA. Dies führt zu einer Änderung des Emissionsspektrums unter UV-Licht. Somit lassen sich die Nukleinsäurebanden unter UV-Licht detektieren.

Tabelle 2.2.2.2.4: Rezept 50x TAE-Puffer

50x TAE	242g Tris
	18,6g EDTA
	57,1ml Essigsäure(100%)
	mit dest.H2O auf 1l auffüllen

Tabelle 2.2.2.2.5: Rezept 1x TAE-Puffer

1x TAE	40 ml 50x TAE
	mit dest.H2O auf 2l auffüllen

2.2.3 Histologische Methoden

2.2.3.1 Mikropräparation gefrorener Hirnschnitte nach Palkovits

Die mit Stickstoff schockgefrorenen Gehirne wurden an einem Kryostaten geschnitten. Dafür wurden die Gehirne mit TissueTek® auf dem Gewebehalter des Kryostats befestigt. Der Halter mit dem Gewebeblock wurde im Kryostat so ausgerichtet, dass 100 µm dicke Schnitte mit vertikaler Schnitfführung gemacht werden konnten. Wurde die zu untersuchende Zielregion erreicht, wurde das Gewebe an der entsprechenden Stelle aus dem Schnitt herausgestanzt (Palkovits, 1983). Die Stanzen wurden in eine vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Lyse des Gewebes bei -80°C gelagert.

2.2.4 Verhaltensexperimente im Mausmodell

2.2.4.1 Induktion des chronisch sozialen Stresses

2.2.4.1.1 Chronic Social Defeat Paradigm

Um psychisch-sozialen Stress zu simulieren wie er beim Menschen entstehen kann, verwenden wir für unsere Mäuse das „social defeat“ Stressmodell (Golden et al. 2011). Die Versuchsm Maus („intruder“) wurde in den „home cage“ eines größeren, stärkeren und aggressiveren CD1 Männchens („resident“) gesetzt. Eine adulte männliche Maus („resident“) verteidigte ihren Heimkäfig gegen die hinzugesetzte, zu untersuchende Maus („intruder“). Nach 15 Sekunden der Attacke wurde diese durch Trennung der Mäuse beendet, um Verletzungen zu vermeiden. Die Versuchsm Maus wurde, durch ein Gitter getrennt, 24 Stunden im Käfig des „resident“ bleiben und in dieser Zeit weiterhin visuellen und olfaktorischen Kontakt haben. Um Gewöhnungseffekten und damit einer Reduktion des Stresspegels entgegenzuwirken, die durch die wiederholte Verwendung desselben „resident-intruder“ Paares entstehen könnte, wurde die Versuchsm Maus jeden Tag in den Käfig eines ihr unbekanntes „residents“ gesetzt. Die Prozedur wurde über 10 Tage hinweg täglich wiederholt, um chronischen Stress zu induzieren.

2.2.4.2 Sozialverhalten der Mäuse

2.2.4.2.1 Social Interaction (SI) (2-chamber)

Jede Maus wurde in einer Arena (40 cm × 40 cm × 40 cm) mit einem zylindrischen Drahtgittergehäuse an einer Seite getestet. Gedimmte Beleuchtung (50 Lux) wurde verwendet, da es häufig für soziale Interaktionstests verwendet wird und die Maus durfte sich frei im Feld bewegen. Jeder Test bestand aus 2 Sitzungen mit einer Dauer von 150 s. In der ersten Sitzung war das Drahtgittergehäuse zunächst leer. Nach einer kurzen Pause von 30 s begann die zweite Sitzung, in der eine der C57BL/6J Maus unbekante CD1-Maus in das Drahtgittergehäuse eingebracht wurde. Bei der Bewertung der longitudinalen Entwicklung des sozialen Interaktionsverhaltens nach CSD-Stress mit Retesting wurden, um die Neuheit der CD1-Mäuse gegenüber C57BL/6J zu garantieren jeweils unterschiedliche Chargen von CD1-Mäusen zu jedem Zeitpunkt verwendet. Das Erkundungsverhalten der Mäuse wurde mit einer Kamera (CCD) aufgezeichnet und mit der Video-Tracking-Software EthoVision XT (Noldus Information Technology) analysiert. Die Zeit, die jede Maus in einem runden Bereich (8 cm radial vom Netz) um das Gehäuse, definiert als Interaktionszone (IZ), verbrachte, wurde bestimmt und der SI-Index wurde berechnet als: $(\text{Zeit der Maus in der Interaktionszone mit CD-1 Maus}) / (\text{Zeit der Maus in der Interaktionszone ohne CD-1 Maus})$ multipliziert mit 100. Scores < 100 wurden als Indikatoren für soziales Vermeidungsverhalten interpretiert. Nach der zweiten Sitzung wurde das Feld mit alkoholhaltigen Papiertüchern gereinigt und die Testsitzung wurde mit einer anderen Maus wiederholt.

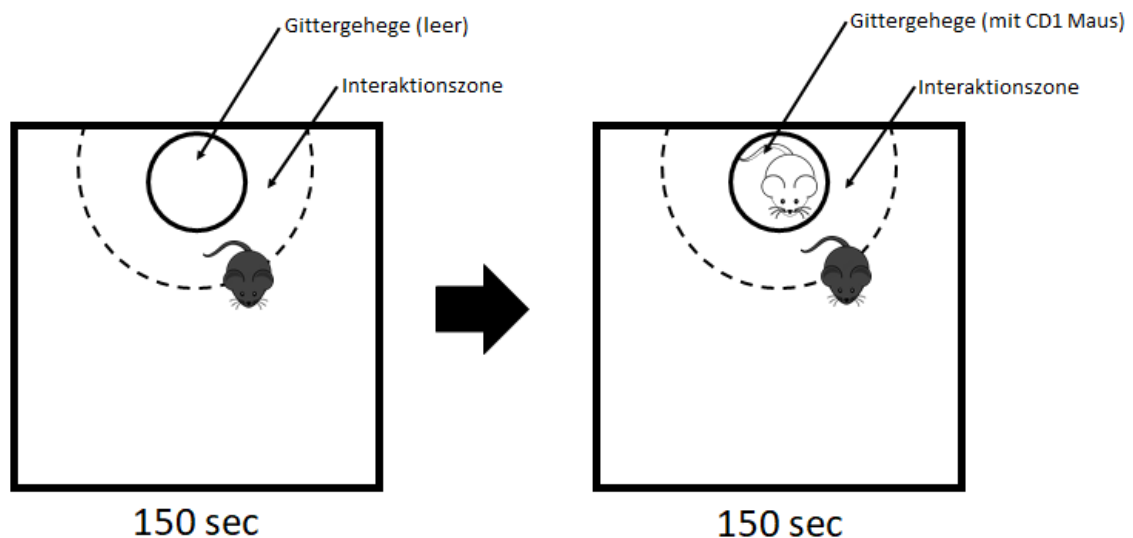


Abbildung 2.2.3: Schema des Social Interaction (SI) (2-chamber) Tests

2.2.4.2.2 Social Novelty (SN)

Jede Maus wurde in eine Arena (cm x cm) getestet. Die Arena war dabei in 3 gleich große Kompartimente unterteilt. In den äußeren Kompartimenten befand sich jeweils ein zylindrischer Käfig. Der Zugang zu den äußeren Bereichen wurde zunächst blockiert und die Maus für 5 Minuten zur Gewöhnung in den mittleren Bereich gesetzt. Danach wurde die Maus aus der Arena entnommen und die äußeren Kompartimente geöffnet. Für die erste Phase wurde in einen der Zylinder eine unbekannte B6 Maus gesetzt. Der Zylinder auf der gegenüberliegenden Seite verblieb leer. Die zu testende Maus wurde in die Arena gesetzt und für 10 Minuten getestet. Dabei wurde der Aufenthalt des Kopfes in einer definierten 1 cm Zone um den Zylinder mittels EthoVision gemessen. Danach wurde die zu testende Maus erneut aus der Arena genommen und die Arena für die zweite Phase vorbereitet. Hierfür wurde eine zweite unbekannte B6 Maus in den zuvor leeren Zylinder gesetzt. Die zu testende Maus wurde erneut für 10 Minuten in die Arena gesetzt und die Interaktionszeit mit der bereits bekannten sowie der unbekanntes Maus gemessen. Nach Abschluss wurden alle Mäuse entnommen, in ihre Käfige zurückgesetzt und die Arena für die nächste Testmaus gereinigt und vorbereitet.

2.2.4.3 Angstverhalten der Mäuse

2.2.4.3.1 Elevated Plus Maze (EPM)

Es handelt sich hierbei um ein plusförmiges, erhöhtes Areal (40 cm über dem Boden), das zwei offene und zwei geschlossene Arme (mit Umrandung von 15 cm) der Fläche 30 x 5 cm aufweist, die über eine Zentralfläche von 5 x 5 cm miteinander verbunden sind. Die Maus wurde einmalig in das zentrale Areal gesetzt und für 5 Minuten mittels eines Videoüberwachungssystems in ihrem Verhalten aufgezeichnet. Es wurden die Verweildauer, Laufstrecke und Häufigkeit des Betretens der offenen Arme im Vergleich zu den geschlossenen Armen ausgewertet. Der Test ermöglicht Aussagen über den Ängstlichkeitszustand der Maus.

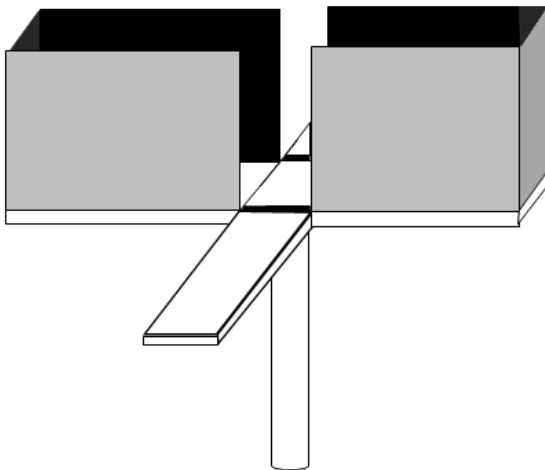


Abbildung 2.2.4: Schema des Elevated Plus Maze Tests

2.2.4.3.2 Open Field (OF)

Die Maus wurde einmalig in die Ecke einer Apparatur mit quadratischer Arena (40 x 40 x 40 cm) gesetzt und ihre Bewegungen für 10 Minuten mithilfe eines Videoüberwachungssystems aufgezeichnet. Ausgewertet wurden die zurückgelegte Laufstrecke, Verweildauer, Geschwindigkeit und die verbrachte Zeit in einer festgelegten zentralen und äußeren Zone. Der Test erlaubt Aussagen über das lokomotorische Verhalten und den Angstzustand der Maus. Der Test wurde bei 150 lux durchgeführt.

2.2.4.4 Testung der Gedächtnisleistung

2.2.4.4.1 24 hour Novel Object Recognition Task (24 h NORT)

Für die erste Probenphase des Novel Object Recognition Test (NORT) wurden Mäuse in eine Arena (40 cm breit × 40 cm tief × 40 cm hoch) gesetzt und ihnen wurden zwei identische Objekte präsentiert. Die Mäuse durften die Arena und die Gegenstände 5 Minuten lang erkunden, bevor sie sie für ein 24-Stunden-Intervall in ihrem Heimatkäfig verbracht wurden. Am nächsten Tag wurde den Mäusen dann eine zweite 5-minütige Trainingsphase gegeben. Nach der zweiten Probenphase wurden die Mäuse wieder in ihren Heimkäfig zurückgebracht und verblieben dort bis zum nächsten Tag. In der Testphase am dritten Tag wurde eines der Items durch ein neuartiges Objekt ersetzt. In der Testphase wurde das Verhalten von Mäusen mit einer Kamera (CCD) aufgezeichnet. Die Testphase dauerte 10 Minuten. Die Positionen der Objekte und das Objekt, das durch den neuartigen Gegenstand ersetzt wurde, wurde zwischen den einzelnen Gruppen ausgeglichen, sodass es nicht zu Fehlinterpretationen aufgrund von Präferenzen kommen konnte. Die Videos wurden mit BORIS v. 6.3.9 analysiert und Zeit zum Erkunden beider Objekte wurde bestimmt. Der Diskriminierungsindex (DI) wurde berechnet als $(\text{Zeit unbekanntes Objekt}) - (\text{Zeit bekanntes Objekt}) / (\text{Zeit unbekanntes Objekt} + \text{Zeit bekanntes Objekt})$. Bei der Analyse der longitudinalen Entwicklung der Kognition mit wiederholter Testung wurden, um die Neuheit der Objekte für die Mäuse zu jedem Zeitpunkt zu garantieren, unterschiedliche Objektpaare verwendet.

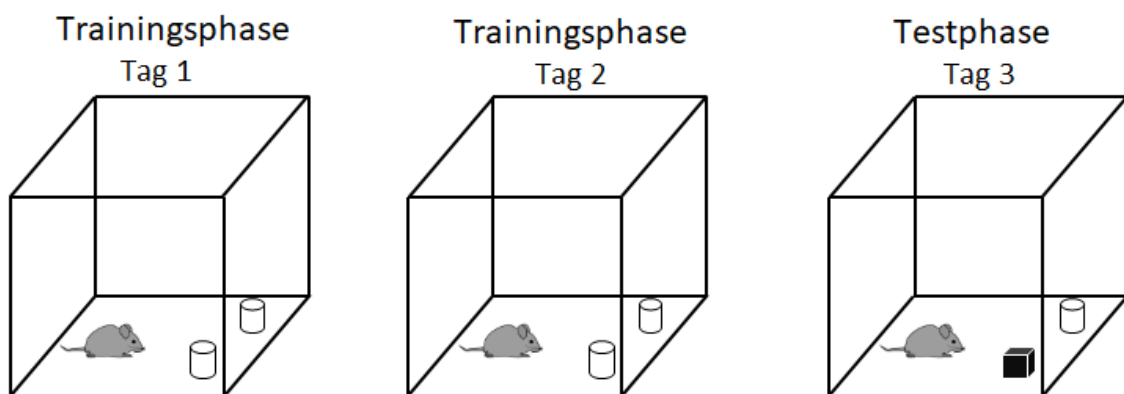


Abbildung 2.2.5: Schema des 24h NORT

2.2.4.4.2 Y-Maze

Der YM-Test wird verwendet, um kognitive Defizite in KO-Mäusen zu quantifizieren. Der Test erfolgte in einem Y-förmigen Labyrinth mit drei schwarzen, opaken Plastikarmen die in einem Winkel von 120 ° zueinander standen. Die Maus wurde einmalig in einen der drei Arme gesetzt und für 10 min mittels eines Videoüberwachungssystems in ihrem Verhalten aufgezeichnet. Während der 10 min durfte die Maus alle drei Arme frei erforschen. Typischerweise erforschen Mäuse neue Umgebungen und bevorzugen aus dieser Bereitschaft heraus einen neuen Arm des Labyrinths, anstatt in den Arm zurückzukehren, der zuvor schon besucht wurde. Die Maus muss sich also erinnern, welcher Arm des Labyrinths zuvor schon erkundet wurde und entscheiden, welcher Arm als nächstes besucht wird. Die spontanen Richtungswechsel, die binnen der 10-minütigen Testphase von der Maus getätigt werden, werden in Prozent angegeben.

2.2.4.5 generelles Wohlbefinden und natürliche Verhaltensweisen

2.2.4.5.1 Grooming

Grooming also Selbstpflegeverhalten ist in vielen Spezies weit verbreitet und dient der Hygiene und Pflege der Körperoberfläche. Bei Nagern lässt sich vor allem ein cephalocaudaler Ablauf (Pfoten lecken – Nasen und Gesichtswäsche – Körperwäsche – Schwanz- und Genitalwäsche) erkennen. Es kann aber auch anderen Funktionen wie z.B. Stimulation der Haut, Thermoregulation, Chemokommunikation, sozialer Interaktion und Arousal dienen und kann mit Stress assoziiert sein. Stress führt dabei zu einem erhöhten Putzverhalten und die Art des Stresses beeinflusst das Muster des Putzverhaltens. Bei Mäusen mit einem autistischen Phänotyp lassen sich starke repetitive Verhaltensweisen durch das Grooming erkennen. Die Mäuse wurden für maximal 15 Minuten in eine durchsichtige Glasvase (9-11 cm Durchmesser und 20-23 cm Höhe) gesetzt. Aufgrund der eingeschränkten Explorationsmöglichkeiten (geringer Platz und keine Objekte), wird das Selbstpflegeverhalten der Mäuse begünstigt. Damit die Maus in ihrem Verhalten nicht gestört wurde, positionierte sich der Experimentator in einem Abstand von ca. 2 m und maß die Zeit, die die Maus mit Selbstpflege verbrachte und inwieweit unterschiedliche Putzabläufe gegeben waren. Zusätzlich zur direkten Auswertung wurde das Verhalten noch von seitlich der Vase positionierten Videoüberwachungssystemen aufgenommen. Der Test wurde bei einer Lichtstärke von 100 Lux durchgeführt.

2.2.4.5.2 Nest Building

Für kleine Nagetiere sind Nester wichtig für die Konservierung der Körpertemperatur, bei der Aufzucht der Jungen und Schutz vor Fressfeinden (Deacon et al., 2006). Der Nestbau kann somit Rückschlüsse auf das Wohlergehen und die Gesundheit der Tiere geben. Für das Experiment wurden zunächst alle Anreicherungsgegenstände aus den Käfigen der zu analysierenden Mäuse entfernt. Etwa eine Stunde vor Beginn der Dunkelphase wurden den einzeln sitzenden Mäusen je ein Nestlet in den Käfig gelegt. Die Nestlets wurden vorher gewogen und das Gewicht jeden einzelnen Nestlets wurde dokumentiert. Ein Nestlet sollte ca. 2-3g wiegen. Am nächsten Tag wurden die Nester anhand einer Bewertungsskala von 1 bis 5 bewertet, wobei Score 1 einem Nest zugeordnet wird, bei dem das Nestlet noch mehr als 90% intakt war. Score 5 wurde vergeben, wenn mehr als 90% des Nestlets verwendet wurde (Deacon et al., 2006). Ebenso wurden die nicht verwendeten Nestletreste erneut gewogen, um das Gewicht mit dem Ausgangswert vergleichen und die Menge an verarbeitetem Nestlet bestimmen zu können

2.2.4.6 Analyse von depressivem Verhalten

2.2.4.6.1 Sucrose Preference

Der Sucrose Preference Test nutzt die von Natur aus gegebene Präferenz von Nagetieren für Süßes. Man nimmt dabei an, dass der Verzehr der Süßigkeiten dabei proportional zur Freude ist, welche das Tier durch den Verzehr empfindet (Hoffmann 2016). Bei diesem Test wird daher die Menge an einer süß-schmeckenden Lösung, die über einen bestimmte Zeitraum konsumiert wird gemessen. Die süße Zuckerlösung ist dabei frei verfügbar und es bedarf keiner besonderen Anstrengung von Seiten des Tieres. Man kann daher annehmen, dass der Konsum der Zuckerlösung den reinen Grad an hedonischer Freude widerspiegelt, welchen das Tier empfinden kann. Für den Test wurden zwei Flaschen verwendet, wobei eine der Flaschen eine Zuckerlösung beinhaltet und die andere nur Wasser. Bei Sucroselösungen werden in der Regel Konzentrationen von 0,5-2% verwendet.

Die Tiere durchliefen zunächst eine Gewöhnungsphase. Dabei wurden den Tieren 2 Trinkflaschen dargeboten, von denen Eine eine 2,5%-ige Sucroselösung enthielt und die Andere gewöhnliches Trinkwasser. Um Präferenzen des Tieres für eine Seite auszugleichen wurde die Position der Flaschen täglich getauscht. Am dritten Tag begann die Testphase, bei der die Aufnahme von Zuckerlösung bzw. Wasser dokumentiert wird. Hierfür wurden die Flaschen um 8:00 Uhr entnommen, aufgefüllt, gewogen und anschließend wieder im Käfig platziert. Um 17:00, vor Beginn der Dunkelphase, wurde die Position der Flaschen getauscht. Am Morgen des vierten Tages wurden die Trinkflaschen erneut gewogen und die Aufnahme von Zuckerlösung und Wasser berechnet.

2.2.4.6.2 Tail Suspension

Der Tail Suspension Test basiert auf der Tatsache, dass Tiere, die einem kurzzeitigen, unausweichlichen Stress durch Hängen am Schwanz ausgesetzt sind, eine unbewegliche Haltung einnehmen (Cryan et al. 2005). Dabei lassen sich aufgrund der Zeit, die vergeht bis die Maus immobiles Verhalten zeigt, bzw. die Gesamtdauer des immobilen Verhaltens über einen definierten Zeitraum Aussagen zu depressivem Verhalten treffen.

Die Mäuse wurden für je 6 min mit Leukosilk am Schwanz hängend an einer Metallwand fixiert und das Verhalten mit einer Videokamera dokumentiert und später mithilfe von EthoVision XT analysiert. Mithilfe des Videos wurde später die Dauer der Bewegungslosigkeit gemessen. Als bewegungslos wurde die Zeitspanne definiert, in der die Maus sich nicht aktiv bewegt. Passive leichte Pendelbewegungen nach einer Phase mit starker Aktivität wurde dabei ebenfalls als bewegungslos definiert.

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1 Herstellung von Proteinlysaten

Das Gewebe wurde mit einem Pistill in Lysepuffer (s. Tab. 2.2.5.1, 250 µl/ 5mg Gewebe) zerkleinert und für 2 h bei 4°C und 900 rpm inkubiert. Das Gemisch wurde auf eine QIAshredder Säule pipettiert und bei 12000 g für 2 Minuten zentrifugiert. Das Lysat wurde anschließend bei -20°C gelagert. Zellen wurden durch Zugabe von 50 – 100 µl Lysepuffer und anschließendem Hoch- und Runterpipettieren lysiert und das Gemisch direkt im Anschluss auf die QIAshredder Säule geladen und ebenfalls bei 12000 g für 2 Minuten zentrifugiert. Auch hier wurde das Lysat bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.2.5.1: Rezept Lysepuffer

Magic Mix 2x (10 ml)	4,8 g Harnstoff
	150 µl 1M Tris pH 7,5
	0,87 ml Glycerin
	1 ml 10 % SDS
	Protease inhibitor
	Phosphatase inhibitor
vor Verwendung hinzugegeben	1% β-Mercaptoethanol

2.2.5.2 SDS-PAGE

Im Gegensatz zur Agarosegelelektrophorese werden bei der SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) keine Nukleinsäurefragmente untersucht, sondern Proteine. Die Auftrennung der Proteine geschieht hierbei in einem Polyacrylamidgel innerhalb eines elektrischen Feldes. Die Polymerbildung des Acrylamids wird durch Zugabe von Ammoniumperoxidisulfat (APS) und TEMED erreicht. Der Anteil des Acrylamids bestimmt die Porengröße des Gels und so die Trennfähigkeit. Natriumdodecylsulfat ist ein anionisches Tensid, welches sich an die Proteine anlagert. Seine negative Ladung ermöglicht es ihm die Eigenladung der Aminosäuren der Proteine zu überlagern. Die Abstoßung der negativen Ladungen des Natriumdodecylsulfates und ein Aufkochen bei 100°C führen zu einer Linearisierung der Proteine. Je länger die Aminosäurekette ist, desto mehr SDS-Moleküle können sich an sie anlagern. Die Molekülmasse ist also proportional zur Kettenlänge.

Die Gele bestanden aus einem Teil, welcher zum Auftrennen der Proteine gedacht war und einem Teil in welchem sich die Proteine zunächst sammeln sollten. Das Trenngel hatte dabei einen Acrylamidgehalt von 10% und das Sammelgel einen Acrylamidgehalt von 4%. Die im Sammelgel entstehenden Poren sind relativ groß und der unterschiedliche pH-Wert von Trenn- und Sammelgel führt dazu, dass sich die Proteine an der Phasengrenze zunächst sammeln. Die Gele enthielten jeweils SDS-, APS- und TEMED. Beim Gießen wurden zunächst das Trenngel bis 2 cm unter den Rand der kurzen Glasplatte gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach 30-minütiger Wartezeit wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Es wurde bis zum Rand gegossen und schließlich der Probenkamm eingesetzt. Nach vollständigem Auspolymerisieren wurde das Gel in die Elektrophoresevorrichtung eingesetzt und der Tank mit 1x Laufpuffer bis zur entsprechenden Markierung aufgefüllt. Das Gel wurde für 10 Minuten bei 100 V "vorlaufen" gelassen. Die Proben wurden vor dem Auftragen für 5 Minuten bei 95°C gekocht. Neben den Proben wurde 8 µl PageRuler Prestained Protein Ladder als Marker aufgetragen.

Tabelle 2.2.5.2.1: Rezept APS

10 % APS (10 ml)	3 g Ammoniumpersulfat
	9 ml dH ₂ O

Tabelle 2.2.5.2.2: Rezept 0,5 M Tris pH 6,8

0,5 M Tris pH 6,8 (500ml)	30,725g Tris
	Auf 500 ml mit dH ₂ O (pH mit konzentrierter HCl eingestellt)

Material und Methoden

Tabelle 2.2.5.2.3: Rezept 1,5 M Tris pH 8,8

1,5 M Tris pH 8,8 (500ml)	90,825 g Tris
	Auf 500 ml mit dH ₂ O (pH mit konzentrierter HCl eingestellt)

Tabelle 2.2.5.2.4: Rezept Laufpuffer

Laufpuffer (1l)	3 g Tris
	14,4 g Glycin
	1 g SDS

2.2.5.3 Western Blot

Der Western-Blot dient der Übertragung von bei einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran. Aufgrund eines senkrecht zum Polyacrylamidgel verlaufenden, angelegten elektrischen Feldes wandern die Proteine auf die Membran und haften dort aufgrund hydrophober Wechselwirkungen fest. Das Muster der zuvor erhaltenen elektrophoretischen Auftrennung bleibt erhalten. Das SDS wird durch das im Transferpuffer enthaltene Methanol gewaschen, eine vollständige Rückfaltung der Proteine in eine native Form ist aber nur bedingt möglich. Dies verursacht häufig Probleme bei der Erkennung durch AK.

Für den Blot wurde eine PVDF-Membran und 2 Stücke Whatmanpapier auf die Größe einer shortplate zurechtgeschnitten. Die PVDF-Membran wurde für 2 Minuten in 60% Methanol aktiviert und dann in Transferpuffer überführt. Alternativ wurden zur direkten Verwendung präparierte Membranen von BioRad verwendet. Geblottet wurde für 30 Minuten bei 25 V in einem Trans-Blot Turbo Transfer System.

2.2.5.4 Immunofärbung des Western Blot

Proteine, die mittels Westernblot auf eine Membran übertragen wurden, lassen sich mittels Immunfärbung detektieren. Dabei bindet zunächst ein antigenspezifischer primärer Antikörper an ein Epitop des gesuchten Proteins. Der sekundäre Antikörper ist gegen Epitope im FC-Teil des primären Antikörpers gerichtet. Der sekundäre Antikörper ist meist mit einem Enzym, wie der Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert. Diese setzt Luminol in einer Chemolumineszenzreaktion um. Das entstehende Licht lässt sich dann mithilfe eines Kamerasystems detektieren. Um freie Bindungsstellen der Membran zu blockieren wurden diese durch Blocken in 5%-iger Milchpulver-PBS-Tween-Lösung oder 2%iger BSA-PBS-Tween-Lösung abgesättigt. Geblockt wurde für 1h. Der primäre Antikörper wurde in 1x Blockinglösung entsprechend verdünnt. Die Membran wurde in einem Falcon mit der Antikörperlösung inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht auf einem Rollschüttler. Am nächsten Morgen wurde die Antikörperlösung abgezogen. Die Membran wurde 3 x 10 Minuten in PBS-Tween gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären HRP (horse radish peroxidase) -gekoppelten Antikörper für 1h bei RT. Die Antikörperlösung wurde entfernt und die PVDF-Membran 3 x 10 Minuten in PBS-Tween gewaschen. Der Nachweis wurde mithilfe des Chemilumineszenzkits geführt. Dabei setzt die an den sekundären Antikörper gebundene HRP das Luminol oxidativ um, wobei Licht emittiert wird. Dieses lässt sich mit einer Kamera detektieren. Die Belichtungszeit betrug je nach Intensität des Lichtsignals zwischen 1 s und 6 Minuten.

3 Ergebnisse

3.1 Longitudinale Verhaltensanalyse bei C56BL6/JRj nach chronisch sozialem Stress (CSS)

Um die Auswirkungen von CSD auf das Sozialverhalten und die Kognition im Laufe der Zeit zu untersuchen, wurden verschiedene Gruppen von Testmäusen dem Paradigma des chronisch sozialen Stresses ausgesetzt (s. 2.2.4.1.1) und das Sozialverhalten in einem SI-Test (s. 2.2.4.2.1) entweder 24 h (T1) oder 7 Tage (T2) oder 21 Tage (T3) nach der Beendigung des Stressparadigmas analysiert. Zur Testung der Kognition wurden die Mäuse wie beschrieben in einem 24 h NORT (s. 2.2.4.4.1) getestet. Der 24 h NORT wurde jeweils an den Folgetagen nach Testung der sozialen Interaktion durchgeführt. Um Fehler, welche durch das erneute Testen entstehen zu vermeiden, wurden zunächst verschiedene Mausgruppen für die verschiedenen Zeitpunkte verwendet.

3.1.1 Verhaltensanalysen in C57BL/JRj zu unterschiedlichen Zeitpunkten

3.1.1.1 Sozialverhalten und Gedächtnisleistung 24 Stunden nach CSS

Der SI-Test (T1) ergab eine signifikante Abnahme der sozialen Interaktion mit dem Aggressor für die gestresste Gruppe (Abb. 3.1.1.1 a), die frühere Ergebnisse unterstützt (Berton et al. 2006; Krishnan et al., 2007; Buwalda et al., 2005; von Freijtag et al., 2000; Meerlo et al., 1996). Das Gruppenverhalten beim NORT zum ersten Zeitpunkt T1 zeigte hingegen keine kognitiven Abweichungen (Abb. 3.1.1.1 b).

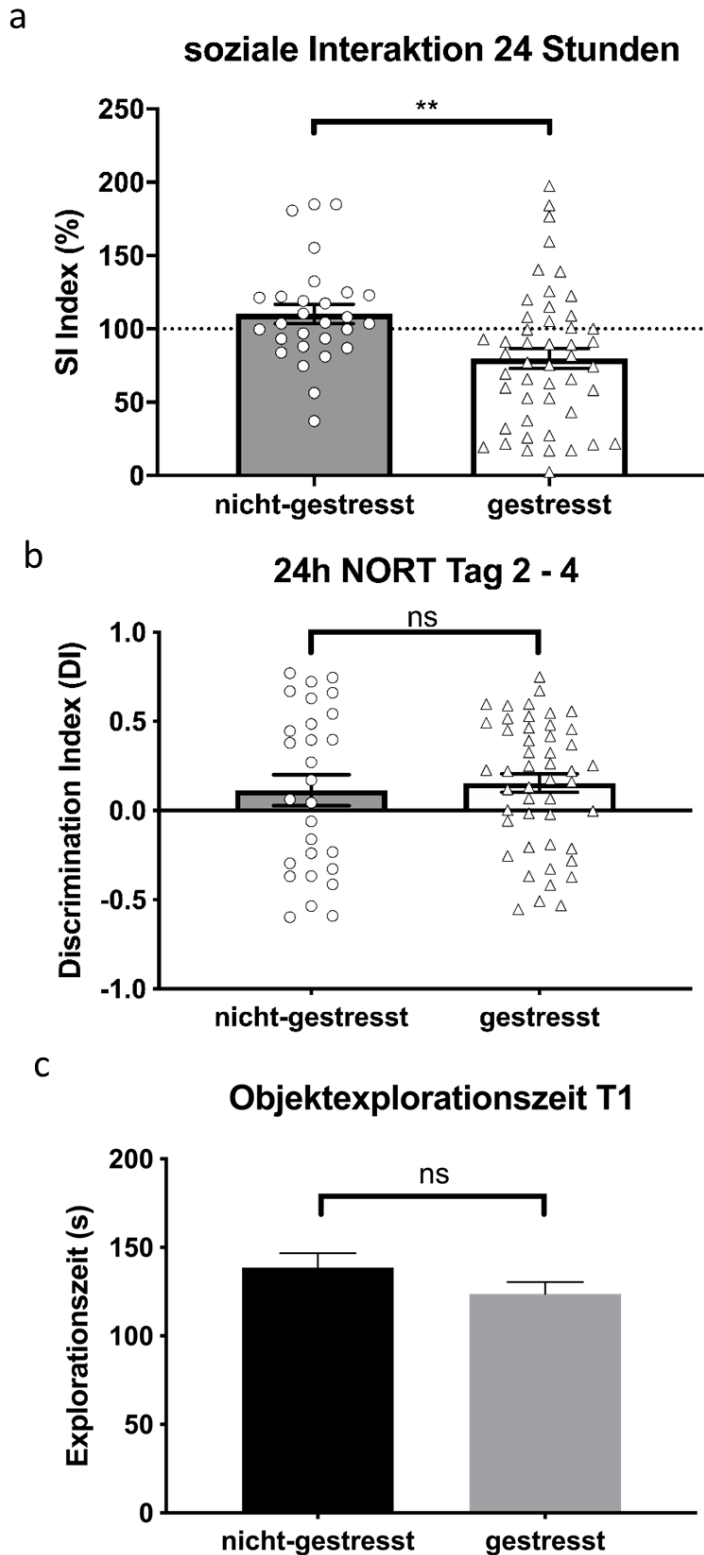


Abbildung 3.1.1.1: a Ergebnis der Untersuchung der sozialen Interaktion 24 Stunden nach Beendigung des Stressparadigmas. nicht-gestresst n = 28, gestresst n = 48. Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t Test mit Welch's correction bestimmt. Nicht-gestresst vs. gestresst p=0.0020 b Ergebnis der Untersuchung der Gedächtniskonsolidierung 2-4 Tage nach Beendigung des Stressparadigmas. nicht-gestresst n = 28, gestresst n = 48. Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t Test mit Welch's correction bestimmt. Nicht-gestresst vs. Gestresst p=0.6979; c Objektexplorationszeit T1 p = 0.1641, ungepaarter t-test mit Welch's correction * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p<0.001.

3.1.1.2 Sozialverhalten und Gedächtnisleistung 7 Tage nach CSS

Zum zweiten Zeitpunkt (T2) zeigten sowohl der SI-Test (Abb. 3.1.1.2 a), als auch auch der NORT (Abb. 3.1.1.2 b) signifikante Unterschiede zwischen gestressten und nicht-gestressten Kontrollmäusen auf. Die Explorationszeiten beim NORT waren dabei in beiden Gruppen ähnlich. Eine Reduzierung der Explorationszeit aufgrund einer, wie bei Tsai et al. vermuteten, verringerten Explorationsmotivation erklärt die Unterschiede somit nicht (Tsai et al., 2009).

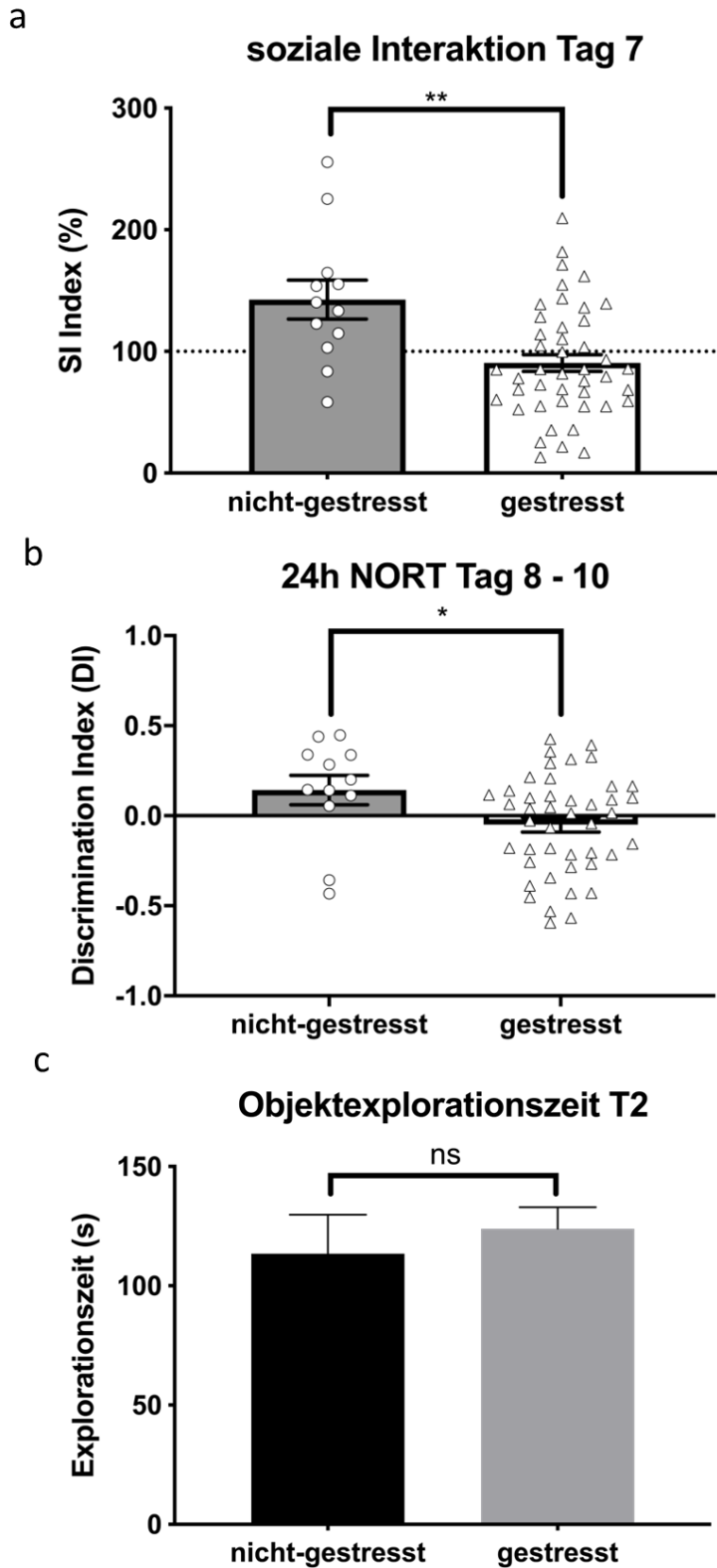


Abbildung 1.1.1.2: a Ergebnis der Untersuchung der sozialen Interaktion 7 Tage nach Beendigung des Stressparadigmas. nicht-gestresst n = 12, gestresst n = 44. Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t Test mit Welch's correction bestimmt. Nicht-gestresst vs. gestresst p=0.0089. **b Ergebnis der Untersuchung der Gedächtniskonsolidierung 8 -10 Tage nach Beendigung des Stressparadigmas.** nicht-gestresst n = 12, gestresst n = 44. Die Signifikanz wurde mit einem Mann-Whitney Test bestimmt. Nicht-gestresst vs. gestresst p=0.0197. **c Objektexplorationszeit T2** p = 0.5838, ungepaarter t-Test mit Welch's correction; * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p<0.001.

3.1.1.3 Sozialverhalten und Gedächtnisleistung 3 Wochen nach CSS

Zum dritten Zeitpunkt zeigte der SI Test eine leichte soziale Vermeidung der gestressten Mäuse im Vergleich zur nicht-gestressten Kontrollgruppe. Der Unterschied zwischen den Gruppen war jedoch nicht signifikant (Abb 3.1.1.3.1 a). Allerdings zeigte sich, dass die Kontrollgruppe im Vergleich zu den früheren Zeitpunkten tendenziell schwächer abschnitt. Dies lässt auf motivationale Unterschiede in dieser Gruppe, im Vergleich zu den Kontrollgruppen der anderen Zeitpunkte, hindeuten. Auch der NORT zeigte zum Zeitpunkt T3 keinen signifikanten Unterschied zwischen Stress- und Kontrollgruppe (Abb. 3.1.1.3 b). Dies deutet auf eine Erholung des stressinduzierten Phänotyps zwischen den Zeitpunkten T2 und T3 hin. Vergleicht man das Abschneiden der Stressgruppen in der sozialen Interaktion zu den drei unterschiedlichen Zeitpunkten T1 bis T3, zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 3.1.1.3.2 a). Dies zeigt eine Beeinträchtigung der sozialen Interaktion bei den gestressten Tieren zu allen untersuchten Zeitpunkten. Die relative Verteilung von Resilienten und Anfälligen zeigte, dass der Anteil an Resilienten zum Zeitpunkt T3 im Vergleich zu den anderen beiden Zeitpunkten leicht anstieg (Abb. 3.1.1.3.3). Der Anstieg war jedoch nicht signifikant. Der Vergleich des Abschneidens der Stressgruppen im NORT offenbarte einen signifikanten Unterschied der Verteilung des Zeitpunktes T2 sowohl zu der des Zeitpunktes T1 als auch der des Zeitpunktes T3 (Abb. 3.1.1.3.2 b). T2 zeigte dabei eine signifikante Reduzierung der kognitiven Fähigkeiten. Die signifikante Erhöhung zum Zeitpunkt T3 deutete auf eine Erholung hin.

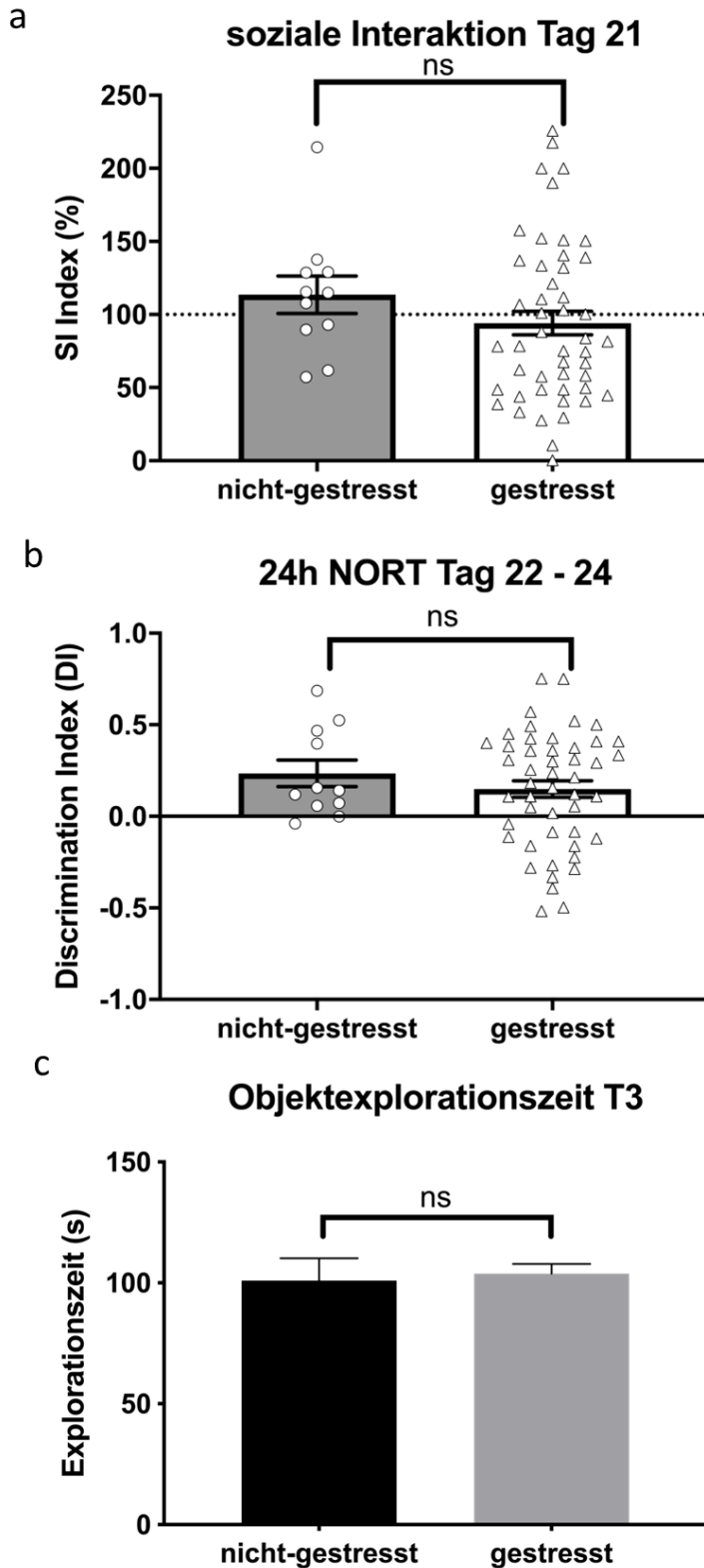


Abbildung 3.1.1.3.1: a Ergebnis der Untersuchung der sozialen Interaktion 21 Tage nach Beendigung des Stressparadigmas. nicht-gesresst n = 11, gestresst n = 44. Die Signifikanz wurde mit einem Mann Whitney Test bestimmt. Nicht-gesresst vs. gestresst p=0.2142 **b** Ergebnis der Untersuchung der Gedächtniskonsolidierung 22-24 Tage nach Beendigung des Stressparadigmas. nicht-gesresst n = 11, gestresst n = 44. Die Signifikanz wurde mit einem Mann-Whitney Test bestimmt. Nicht-gesresst vs. Gestresst p=0.4828; **c** Objektexplorationszeit T3 p = 0.7836, ungepaarter t-Test mit Welch's correction * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p<0.001

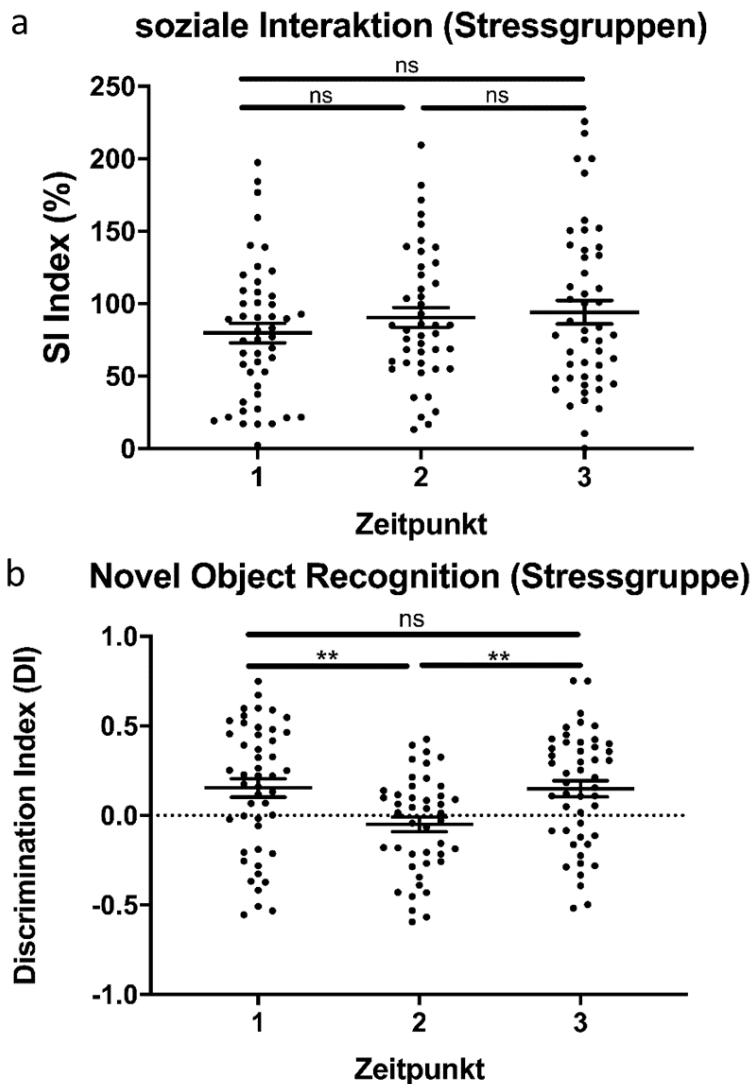


Abbildung 3.1.1.3.2: a Direkter Vergleich der SI Ergebnisse der gestressten Mäuse zu allen drei Zeitpunkten. SI Werte der gestressten Mäuse im direkten Vergleich zeigen keine signifikanten Unterschiede. Dies lässt auf ein konstantes Level an sozialer Vermeidung schließen (T1 vs.2 $p = 0.9217$, T1 vs. 3 $p = 0.4893$, T2 vs. T3 $p = >0.9999$, 1-way ANOVA mit Bonferroni post hoc Test) **b Direkter Vergleich der NORT Ergebnisse der gestressten Mäuse zu allen drei Zeitpunkten.** Die DI Werte von gestressten Mäusen im direkten Vergleich zeigten einen signifikanten Abfall kognitiver Fähigkeiten zum Zeitpunkt T2 und voller Rehabilitation zum Zeitpunkt T3 (T1 vs.2 $p = 0.0049$, T1 vs. 3 $p >0.9999$, T2 vs. T3 $p = 0.0083$, Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc test). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Ergebnisse

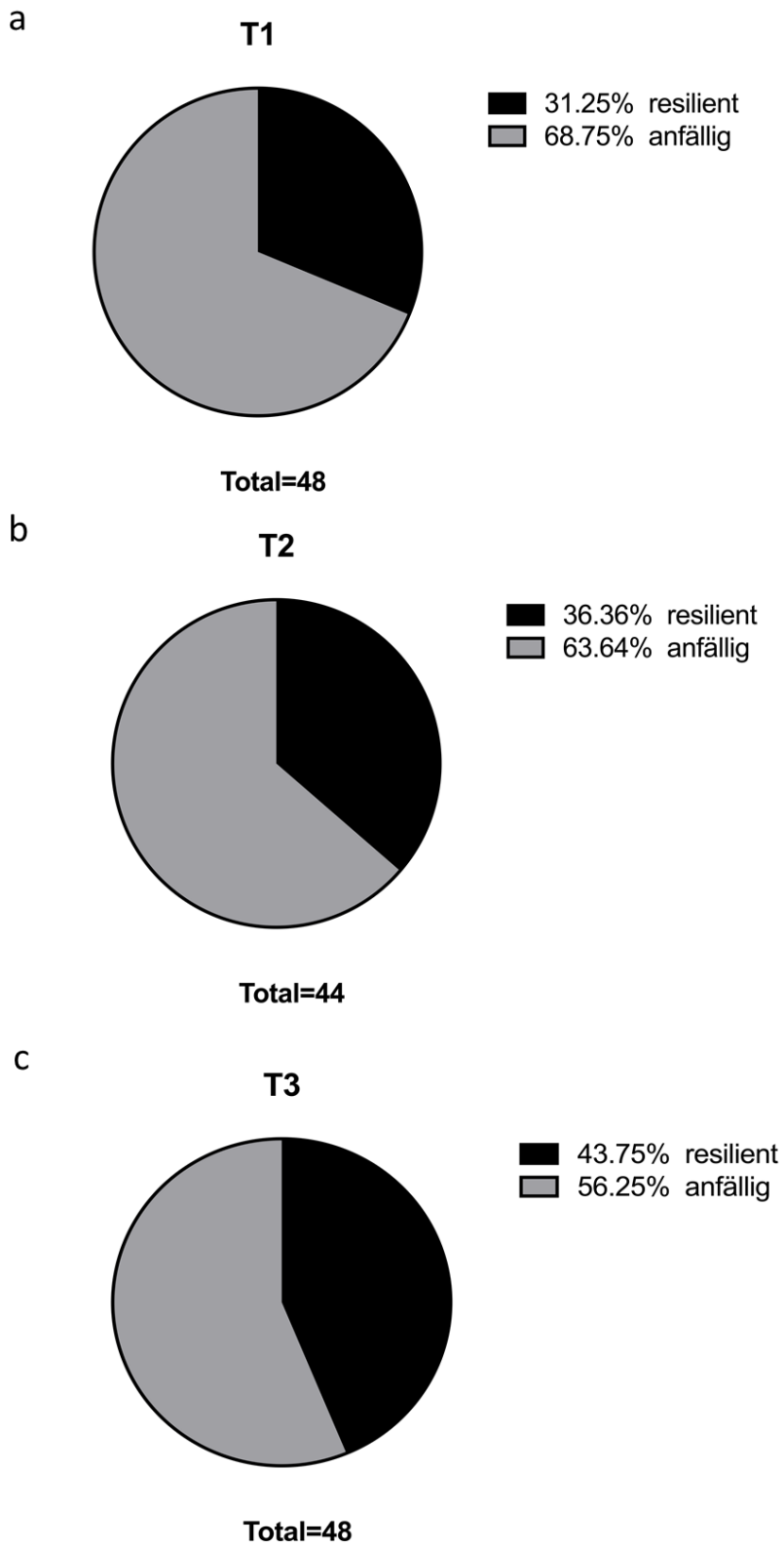


Abbildung 3.1.1.3.3: Relative Verteilung der Resilienten und der stressanfälligen Tiere innerhalb der Stressgruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten T1 (a), T2 (b) und T3 (c).

3.1.1.4 Korrelationsanalyse der Verhaltensdomänen Sozialverhalten und Gedächtnisleistung zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Beeinträchtigung des SI mit dem Abfall der Objekterkennung zum T2-Zeitpunkt korreliert. Dabei konnte für alle Tiere zusammengenommen, keine signifikante Gesamtkorrelation zwischen den beiden Verhaltensdomänen beobachtet werden (s. Abb. 3.1.1.4). Darüber hinaus zeigte auch die Berechnung von Pearson r sowohl für Kontroll- als auch gestresste Tiere getrennt keinen signifikanten Zusammenhang zwischen SI- und DI-Scores. Dies war auch zu den anderen Zeitpunkten der Fall (s. Abb. 6.1.1 im Anhang).

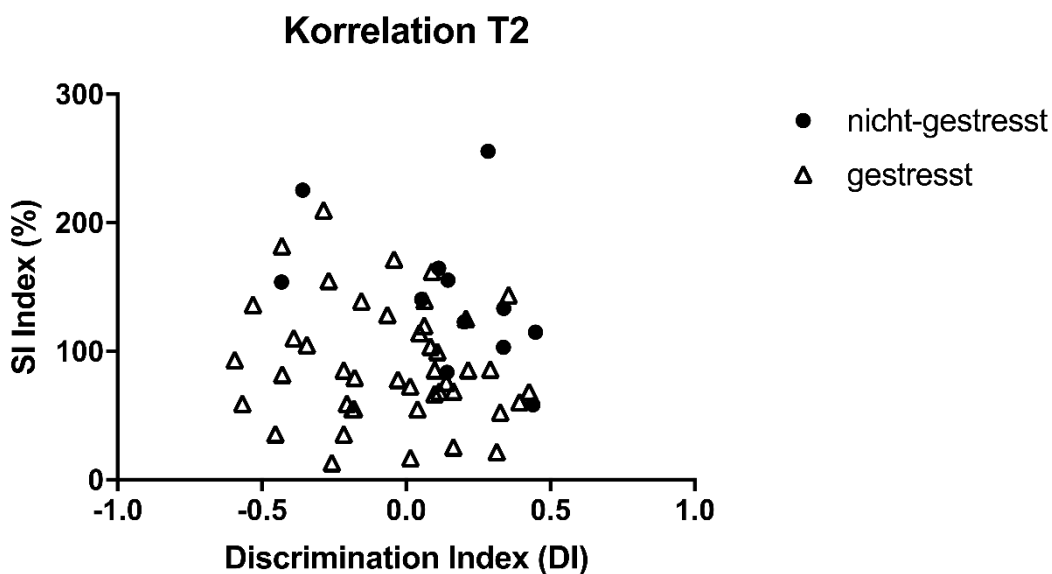


Abbildung 3.1.1.4: Korrelationsanalyse der Verhaltensdomänen Sozialverhalten und Gedächtnisleistung zum Zeitpunkt T2. nicht-gestresst $r = -0.4457$ $p = 0.1464$, gestresst $r = -0.1546$ $p = 0.3163$, Pearson r

3.1.2 Individuelle Verhaltensanalyse von C57BL6/JRj Mäusen bei wiederholter Testung zu verschiedenen Zeitpunkten nach CSS

3.1.2.1 Individuelle Analyse des Sozialverhaltens

Es konnte gezeigt werden, dass die Beeinträchtigung der sozialen Interaktion in verschiedenen Mausgruppen 1 Tag, 7 Tage und 3 Wochen nach Beendigung der Stressprozedur zu finden war. Im nächsten Schritt sollte nun untersucht werden wie sich dieses Verhalten in einzelnen Tieren über die Zeit hinweg entwickelt. Hierfür wurde eine Gruppe von Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten wiederholt sowohl im SI als auch im NORT getestet. Die Tiere wurden 7 Tage (T2), 21 Tage (T3) und 42 Tage (T4) nach Beendigung der Stressprozedur getestet. Das wiederholte Testen erlaubte uns nicht nur die Verhaltensverläufe

einzelner Tiere nachzuverfolgen, sondern auch Variabilität zwischen den einzelnen Individuen statistisch zu modellieren und Effekte durch den Vergleich unterschiedlicher Mausgruppen auszuschließen. Die Ergebnisse zeigten, dass das wiederholte Testen das Interesse der Mäuse an der Interaktion mit der CD-1 Maus reduzierte (Abb. 3.1.2.1 a). Dieser Effekt war sowohl für nicht-gestresste Kontrolltiere als auch für gestresste Tiere zu sehen. In der Literatur wurde für verschiedene Tests bereits gezeigt, dass insbesondere Mäuse des Stammes C57BL/6J ein verändertes Verhalten im Test zeigen, abhängig davon ob sie naiv für diesen sind oder ihn zuvor schon im selben Test getestet wurden. Die Erfahrungen, welche die Tiere in den Tests machen, haben substantielle Auswirkungen auf das Verhalten. Dies zeigt sich vor allem durch die Reduzierung der explorativen Aktivität. Diese bereits gesammelten Erfahrungen sollten bei der Beurteilung nachfolgender Tests immer beachtet werden (Vöikar et al., 2004). Im Hinblick auf die longitudinalen Änderungen der SI-Scores in gestressten und nicht gestressten Tieren zeigte sich sowohl bei den nicht-gestressten als auch den gestressten Tieren ein Abfall im Abschneiden zum Zeitpunkt T3 im Vergleich zu T2 (Abb. 3.1.2.1 a und b). Für die Kontrollgruppe zeigte sich dieser Effekt auch zu Zeitpunkt T4 im Vergleich mit T2. Interessanterweise ergab die Auswertung der Daten der gestressten Gruppe zum Zeitpunkt T4 eine leichte Erholung (Abb. 3.1.2.1 b). Dies führte zu einer Extinktion des signifikanten Unterschiedes zwischen nicht-gestresster Gruppe und gestresster Gruppe, welcher zu den Zeitpunkten T2 und T3 beobachtet werden konnte. Die longitudinalen Verläufe aller gestressten Tiere waren ziemlich instabil und heterogen. Um einen genaueren Blick auf das individuelle Verhalten zu werfen, wurden die fünf Tiere mit den höchsten Werten und die fünf Tiere mit den niedrigsten Werten im SI Test zum Zeitpunkt T2 ausgewählt und diese weiter untersucht (Abb. 3.1.2.2). Für sie wurde das Abschneiden zu den einzelnen Zeitpunkten in Graphen dargestellt. Die Werte bei drei der zum Zeitpunkt T2 fünf Besten waren zum Zeitpunkt T4 unter 100 (3.1.2.2. a). Zwei der Tiere (6446, 6483) wiesen weiterhin einen ähnlich guten, wenn nicht sogar besseren Wert auf (6446). Alle Tiere wiesen niedrigere Werte zum Zeitpunkt T3 im Vergleich zu T2 auf. Bei Dreien kam es dann noch einmal zu einem weiteren Abfall zum Zeitpunkt T4 (6475, 6476, 6482). Im Gegensatz dazu zeigten von den fünf Schlechtesten alle, abgesehen von Tier 6455, eine Verbesserung des SI-Wertes vom Zeitpunkt T2 bis zum Zeitpunkt T4 (Abb.3.1.2.2 b). Zwei (Tiere 6459 und 6485) von fünf Tieren erreichten sogar einen Wert über 100 zum Zeitpunkt T4. Die Werte der anderen Tiere blieben unter 100 und wiesen damit auf ein immer noch beeinträchtigtes Verhalten hin. In Übereinstimmung mit der Literatur wurden Tiere mit Werten über 100 als Resiliente klassifiziert (Chaudhury et al. 2013). Drei der Tiere (6455, 6485, 6488) mit SI Werten über 100 erreichten zunächst jeweils die höchsten Werte zum Zeitpunkt T2, bevor es zum Zeitpunkt T4 wieder zu einer Abnahme kam.

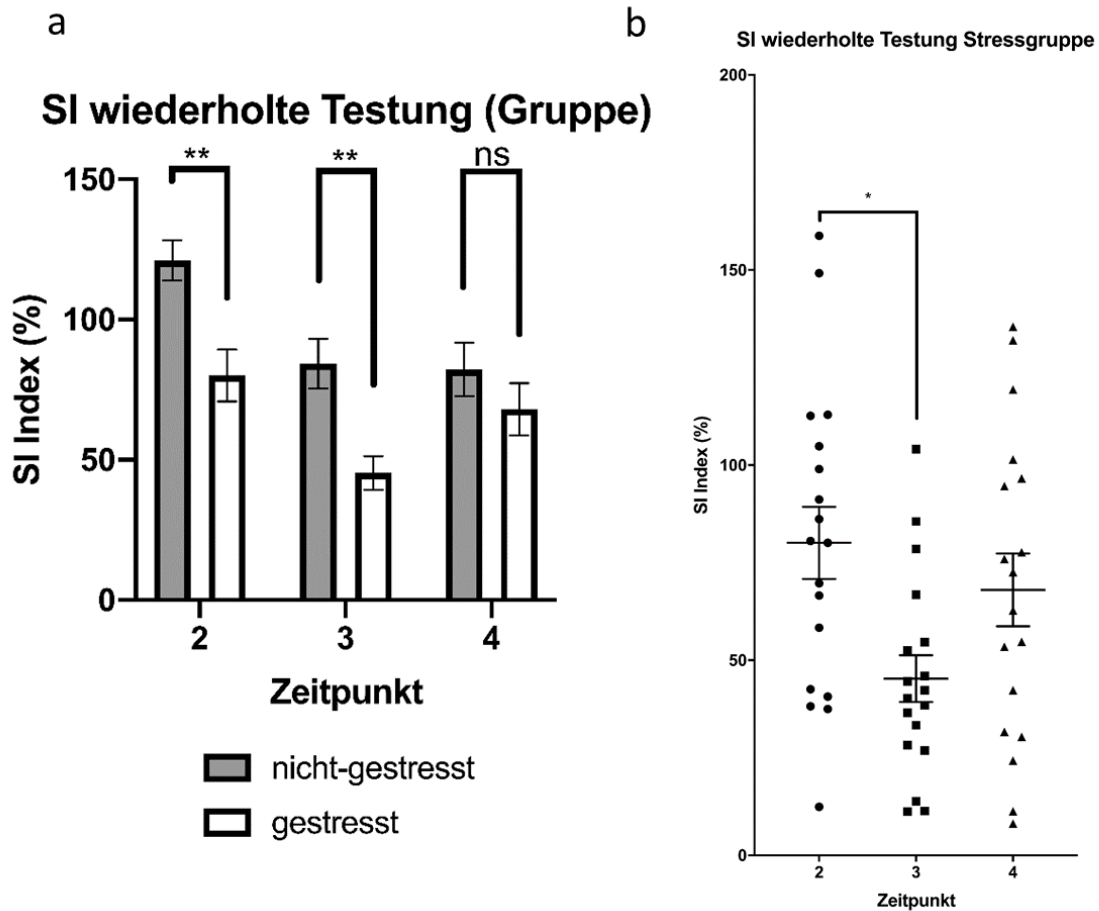


Abbildung 3.1.2.1.1: a Wiederholte Testung des Sozialverhaltens zu den Zeitpunkten T2-T4 von nicht-gestressten und gestressten Tieren T2 $p = 0.0026$, T3 $p = 0.0045$, T4 $p = 0.7145$, 2-way repeated measures ANOVA und Bonferroni's post hoc test. Die SI-Indizes der Kontrolltiere nahmen zu den Zeitpunkten T3 und T4 im Vergleich zu T2 signifikant ab (T2 vs T3 $p = 0.008$, T2 vs. T4 $p = 0.005$, T3 vs. T4 $p > 0.999$, 2-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test). **b** Gruppendynamik des Sozialverhaltens in gestressten Tieren zu den drei Zeitpunkten T2 bis T4. Die SI-Werte waren zum Zeitpunkt T3 signifikant niedriger als zum Zeitpunkt T2 und erholten sich zum Zeitpunkt T4 (T2 vs. T3 $p = 0.017$, T2 vs. T4 $p = 0.977$, T3 vs. T4 $p = 0.197$, 2-way repeated measures ANOVA gefolgt von einem Bonferroni's post-hoc test). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

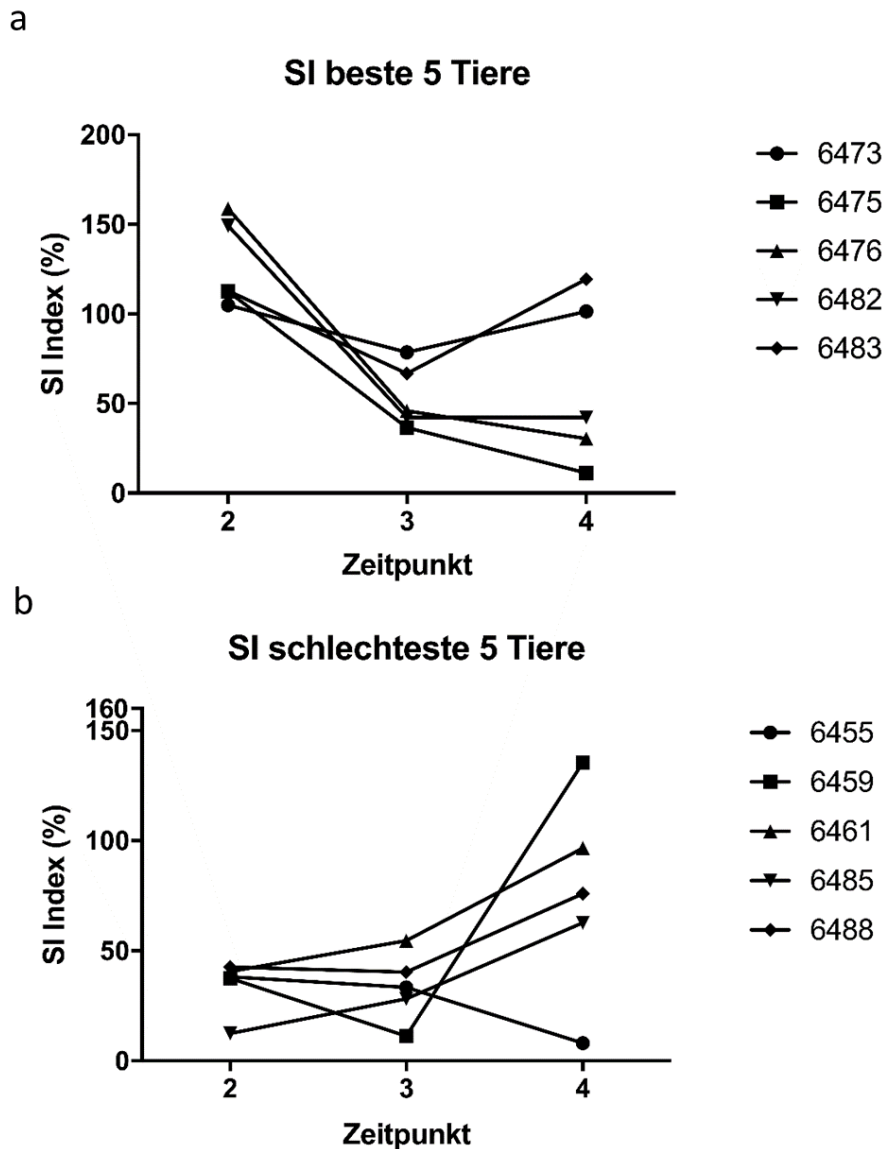


Abbildung 3.1.2.1.2: a Longitudinale Verlaufskurven von 5 gestressten Tiere, mit dem besten Abschneiden zum Zeitpunkt T2, zu den Zeitpunkten T2-T4. b Longitudinale Verlaufskurven von 5 gestressten Tiere, mit dem schlechtesten Abschneiden zum Zeitpunkt T2, zu den Zeitpunkten T2-T4.

3.1.2.2 Individuelle Analyse der Gedächtnisleistung

Der NOR Test mit 24 Stunden zwischen Trainings- und Testphase wurde mit denselben Tieren im Anschluss an den SI Test zu den Zeitpunkten T2 bis T4 durchgeführt. Die Ergebnisse bestätigten die vorherigen Resultate, dass das Abschneiden im kognitiven Test zum Zeitpunkt T2 in den gestressten Tieren schlecht war (Abbildung 3.1.2.2.1). Drei Wochen nach Beendigung des Stressparadigmas zeigte sich ein Erholungseffekt. Zum Zeitpunkt T4 fielen die Werte wieder ab. Allerdings waren die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten nicht signifikant. Diese Veränderungen könnten durch einen signifikanten Abfall im Explorationsverhalten zum Zeitpunkt T4 im Vergleich zu T2 begründet sein (Abb. 3.1.2.2.2). Nichtsdestotrotz war der Unterschied in den DI-Werten zwischen den einzelnen Zeitpunkten

selbst nach Berücksichtigung des Effekts der unterschiedlichen Explorationszeiten in einer Kovarianzanalyse nicht signifikant. Betrachtet man das Abschneiden einzelner Tiere zeigte sich ein ähnliches Bild. Auch hier wurden wieder die fünf Tiere mit dem besten und die fünf Tiere mit dem schlechtesten Abschneiden zum Zeitpunkt T2 ausgewählt und deren Entwicklung weiter verfolgt. Die kognitive Leistungsfähigkeit zwischen den Zeitpunkten T2 und T3 war bei allen Tieren stark verändert. In der Gruppe der Tiere mit dem schlechtesten Abschneiden verbesserten sich vom Zeitpunkt T2 zu T3 hin vier von fünf (Abbildung 3.1.2.2.3 a). Zwei der Tiere (6455 und 6460) schnitten zum Zeitpunkt T4 wieder schlechter ab. Die anderen Drei zeigten im Vergleich zum ersten Zeitpunkt immer noch eine bessere kognitive Leistung. Eines der Tiere (6475) wies zu allen drei Zeitpunkten eine schlechte kognitive Leistung auf. Ein Weiteres zeigte von Zeitpunkt T2 zu T3 hin eine Verbesserung und darauffolgend wieder einen Abfall zu T4 hin.

Zwei der Tiere (6452, 6490) mit dem besten Abschneiden zum Zeitpunkt T2 konnten ihr Abschneiden zu T3 steigern, um dann zu T4 wieder abzufallen (Abbildung 3.1.2.2.3 b). Die anderen Drei zeigten zum Zeitpunkt T3 einen Abfall in der Leistungsfähigkeit, um sich dann zu T4 hin wieder zu verbessern. Insgesamt schnitten drei der Mäuse zum letzten Zeitpunkt schlechter als zum ersten ab. Trotzdem war ihr Abschneiden auch zum Zeitpunkt T4 überdurchschnittlich.

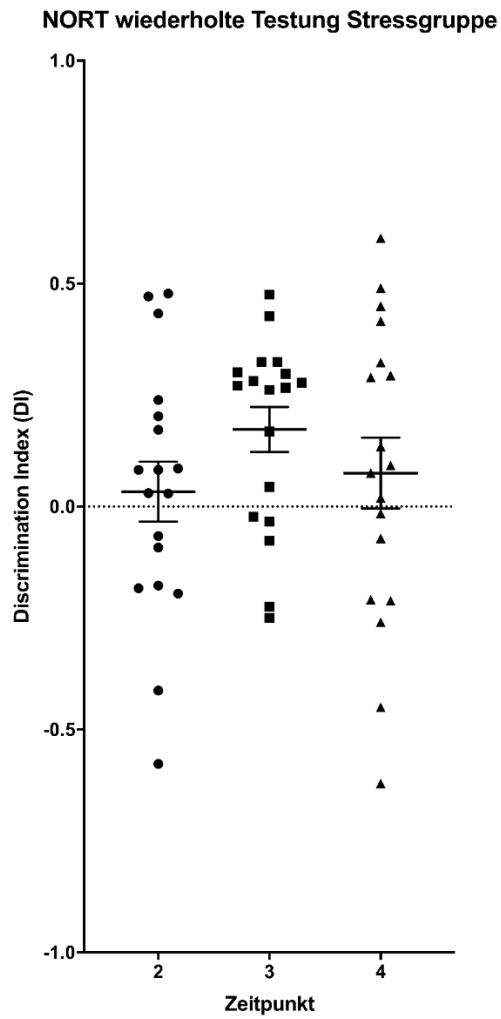


Abbildung 3.1.2.2.1: Longitudinale Entwicklung der Objektkognition nach chronisch sozialem Stress. Gruppendynamik der Objektkognition innerhalb der Stressgruppe zu den drei verschiedenen Zeitpunkten T2,T3 und T4. Die DI Werte waren zu den Zeitpunkten T2 und T4 niedrig und zeigten eine Verbesserung der kognitiven Leistung zum Zeitpunkt T3 nach Stressexposition. T2 vs. T3 $p = 0.6162$, T2 vs. T4 $p > 0.9999$, T3 vs. T4 $p > 0.9999$, ANOVA und Bonferroni's post hoc test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

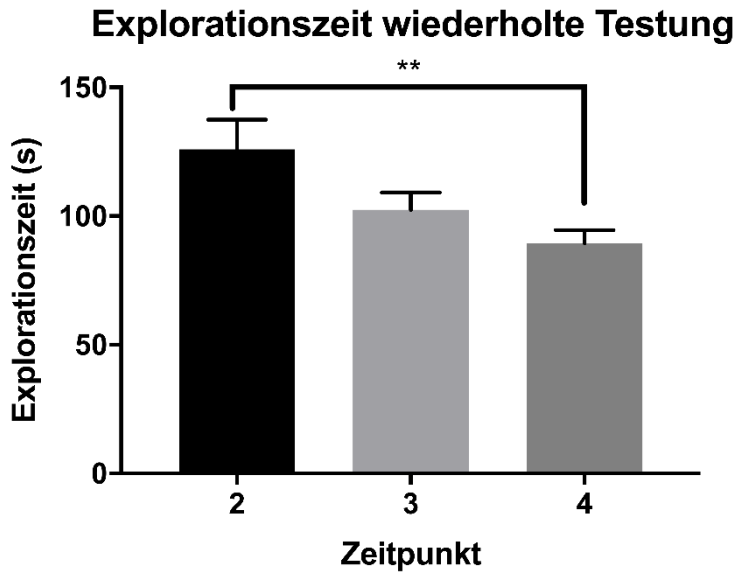


Abbildung 3.1.2.2.2: Explorationszeit für die Zeitpunkte bei wiederholter Testung der Tiere T2: 8–10 Tage nach Stressexposition. T3: 22–24 Tage nach Stressexposition. T4: 43–45 Tage nach Stressexposition (T2 vs. T3 $p = 0.0551$, T2 vs. T4 $p = 0.0071$, T3 vs. T4 $p > 0.9999$, ANOVA und Bonferroni's multiple comparisons test)

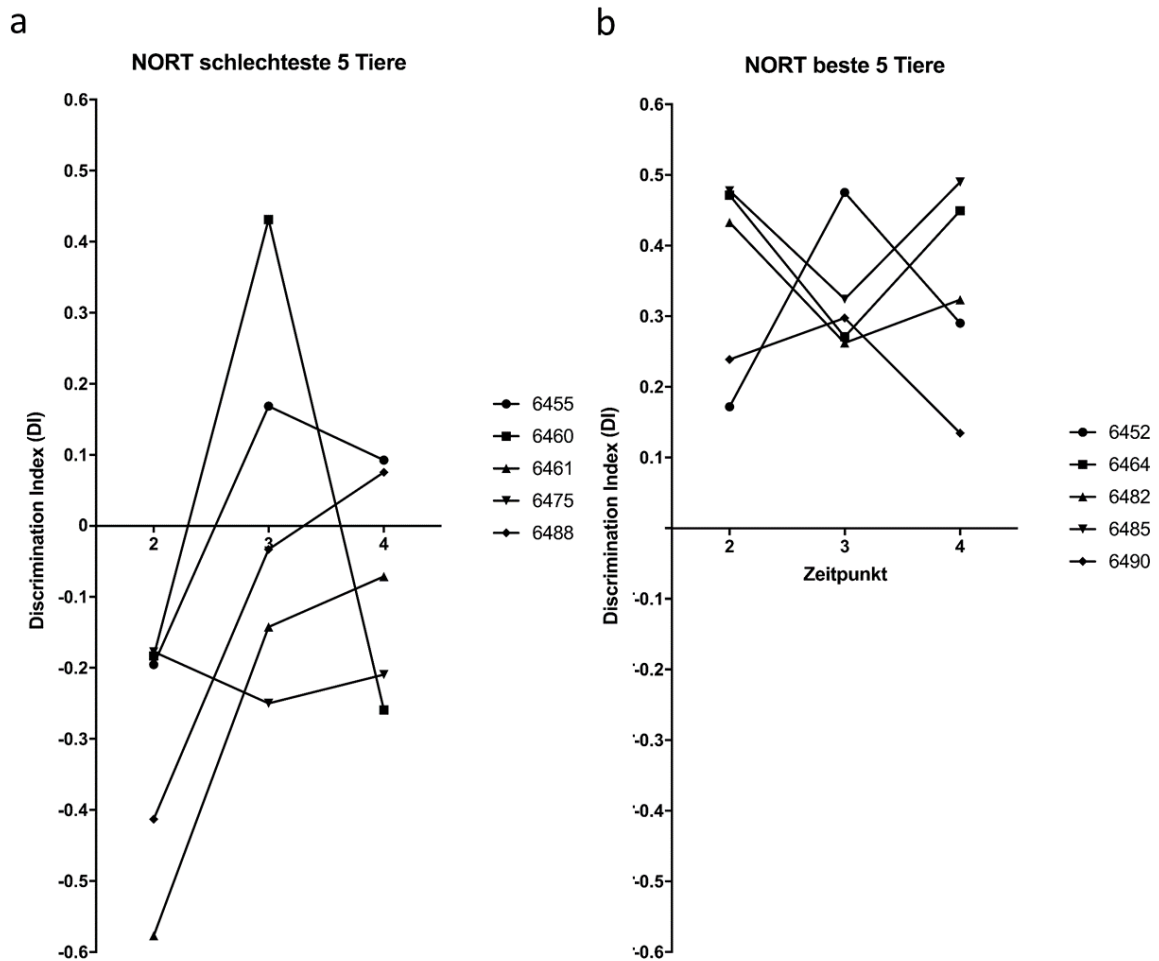


Abbildung 3.1.2.2.3: Longitudinale Entwicklung des Objekterkennungsverhaltens nach Stressexposition. a Longitudinale Verlaufsbahnen von gestressten Tieren zu den Zeitpunkten T2-T4 der 5 Tiere welche zum Zeitpunkt T2 am schlechtesten

abschnitten. **b** Longitudinale Verlaufsbahnen von gestressten Tieren zu den Zeitpunkten T2-T4 der 5 Tiere welche zum Zeitpunkt T2 am besten abschnitten.

3.1.3 Expressionsstudien von aktivitätsabhängigen Genen in gedächtnis-konsolidierenden Gehirnregionen bei drei Monate alten C57BL/6JRj Mäusen

3.1.3.1 Gewichtsanalyse bei C57BL/6JRj Mäusen während des chronisch sozialen Stresses

IEGs sind zelluläre Marker die Neurone identifizieren, welche durch ein spezifisches Verhalten aktiviert wurden (Guzowski et al., 2001; Kubik et al., 2007). Sie können schnell und vorübergehend auf verschiedene Stimuli innerhalb von Zellen reagieren können (Gallo et al., 2016). In der vorliegenden Doktorarbeit wurden die aktivitätsabhängigen Gene *c-Fos*, *Zif268* und *Arc* untersucht, um die neuronale Plastizität von drei Monate alten C57BL/6JRj Mäusen zu charakterisieren, welche chronisch sozialem Stress ausgesetzt waren oder ungestresst verblieben. Hierfür wurden Mäuse zunächst einem Chronic Social Defeat Paradigma unterzogen (s. 2.2.4.1.1). Es ist bekannt, dass mTOR die Reaktionen von Zellen auf die Energieverfügbarkeit koordiniert, indem sie anabole und katabole molekulare Wege als Reaktion auf verschiedene Stimuli verstärkt oder unterdrückt (Sangüesa et al., 2019). Verschiedene Studien konnten zudem zeigen, dass Stress Metabolismus beeinflusst. Wiederholte Exposition gegenüber psychogenen Stressoren, insbesondere sozialen Stressoren, führte zu einer Zunahme des Körpergewichts, der Adipositas und des Verzehrs von kalorienreichen Mahlzeiten bei einer Reihe von Spezies, einschließlich nichtmenschlicher und menschlicher Primaten (Patterson und Abizad, 2013). Daher wurde auch in dieser Arbeit die Entwicklung des Körpergewichtes während der Stressprozedur untersucht. Das Gewicht der Mäuse wurde an jedem Tag des Paradigmas bestimmt. In Übereinstimmung mit der aktuellen Literatur zeigte sich, dass die gestressten C57BL/6J Mäuse eine höhere Gewichtszunahme und somit ein höheres Durchschnittsgewicht aufwiesen (Laine et al., 2018). Betrachtete man die absoluten Werte zeigten sich aufgrund der höheren Standardabweichung keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.1.3.1 a) Betrachtete man jedoch die relative Änderung des Gewichtes bzw. die Änderungen des absoluten Gewichtes zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen an Tag 10 (Abb. 3.1.3.1 b,c).

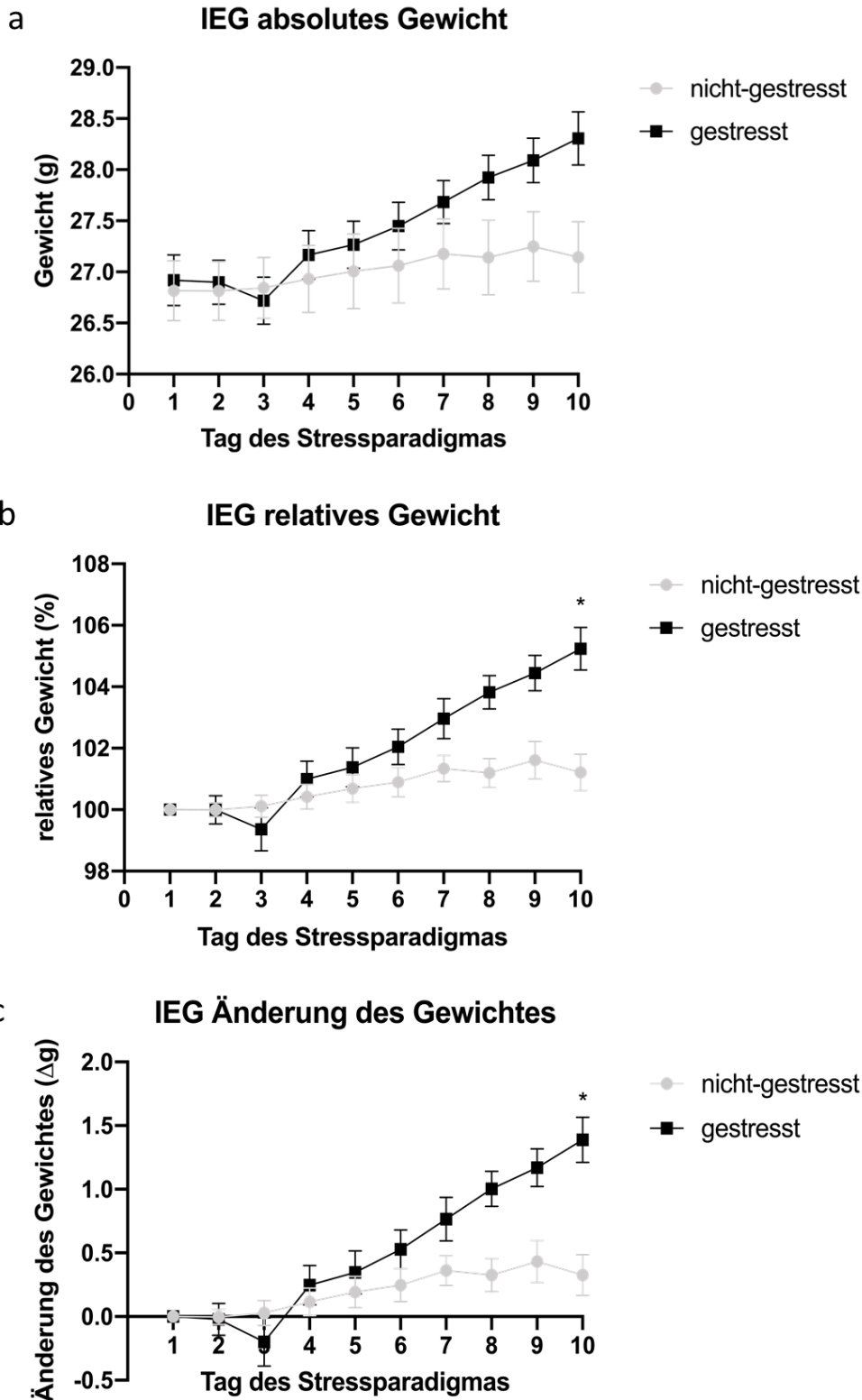


Abbildung 3.1.3.1: Analyse der Gewichtsentwicklung von ungestressten und gestressten Mäusen während des Stressparadigmas für die spätere IEG Analyse. **a absolutes Gewicht:** Tag 1: $p=0.988825$, Tag 2: $p=0.988825$, Tag 3: $p=0.988825$, Tag 4: $p=0.985090$, Tag 5: $p=0.985090$, Tag 6: $p=0.952360$, Tag 7: $p=0.832688$, Tag 8: $p=0.467665$, Tag 9: $p=0.386232$, Tag 10: $p=0.197014$; multiple t-Tests **b relatives Gewicht:** Tag 2: $p=0.999203$, Tag 3: $p=0.956497$, Tag 4: $p=0.956497$, Tag 5: $p=0.956497$, Tag 6: $p=0.793198$, Tag 7: $p=0.654418$, Tag 8: $p=0.072998$, Tag 9: $p=0.072998$, Tag 10: $p=0.019520$; multiple t-Tests **c Änderung des Gewichtes:** Tag 2: $p=0.939407$, Tag 3: $p=0.936593$, Tag 4: $p=0.939407$, Tag 5: $p=0.939407$, Tag 6: $p=0.838081$, Tag 7: $p=0.710953$, Tag 8: $p=0.068991$, Tag 9: $p=0.068991$, Tag 10: $p=0.015624$; multiple t-Tests. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

3.1.3.2 Sozialverhalten nach chronisch sozialem Stress und Selektion der anfälligen und resilienten Mäuse

Sieben Tage nach Beendigung des Stressparadigmas wurden die Mäuse in der sozialen Interaktion getestet und Tiere für die Untersuchung der IEGs ausgewählt (Abb. 3.1.3.2). Wie zuvor beschrieben wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der gestressten und der nicht-gestressten Mäuse beobachtet.

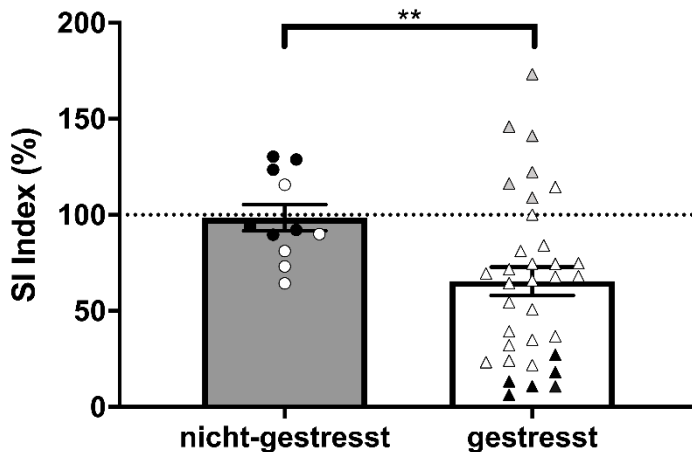


Abbildung 3.1.3.2: Ergebnis der sozialen Interaktion der für das IEG Experiment verwendeten Mäuse. nicht-gestresst n = 11, gestresst = 34, Welsh Test nicht-gestresst vs. gestresst p=0.0025. Für die weitere Analyse wurden je sechs Individuen für die Gruppen Kontrollen (schwarze Punkte), Resiliente (graue Dreiecke) und Anfällige (schwarze Dreiecke) ausgewählt. * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p<0.001

3.1.3.3 qPCR-Ergebnisse

Für die weitere Analyse wurden je sechs Individuen für die Gruppen nicht-gestresste Kontrollen, Resiliente und Anfällige ausgewählt (s. Abb. 3.1.3.2). Hierbei wurden Tiere aus beiden Versuchsdurchläufen (batches) ausgewählt. Dabei handelte es sich in der Gruppe der Resilienten jeweils um die drei Tiere mit den höchsten SI Indices in ihrem Versuchsdurchlauf (batch). In der Gruppe der Anfälligen handelte es sich jeweils um die drei Tiere mit den niedrigsten SI Indices in ihrem Versuchsdurchlauf (batch). Die Gehirne der ausgewählten Tiere wurden 30 Minuten nach Beendigung des Verhaltenstests entnommen und schockgefroren. Im Anschluss wurden die Gehirne an einem Kryostaten geschnitten und die zu untersuchenden Gehirnregionen PFC, N. accumbens und Hippocampus präpariert (s. 2.2.3.1). Desweiteren wurde aus allen Gehirnregionen die RNA isoliert (s. 2.2.2.1.1) und in cDNA transkribiert (s. 2.2.2.1.2). Diese wurde dann in einer RT-qPCR verwendet (2.2.2.3). Die Ergebnisse der RT-qPCR aller analysierten Gehirnregionen zeigten für keines der drei untersuchten IEGs signifikante Unterschiede.

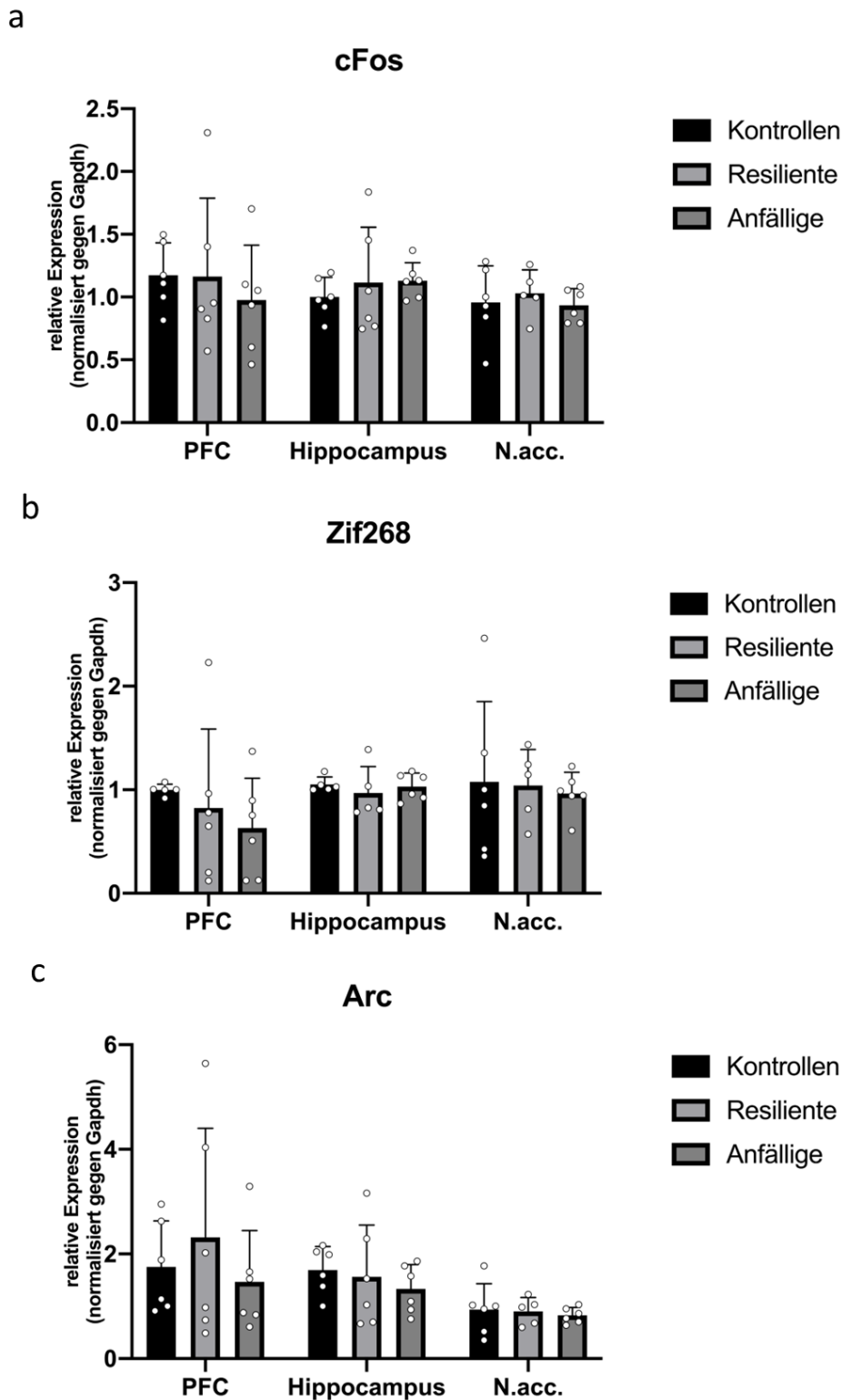


Abbildung 2: Ergebnisse der qPCR der IEG Analyse für a cFos PFC Kontrollen vs Resiliente $p > 0.9999$, PFC Kontrollen vs Anfällige $p = 0.7270$, PFC Resiliente vs Anfällige $p = 0.9083$, Hippocampus Kontrollen vs Resiliente $p = 0.9067$, Hippocampus Kontrollen vs Anfällige $p = 0.4037$, Hippocampus Resiliente vs Anfällige $p = 0.9997$, N.acc. Kontrollen vs Resiliente $p = 0.9472$, N.acc. Kontrollen vs Anfällige $p = 0.9975$, N.acc. Resiliente vs Anfällige $p = 0.7431$ **b Zif268** PFC Kontrollen vs Resiliente $p = 0.9187$, PFC Kontrollen vs Anfällige $p = 0.2872$, PFC Resiliente vs Anfällige $p = 0.9329$, Hippocampus Kontrollen vs Resiliente $p = 0.8606$, Hippocampus Kontrollen vs Anfällige $p = 0.9795$, Hippocampus Resiliente vs Anfällige $p = 0.9436$, N.acc. Kontrollen

Ergebnisse

vs Resiliente $p = 0.9995$, N.acc. Kontrollen vs Anfällige $p = 0.9795$, N.acc. Resiliente vs Anfällige $p = 0.9581$ **c Arc** PFC Kontrollen vs Resiliente $p = 0.9005$, PFC Kontrollen vs Anfällige $p = 0.9305$, PFC Resiliente vs Anfällige $p = 0.7505$, Hippocampus Kontrollen vs Resiliente $p = 0.9864$, Hippocampus Kontrollen vs Anfällige $p = 0.4678$, Hippocampus Resiliente vs Anfällige $p = 0.9367$, N.acc. Kontrollen vs Resiliente $p = 0.9986$, N.acc. Kontrollen vs Anfällige $p = 0.9332$, N.acc. Resiliente vs Anfällige $p = 0.9054$ Brown-Forsythe und Welch ANOVA mit Dunnet's Test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

3.1.4 Molekulare Analyse von Proteinen der mTOR-Signalkaskade in verschiedenen Hirnregionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach CSS

3.1.4.1 24 Stunden nach CSDS

In dieser Arbeit sollte neben der in 3.1.1 gezeigten longitudinalen Entwicklung des Sozialverhaltens und der kognitiven Fähigkeiten auch die mTOR Aktivität im zeitlichen Verlauf analysiert werden. Hierfür wurden nach Abschluss der Verhaltensexperimente die Gehirne der Mäuse schockgefroren. Basierend auf den Ergebnissen des SI Tests wurden Tiere aus den Gruppen Kontrollen, Resiliente und anfällige ausgewählt und von ihnen an einem Kryostaten die Gehirnregionen präfrontaler Cortex, Hippocampus, Nucleus accumbens und das Ventrale Tegmentale Areal isoliert (s. 2.2.3.1). Aus den Geweben der Gehirnregionen wurden Proteinlysate (s. 2.2.5.1) gewonnen und diese für eine SDS-PAGE (s. 2.2.5.2) mit anschließendem Western Blot (s. 2.2.5.3) verwendet. Im Western Blot wurden für Akt, p70-S6 Kinase sowie S6, als an der mTOR-Signalkaskade beteiligte Proteine der Phosphorylierungsstatus und die absolute Proteinmenge zwischen den drei Gruppen verglichen.

Für den ersten Zeitpunkt ergab die Analyse keine signifikanten Unterschiede für den präfrontalen Cortex (Abb. 3.1.4.1 a). Phospho-S6 und phospho-Akt waren in der Gruppe der Anfälligen tendenziell höher, dies war aber nicht statistisch signifikant. Auch für den Hippocampus zeigten sich für diesen Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 3.1.4.1 b). Für den Nucleus accumbens wurden nur S6 und Akt analysiert (Abb. 3.1.4.1 c). Hier zeigte sich eine signifikant höhere Menge an phosphoryliertem S6 in der Anfälligen Gruppe sowohl im Vergleich mit der Kontrollgruppe, als auch den resilienten Tieren. Die Gesamtmenge an S6 war zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Das Verhältnis von phospho-S6 zu S6 ($pS6/S6$) war für die anfällige Gruppe im Vergleich mit den resilienten Tieren ebenfalls signifikant erhöht. Im Vergleich mit den Kontrollen war das Verhältnis von phospho-S6 zu S6 bei den suszeptiblen Tieren auch tendenziell, aber nicht signifikant, höher. Das Verhältnis von phospho-Akt zu Akt ($pAkt/Akt$) war bei den suszeptiblen im Vergleich zu den resilienten Tieren ebenfalls signifikant erhöht. Der Vergleich von Kontrollen und anfälligen Tieren zeigte einen p-Wert an der Signifikanzgrenze. Bei der Analyse des Ventralen Tegmentalen Areals war der Unterschied in der Gesamtmenge von S6 zwischen

Ergebnisse

resilienten und anfälligen Tieren nahe der Signifikanzgrenze (Abb. 3.1.4.1.d). Das Verhältnis von phospho-Akt zu Akt war bei den Resilienten signifikant höher als bei den anfälligen Tieren.

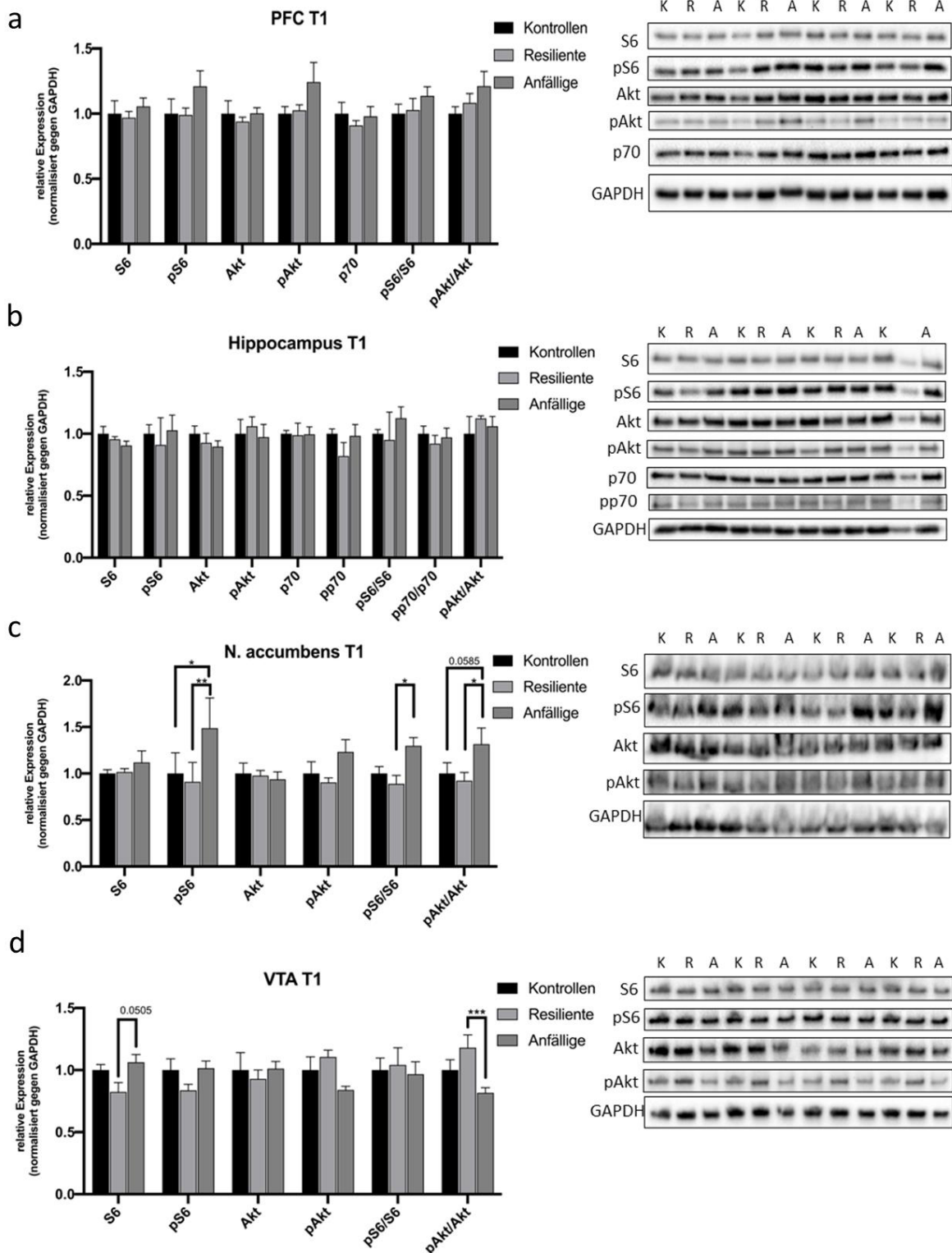


Abbildung 3.1.4.1: Westernblotergebnisse für den ersten Zeitpunkt a PFC Kontrollen n = 4, Resiliente n = 4, Anfällige n = 4; S6: Kontrollen vs Resiliente $p = 0.9560$, Kontrollen vs Anfällige $p = 0.8621$, Resiliente vs Anfällige $p = 0.7011$; pS6: Kontrollen vs Resiliente $p = 0.9964$, Kontrollen vs Anfällige $p = 0.1444$, Resiliente vs Anfällige $p = 0.1229$; Akt: Kontrollen vs Resiliente $p = 0.8319$, Kontrollen vs Anfällige $p = 0.9994$, Resiliente vs Anfällige $p = 0.8140$; pAkt: Kontrollen vs Resiliente $p =$

Ergebnisse

0.9727, Kontrollen vs Anfällige $p=0.1024$, Resiliente vs Anfällige $p=0.1605$; p70: Kontrollen vs Resiliente $p=0.6918$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9818$, Resiliente vs Anfällige $p=0.7997$; pS6/S6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9721$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.5295$, Resiliente vs Anfällige $p=0.6710$; pAkt/Akt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.8159$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.2719$, Resiliente vs Anfällige $p=0.6121$; **b Hippocampus** Kontrollen $n=4$, Resiliente $n=3$, Anfällige $n=4$; S6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9242$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.6577$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9025$; pS6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.7157$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9634$, Resiliente vs Anfällige $p=0.5655$; Akt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.8015$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.5860$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9574$; pAkt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9115$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9787$, Resiliente vs Anfällige $p=0.8242$; p70: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9537$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9993$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9431$ pp70: Kontrollen vs Resiliente $p=0.8020$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9663$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9145$; pS6/S6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9281$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.5762$, Resiliente vs Anfällige $p=0.4006$; pp70/p70: Kontrollen vs Resiliente $p=0.8020$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9663$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9145$ pAkt/Akt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.7641$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9292$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9303$; **c N. accumbens** Kontrollen $n=4$, Resiliente $n=4$, Anfällige $n=4$; S6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9955$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.7602$, Resiliente vs Anfällige $p=0.8117$; pS6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.8469$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.0110$, Resiliente vs Anfällige $p=0.0023$; Akt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9934$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9494$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9788$; pAkt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.8470$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.3815$, Resiliente vs Anfällige $p=0.1525$; pS6/S6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.7607$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.1458$, Resiliente vs Anfällige $p=0.0305$ pAkt/Akt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.8348$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.0585$, Resiliente vs Anfällige $p=0.0141$; **d VTA** Kontrollen $n=4$, Resiliente $n=4$, Anfällige $n=4$; S6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.1898$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.8003$, Resiliente vs Anfällige $p=0.0505$; pS6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.4122$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9912$, Resiliente vs Anfällige $p=0.3446$; Akt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.8651$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9961$, Resiliente vs Anfällige $p=0.8219$; pAkt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.7004$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.4409$, Resiliente vs Anfällige $p=0.1132$; pS6/S6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9419$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9636$, Resiliente vs Anfällige $p=0.8265$ pAkt/Akt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.1346$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.1258$, Resiliente vs Anfällige $p=0.0007$

3.1.4.2 7 Tage nach CSDS

Beim zweiten Zeitpunkt (T2) wurden in den Gehirnregionen PFC, Nucleus accumbens und Hippocampus neben den Proteinen der mTOR-Signalkaskade auch die postsynaptischen Proteine GluA1, GluA2 und PSD95 untersucht. Im präfrontalen Cortex wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden (Abb. 3.1.4.2 a). Auch im Hippocampus gab es in diesem Zeitfenster kaum Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 3.1.4.2 b). Nur das Verhältnis von phospho-p70 S6 kinase zu p70 S6 Gesamtprotein war in den suszeptiblen Tieren signifikant höher als bei der Kontrollgruppe. Im Nucleus accumbens zeigte sich eine signifikant höhere Menge an S6 in den suszeptiblen als bei den resilienten Tieren (Abb. 3.1.4.2 c). Die gestressten Tiere wiesen tendenziell höhere Mengen an phospho-Akt auf. Zudem war sowohl bei den Resilienten als auch den Anfälligen ein erhöhtes Verhältnis von GluA1 zu GluA2 festzustellen. Im Ventralen Tegmentalen Areal konnten zum Zeitpunkt T2 keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 3.1.4.2 d).

Ergebnisse

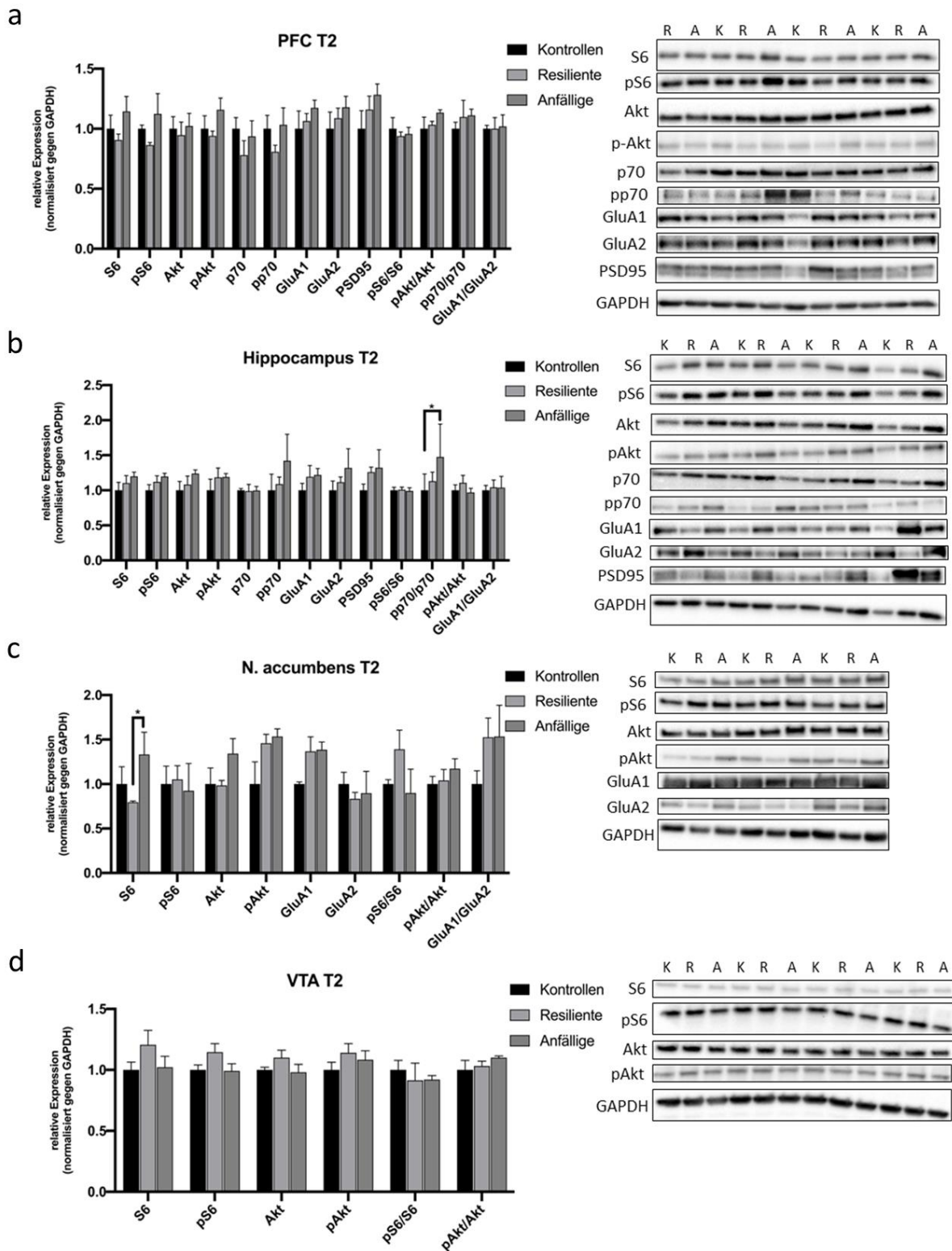


Abbildung 3.1.4.2: Westernblotergebnisse für den zweiten Zeitpunkt a PFC Kontrollen n= 4, Resiliente n= 4, Anfällige n= 4; S6: Kontrollen vs Resiliente p= 0.8330 , Kontrollen vs Anfällige p= 0.6479, Resiliente vs Anfällige p= 0.2571; pS6: Kontrollen vs Resiliente p= 0.6868, Kontrollen vs Anfällige p= 0.7320, Resiliente vs Anfällige p= 0.2068; Akt: Kontrollen vs Resiliente p= 0.9313, Kontrollen vs Anfällige p= 0.9867, Resiliente vs Anfällige p= 0.8433; pAkt: Kontrollen vs Resiliente p= 0.9357, Kontrollen vs Anfällige p= 0.6295, Resiliente vs Anfällige p= 0.3614; p70: Kontrollen vs Resiliente p= 0.2859, Kontrollen vs Anfällige p= 0.9014, Resiliente vs Anfällige p= 0.4724; pp70: Kontrollen vs Resiliente p= 0.3335, Kontrollen vs Anfällige p= 0.9677, Resiliente vs Anfällige p= 0.1748; GluA1: Kontrollen vs Resiliente p= 0.8484, Kontrollen vs Anfällige p= 0.3080, Resiliente vs Anfällige p= 0.6249; GluA2: Kontrollen vs Resiliente p= 0.7426, Kontrollen vs Anfällige p= 0.2950, Resiliente vs

Ergebnisse

Anfällige $p=0.7260$; PSD95: Kontrollen vs Resiliente $p=0.5131$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.1262$, Resiliente vs Anfällige $p=0.6673$ pS6/S6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9344$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9656$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9937$; pp70/p70: Kontrollen vs Resiliente $p=0.8222$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.7732$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9951$; pAkt/Akt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9858$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.7885$, Resiliente vs Anfällige $p=0.8536$; GluA1/GluA2: Kontrollen vs Resiliente $p>0.9999$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9922$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9923$; **b Hippocampus** Kontrollen $n=4$, Resiliente $n=4$, Anfällige $n=4$; S6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.8836$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.6326$, Resiliente vs Anfällige $p=0.8989$; pS6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.8745$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.7002$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9477$; Akt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9072$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.4434$, Resiliente vs Anfällige $p=0.7035$; pAkt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.6113$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.5908$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9994$; p70: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9992$, Kontrollen vs Anfällige $p>0.9999$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9997$ pp70: Kontrollen vs Resiliente $p=0.8977$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.0925$, Resiliente vs Anfällige $p=0.2224$; GluA1: Kontrollen vs Resiliente $p=0.8457$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.6311$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9380$; GluA2: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9523$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.6893$, Resiliente vs Anfällige $p=0.8754$; PSD95: Kontrollen vs Resiliente $p=0.6485$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.5157$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9786$ pS6/S6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9995$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9995$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9981$; pp70/p70: Kontrollen vs Resiliente $p=0.7861$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.0429$, Resiliente vs Anfällige $p=0.1821$ pAkt/Akt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9333$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9947$, Resiliente vs Anfällige $p=0.8935$; **c N. accumbens** Kontrollen $n=4$, Resiliente $n=4$, Anfällige $n=4$; S6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.5828$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.2483$, Resiliente vs Anfällige $p=0.0309$; pS6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9682$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9359$, Resiliente vs Anfällige $p=0.8266$; Akt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9969$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.2131$, Resiliente vs Anfällige $p=0.1862$; pAkt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9098$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.5032$, Resiliente vs Anfällige $p=0.7585$; GluA1: Kontrollen vs Resiliente $p=0.6171$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9669$, Resiliente vs Anfällige $p=0.7681$; GluA2: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9077$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9253$, Resiliente vs Anfällige $p=0.7077$; pS6/S6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.5920$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.7676$, Resiliente vs Anfällige $p=0.2238$ pAkt/Akt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9098$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.5032$, Resiliente vs Anfällige $p=0.7585$; GluA1/GluA2: Kontrollen vs Resiliente $p=0.4416$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9180$, Resiliente vs Anfällige $p=0.6834$ **d VTA** Kontrollen $n=4$, Resiliente $n=4$, Anfällige $n=4$; S6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.2719$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9852$, Resiliente vs Anfällige $p=0.3507$; pS6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.3560$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9971$, Resiliente vs Anfällige $p=0.3194$; Akt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.6844$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9854$, Resiliente vs Anfällige $p=0.5822$; pAkt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.3044$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.6522$, Resiliente vs Anfällige $p=0.8186$; pS6/S6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9147$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9025$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9995$ pAkt/Akt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9319$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.5038$, Resiliente vs Anfällige $p=0.7253$

3.1.4.3 3 Wochen nach CSDS

Zum Abschluss wurde die mTOR Aktivität 3 Wochen nach CSDS analysiert. Auch hier wurden zusätzlich zu den klassischen Targetproteinen der mTOR Kinase auch die postsynaptischen Proteine GluA1, GluA2 und PSD95 analysiert. Im präfrontalen Cortex zeigte sich drei Wochen nach Beendigung des chronisch sozialen Stresses keine signifikante Änderung in der mTOR Aktivität (Abb. 3.1.4.3 a). Im Hippocampus war das Verhältnis von phospho-S6 zu S6 in beiden gestressten Gruppen im Vergleich zu den ungestressten Kontrollen signifikant erhöht (Abb. 3.1.4.3 b). Im Nucleus accumbens war die Menge von phospho-S6 in den gestressten Tieren signifikant höher als in den Kontrollen (Abb. 3.1.4.3 c). Hierbei zeigte sich zudem tendenziell auch für die anderen untersuchten Proteine eine tendenziell größere Expression in den gestressten Tieren als bei den Kontrollen. Im Ventralen Tegmentalen Areal konnte zu diesem Zeitpunkt wiederum keine signifikante Regulation festgestellt werden (Abb. 3.1.4.3 d).

Ergebnisse

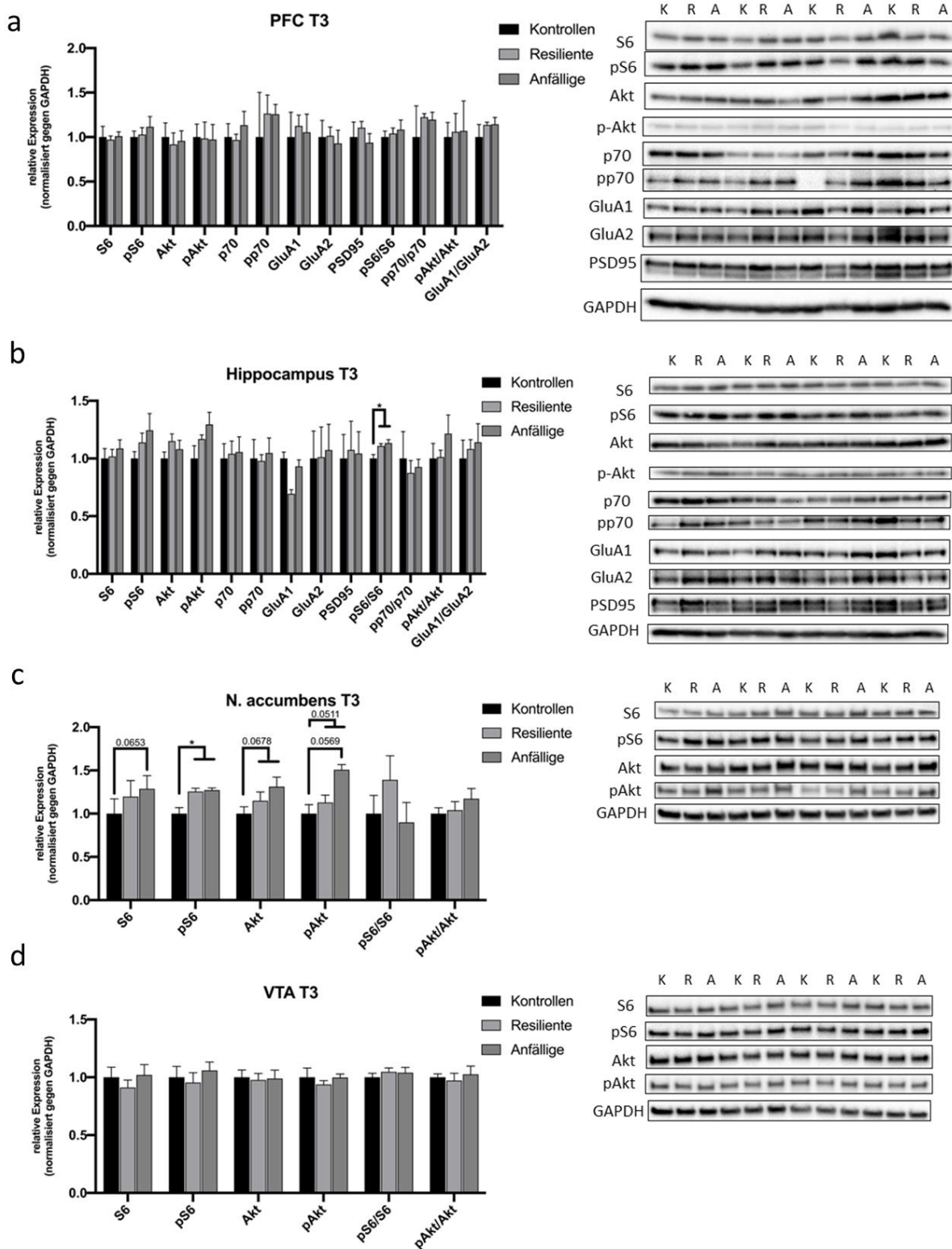


Abbildung 3.1.4.3 : Westernblotergebnisse für den dritten Zeitpunkt a PFC Kontrollen n = 4, Resiliente n = 4, Anfällige n = 4; S6: Kontrollen vs Resiliente p = 0.9866, Kontrollen vs Anfällige p = 0.9985, Resiliente vs Anfällige p = 0.9762; pS6: Kontrollen vs Resiliente p = 0.9914, Kontrollen vs Anfällige p = 0.8564, Resiliente vs Anfällige p = 0.9136; Akt: Kontrollen vs Resiliente p = 0.9286, Kontrollen vs Anfällige p = 0.9808, Resiliente vs Anfällige p = 0.9825; pAkt: Kontrollen vs Resiliente p = 0.9980, Kontrollen vs Anfällige p = 0.9947, Resiliente vs Anfällige p = 0.9992; p70: Kontrollen vs Resiliente p = 0.9792, Kontrollen vs Anfällige p = 0.7300, Resiliente vs Anfällige p = 0.6082; pp70: Kontrollen vs Resiliente p = 0.4644, Kontrollen vs Anfällige p = 0.1592, Resiliente vs Anfällige p = 0.7864, GluA1: Kontrollen vs Resiliente p = 0.8132, Kontrollen vs Anfällige p = 0.9618, Resiliente vs Anfällige p = 0.9357 GluA2: Kontrollen vs Resiliente p = 0.9984, Kontrollen vs Anfällige p = 0.9461, Resiliente vs

Ergebnisse

Anfällige $p=0.9269$ PSD95: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9098$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9664$, Resiliente vs Anfällige $p=0.7851$ pS6/S6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9869$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9401$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9823$; pp70/p70: Kontrollen vs Resiliente $p=0.6959$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.7534$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9951$ pAkt/Akt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9751$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9634$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9988$, GluA1/GluA2: Kontrollen vs Resiliente $p=0.8060$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.7822$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9990$ **b Hippocampus** Kontrollen $n=4$, Resiliente $n=4$, Anfällige $n=4$; S6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9978$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9488$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9671$; pS6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.8965$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.7139$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9390$; Akt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.8960$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9688$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9767$; pAkt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.7431$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.4032$, Resiliente vs Anfällige $p=0.8438$; p70: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9937$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9881$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9991$; pp70: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9935$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9644$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9293$, GluA1: Kontrollen vs Resiliente $p=0.7640$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.4276$, Resiliente vs Anfällige $p=0.8477$ GluA2: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9979$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9174$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9404$ PSD95: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9072$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9673$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9833$ pS6/S6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9543$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9329$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9978$; pp70/p70: Kontrollen vs Resiliente $p=0.7215$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.8944$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9449$ pAkt/Akt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9982$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.6199$, Resiliente vs Anfällige $p=0.6558$, GluA1/GluA2: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9689$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9100$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9833$ **c N. accumbens** Kontrollen $n=4$, Resiliente $n=4$, Anfällige $n=4$; S6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.2633$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.0653$, Resiliente vs Anfällige $p=0.7563$; pS6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.3095$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.2646$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9947$; Akt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.6442$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.1509$, Resiliente vs Anfällige $p=0.5836$; pAkt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.8225$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.0569$, Resiliente vs Anfällige $p=0.1936$; pS6/S6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9751$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9939$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9453$ pAkt/Akt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9999$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.8305$, Resiliente vs Anfällige $p=0.8234$; **d VTA** Kontrollen $n=4$, Resiliente $n=4$, Anfällige $n=4$; S6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.6160$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9737$, Resiliente vs Anfällige $p=0.4806$; pS6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.8512$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.7662$, Resiliente vs Anfällige $p=0.4359$; Akt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9700$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9937$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9910$; pAkt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.7798$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9999$, Resiliente vs Anfällige $p=0.7891$; pS6/S6: Kontrollen vs Resiliente $p=0.8730$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9092$, Resiliente vs Anfällige $p=0.9964$ pAkt/Akt: Kontrollen vs Resiliente $p=0.9542$, Kontrollen vs Anfällige $p=0.9625$, Resiliente vs Anfällige $p=0.8442$

3.2 Verhaltensversuche nach Intervention in die mTOR-Signalkaskade

Rapamycin ist ein starker und selektiver Inhibitor der mTOR-Proteinkinase (Lamming 2016). Cleary et al. konnten zeigen, dass eine Behandlung mit Rapamycin einen antidepressiva-ähnlichen Effekt sowohl im Forced Swim Test (FST), als auch Tail Suspension Test (TST) hatte (Cleary et al., 2008). In dieser Arbeit sollte der Effekt einer Rapamycinbehandlung nach CSD auf verschiedene Verhaltensdomänen untersucht werden. Vor der Verwendung des Rapamycins *in vivo* wurde das Medikament zunächst *in vitro* getestet. Hierfür wurden HEK293T Zellen ausgesät und diese für 24h mit Rapamycin behandelt (s. 2.2.1.1 – 2.2.1.3). Zur Kontrolle dienten unbehandelte und mit Vehikel behandelte Zellen. Die Zellen wurden anschließend geerntet und Proteinlysate wurden gewonnen (s. 2.2.1.3 und 2.2.5.1). Die Lysate wurden für eine SDS-PAGE (s. 2.2.5.2) mit anschließendem Western Blot (s. 2.2.5.3) verwendet. Zur Überprüfung der mTOR-Inhibition wurde die Phosphorylierung des mTOR Zielproteins S6 analysiert. Im Vergleich zu unbehandelten und mit Vehikel behandelten Zellen zeigte sich bei den mit Rapamycin behandelten Zellen eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung von S6 (Abb. 3.2.). Zudem zeigte sich auch eine Reduzierung der Gesamtmenge an S6 bei den mit Rapamycin behandelten Zellen. Diese Ergebnisse bestätigten die Wirksamkeit des Rapamycins.

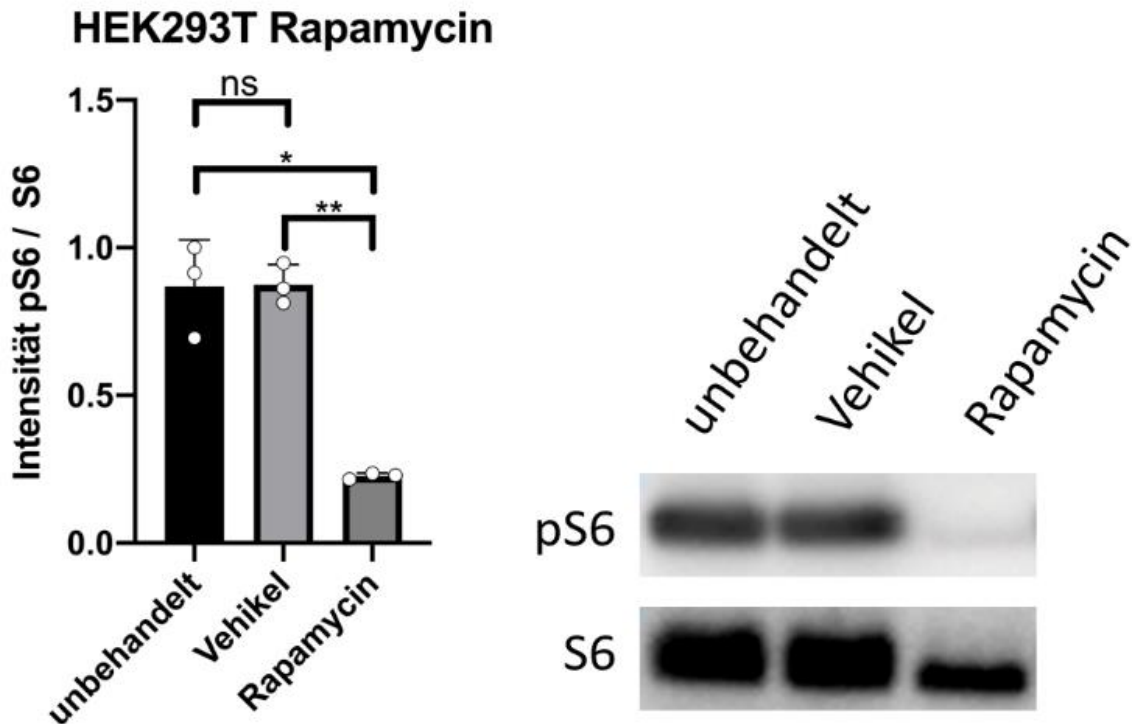


Abbildung 3.2: Test der Rapamycineffektivität in HEK293T Zellen. Zur Testung der Droge vor der Benutzung für das *in vivo* Experiment wurden HEK293T Zellen mit Rapamycin behandelt und nach 24h geerntet. Aus den Zellen wurden Proteinlysate gewonnen und diese im Western Blot verwendet. Es wurde der Phosphorylierungsstatus des mTOR Ziels S6 untersucht. Hierfür wurden Antikörper gegen die phosphorylierte Form (S6) und die Gesamtmenge an S6 im Western Blot verwendet und das Verhältnis von pS6 zu S6 berechnet. Die mit Rapamycin behandelten Zellen wiesen im Vergleich zu unbehandelten und mit Vehikel behandelten Zellen signifikant weniger an phosphoryliertem S6 (pS6) auf. Der Test wurde mit je 3 technischen Replikaten durchgeführt. Brown-Forsythe und Welch ANOVA Test mit Dunnett's post hoc Test. Unbehandelt vs. Vehikel $p > 0.9999$; unbehandelt vs. Rapamycin $p = 0.0407$; Vehikel vs. Rapamycin $p = 0.0079$ * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Nach Testung von Rapamycin *in vitro* wurden die Mäuse zunächst einer 14-tägigen Stressprozedur unterzogen (s. 2.2.4.1.1). Im Anschluss an den CSD wurde den Tieren täglich 8 mg/kg Rapamycin, bzw. eine äquivalente Volumen DMSO als Vehikelkontrolle, intraperitoneal injiziert. Nach einer Woche wurde mit den Verhaltensversuchen begonnen. Es wurden Social Interaction Test, 24h NORT und Nest Building durchgeführt (s. 2.2.4.2.1, 2.2.4.4.1 und 2.2.4.5.2).

3.2.1 Sozialverhalten nach chronisch-sozialem Stress und Rapamycin Behandlung

3.2.1.1 Social Interaction Test (SI)

Die Ergebnisse des Social Interaction Tests zeigten bei den gestressten Vehikel-behandelten Tieren eine signifikante Reduktion der sozialen Interaktion im Vergleich zu den nicht-gestressten Vehikelkontrollen (Abb. 3.2.1). Dies bestätigte den Stresseffekt innerhalb dieses Experimentes. Die mit Rapamycin-behandelten gestressten Tiere hatten einen signifikant höheren mittleren Index als ihre mit DMSO behandelte Vergleichsgruppe. Für die mit

Rapamycin behandelte Kohorte zeigten sich zwischen der nicht-gestressten und der gestressten Gruppe keine signifikanten Unterschiede. Zusammengenommen zeigten diese Ergebnisse das Verschwinden des Stress-induzierten Phänotyps nach Gabe von Rapamycin.

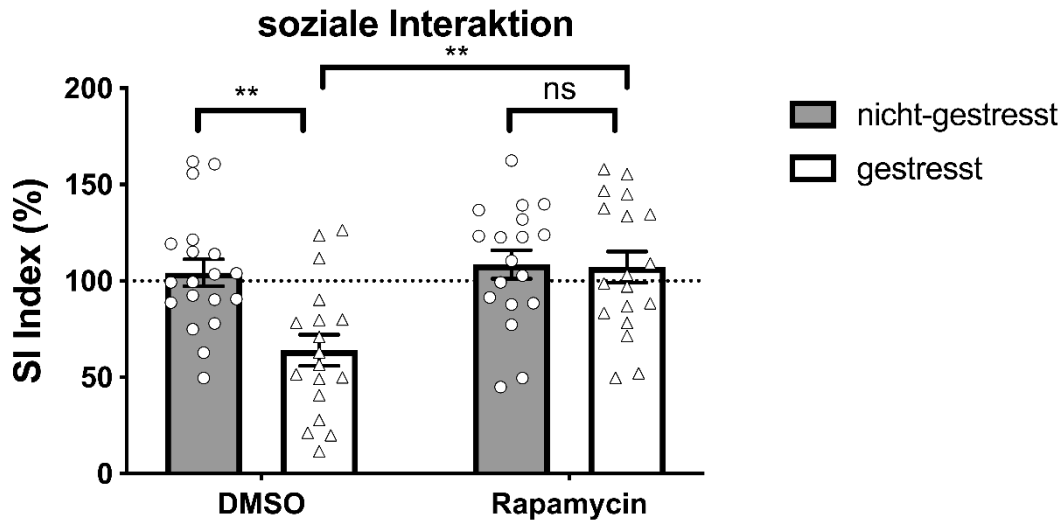


Abbildung 3.2.1: Ergebnis der Untersuchung der sozialen Interaktion nach Rapamycinbehandlung DMSO:nicht:gestresst mit n= 19, DMSO:gestresst mit n = 18, Rapamycin:nicht-gestresst mit n= 19 und Rapamycin:gestresst mit n= 18. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post hoc. DMSO:nicht:gestresst vs. DMSO:gestresst p=0.0021; DMSO:nicht-gestresst vs Rapamycin:nicht-gestresst p=0.9783; DMSO:nicht-gestresst vs Rapamycin:gestresst p=0.9929; DMSO:gestresst vs Rapamycin:nicht-gestresst p=0.0007; DMSO:gestresst vs. Rapamycin:gestresst p=0.0010; Rapamycin:nicht-gestresst:vs. Rapamycin:gestresst p= 0.9993; * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p<0.001.

3.2.2 Kognitive Leistung nach chronisch-sozialem Stress (CSS) und Rapamycin Behandlung

3.2.2.1 24 h Novel Object Recognition Task (24 h NORT)

Auch in der Auswertung des 24h NORT verbesserte Rapamycin das Abschneiden der gestressten Tiere. Die gestressten mit Vehikel behandelten Tiere hatten im Mittel einen tendenziell niedrigeren Discrimination Index als die nicht-gestressten mit Vehikel behandelten Tiere (Abb. 3.2.2). Dies bestätigte die in 3.1.2 gewonnenen Ergebnisse, dass die gestressten Tiere in ihrer Kognition beeinträchtigt sind. Die gestressten mit Rapamycin behandelten Mäuse hingegen erreichten im Mittel ein ähnliches Niveau wie die ungestressten Gruppen (Abb. 3.2.2). Dies deutete somit auch im Bereich der Kognition auf eine Verbesserung des Stress-induzierten Phänotyps hin.

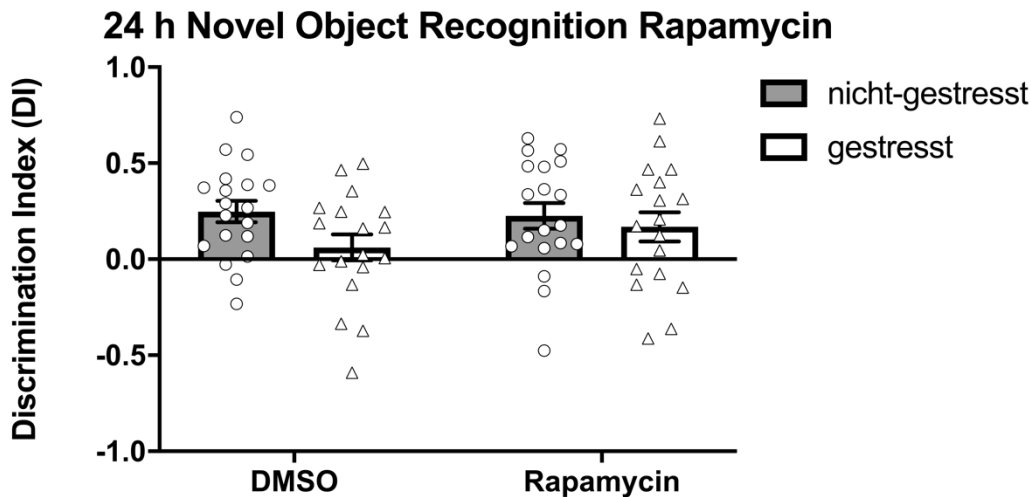


Abbildung 3.2.2: Ergebnis der Untersuchung der Gedächtniskonsolidierung nach Rapamycinbehandlung. Balkendiagramm mit SEM. DMSO:nicht:gestresst mit $n = 19$, DMSO:gestresst mit $n = 18$, Rapamycin:nicht-gestresst mit $n = 19$ und Rapamycin:gestresst mit $n = 18$. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post hoc. DMSO:nicht:gestresst vs. DMSO:gestresst $p = 0.2082$; DMSO:nicht-gestresst vs. Rapamycin:nicht-gestresst $p = 0.9948$; DMSO:nicht-gestresst vs. Rapamycin:gestresst $p = 0.8347$; DMSO:gestresst vs. Rapamycin:nicht-gestresst $p = 0.3152$; DMSO:gestresst vs. Rapamycin:gestresst $p = 0.6805$; Rapamycin:nicht-gestresst vs. Rapamycin:gestresst $p = 0.9317$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.2.3 Nestbauverhalten nach chronisch-sozialem Stress und Rapamycin Behandlung

3.2.3.1 Nest Building (NB)

Für die Auswertung des Nestbauverhaltens wurden zwei Parameter bestimmt. Zum einen wurden die Nester in der Sorgfalt ihrer Bauweise begutachtet und entsprechend der von Deacon et al. entwickelten Skala bewertet. Zum anderen wurde sowohl am ersten als auch am zweiten Tag des Tests das Gewicht des Nestlets bestimmt. Hierdurch konnte die Menge an verbrauchtem Nestletmaterial bestimmt werden. Die Menge an verbrauchtem Nistmaterial erlaubte ebenfalls Aussagen über den Zustand des Nests. Die mit Vehikel behandelten Mäuse - gestresst und nicht-gestresst - bauten Nester mit signifikant höheren Werten auf der Bewertungsskala, als die mit Rapamycin behandelten Tiere (Abb. 3.2.1.3 a). Auch der Verbrauch an Nistmaterial war bei den Vehikel behandelten Tieren im Vergleich mit den Rapamycin behandelten Tieren signifikant höher (Abb. 3.2.1.3 b). Zusammengefasst zeigten die Resultate, dass die mit der Droge behandelten Tiere das Nestlet weniger zum Nestbau nutzten. Der Vergleich zwischen nicht-gestresst und gestressten Tieren zeigte, dass die gestressten Mäuse tendenziell sowohl schlechtere Werte bei der Bewertung des Nests, als auch dem Verbrauch an Nistmaterial aufwiesen. Die Unterschiede waren hier aber nicht signifikant.

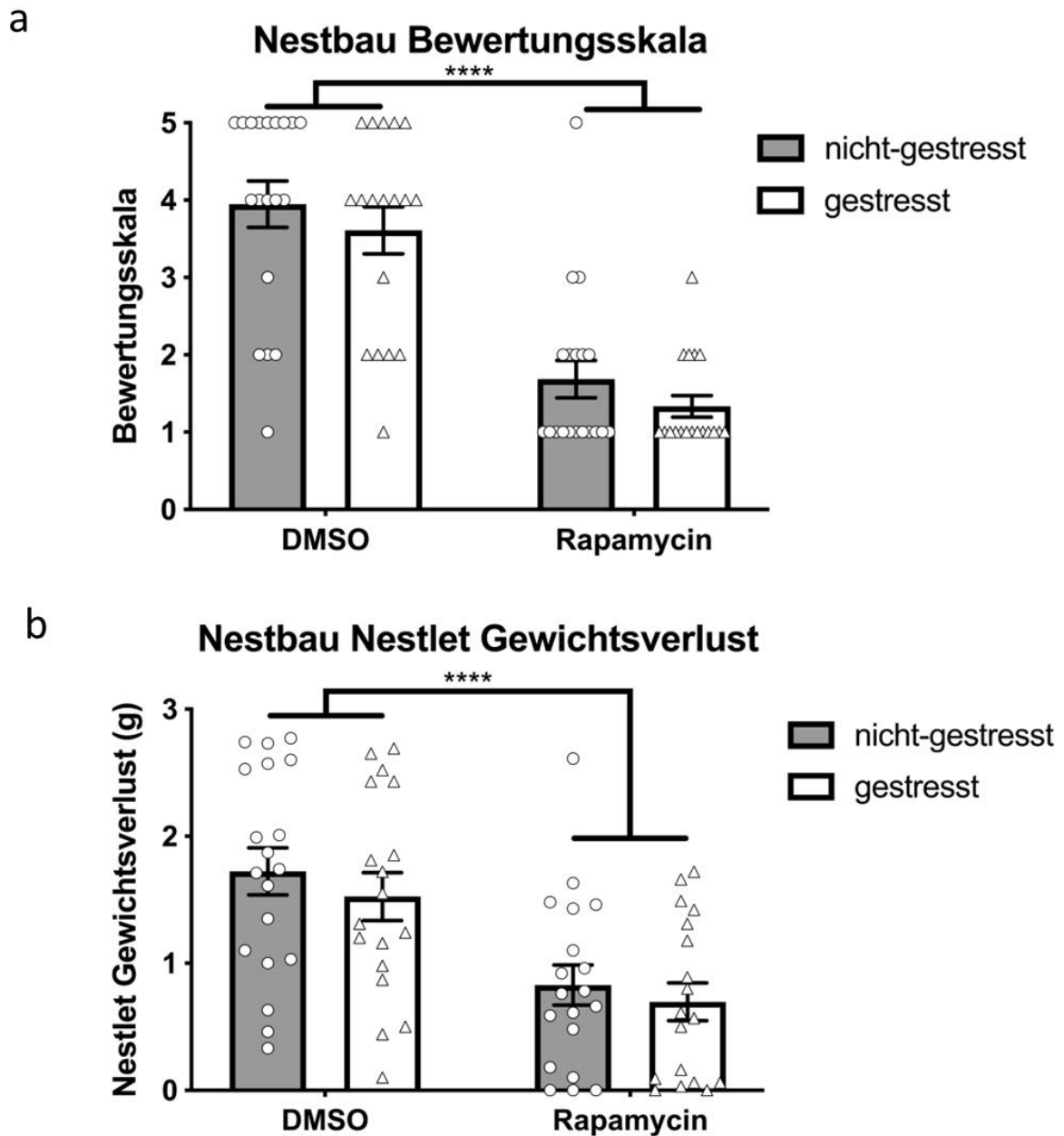


Abbildung 3.2.3: Ergebnis der Untersuchung des Nestbauerhaltens nach Rapamycinbehandlung. a Bewertungsskala Balkendiagramm mit SEM. DMSO:nicht:gestresst mit n= 19, DMSO:gestresst mit n=18, Rapamycin:nicht-gestresstmit n= 19 und Rapamycin:gestresstmit n= 18. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post hoc.nicht-gestresst vs gestresst p = 0.1852; DMSO vs Rapamycin p<0.0001; DMSO:nicht:gestresst vs. DMSO:gestresst p=0.7911; DMSO:nicht-gestresst vs Rapamycin:nicht-gestresst p<0.0001 DMSO:nicht-gestresst vs Rapamycin:gestresst p<0.0001; DMSO:gestresst vs Rapamycin:nicht-gestresst p<0.0001; DMSO:gestresst vs. Rapamycin:gestresst p<0.0001; Rapamycin:nicht-gestresst:vs. Rapamycin:gestresst p=0.7690; **b Nestlet Gewichtsverlust.** Balkendiagramm mit SEM. DMSO:nicht:gestresst mit n= 19, DMSO:gestresst mit n=18, Rapamycin:nicht-gestresstmit n= 19 und Rapamycin:gestresstmit n= 18. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post hoc.nicht-gestresst vs gestresst p = 0.3347; DMSO vs Rapamycin p<0.0001; DMSO:nicht:gestresst vs. DMSO:gestresst p= 0.8411; DMSO:nicht-gestresst vs Rapamycin:nicht-gestresst p= 0.0019 DMSO:nicht-gestresst vs Rapamycin:gestresst p= 0.0004; DMSO:gestresst vs Rapamycin:nicht-gestresst p=0.0261; DMSO:gestresst vs. Rapamycin:gestresst p= 0.0063; Rapamycin:nicht-gestresst:vs. Rapamycin:gestresst p=0.9473; * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p<0.001.

3.2.4 Molekulare Analyse von Proteinen der mTOR-Signalkaskade nach Gabe von Rapamycin

Zum Abschluss des Versuchs sollte die mTOR-Aktivität in den Gehirnen der Tiere überprüft werden. Die Gehirne der Tiere wurden entnommen und schockgefroren. Anschließend wurden die Gehirne an einem Kryostaten geschnitten und die Regionen PFC, Hippocampus und Nucleus accumbens präpariert. Das Gewebe wurde lysiert und die Proteine isoliert. Die Proteinlysate wurden wiederum für eine SDS-PAGE mit darauf folgendem Western Blot verwendet. Zur Analyse der mTOR Aktivität wurde der Phosphorylierungsstatus der beiden mTOR-Signalkaskadenproteine Akt und S6 überprüft. Im PFC zeigte sich eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung des mTOR-Zielproteins S6 in den mit Rapamycin behandelten Tieren (Abb. 3.2.4 a). Dies galt sowohl für die ungestresste wie auch die gestresste Gruppe. Für Akt hingegen wurden keine signifikanten Unterschiede in der Phosphorylierung gefunden. Im Hippocampus zeigte sich ein ähnliches Bild. Auch hier zeigte sich für den Phosphorylierungsstatus von S6 ein signifikanter Unterschied zwischen Rapamycin- und Vehikelbehandelten gefunden (Abb. 3.2.4 b). Auch in dieser Hirnregion konnte für Akt kein Unterschied in der Phosphorylierung zwischen den Gruppen gefunden werden. Im Nucleus accumbens zeigte sich für den Phosphorylierungsstatus von S6 ebenfalls eine tendenzielle Reduzierung in den mit Rapamycin behandelten Gruppen (Abb. 3.2.4 c). Im Gegensatz zu den anderen Hirnregionen konnte hier allerdings kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Wie bereits für die größeren Hirnregionen beschrieben, wurden auch hier für Akt keine Unterschiede in der Phosphorylierung zwischen den Gruppen detektiert.

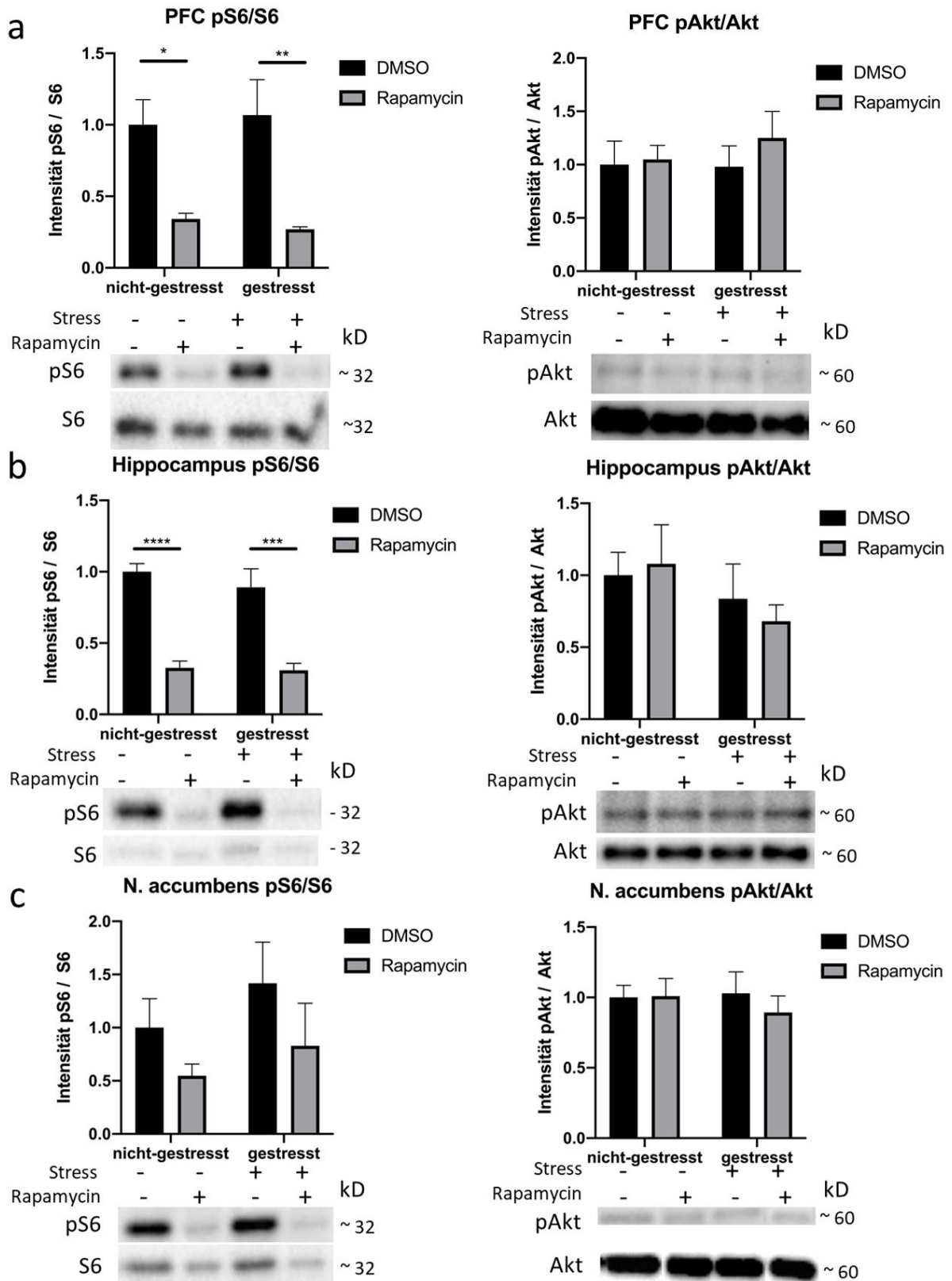


Abbildung 3.2.4 : Ergebnisse des Western Blot nach Rapamycinbehandlung Balkendiagramm mit SEM. **a Präfrontaler Cortex:** DMSO:nicht:gestresst mit n=6, DMSO:gestresst mit n=6, Rapamycin:nicht-gestresstmit n= 6 und Rapamycin:gestresstmit n= 6. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post hoc. **pS6/S6:** nicht-gestresst vs gestresst p=0.2784 ; DMSO vs Rapamycin p= 0.1134; Nicht-gestress:DMSO vs nicht-gestress:Rapamycin p=0.0164; nicht-gestresst:DMSO vs. Gestresst:DMSO p= 0.9871; nicht-gestresst:DMSO vsgestresst:Rapamycin p=0.0074; nicht-gestresst:Rapamycin vs. Gestresst:DMSO p=0.0113; nicht-gestresst:Rapamycin vs

Ergebnisse

gestresst:Rapamycin p=0.9825; gestresst:DMSO vs. Gestresst:Rapamycin p=0.0052 **pAkt/Akt**: nicht-gestresst vs gestresst p =0.6607 ; DMSO vs Rapamycin p=0.4414; Nicht-gestresst:DMSO vs nicht-gestresst:Rapamycin p=0.9982; nicht-gestresst:DMSO vs. Gestresst:DMSO p=0.9999; nicht-gestresst:DMSO vs gestresst:Rapamycin p=0.8199; nicht-gestresst:Rapamycin vs. Gestresst:DMSO p=0.9950; nicht-gestresst:Rapamycin vs gestresst:Rapamycin p=0.8961; gestresst:DMSO vs. Gestresst:Rapamycin p=0.7841 **b Hippocampus**: Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post hoc. **pS6/S6**: nicht-gestresst vs gestresst p = 0.4343; DMSO vs Rapamycin p<0.0001; Nicht-gestresst:DMSO vs nicht-gestresst:Rapamycin p<0.0001; nicht-gestresst:DMSO vs. Gestresst:DMSO p= 0.7629; nicht-gestresst:DMSO vs gestresst:Rapamycin p<0.0001; nicht-gestresst:Rapamycin vs. Gestresst:DMSO p=0.0006; nicht-gestresst:Rapamycin vs gestresst:Rapamycin p=0.9986; gestresst:DMSO vs. Gestresst:Rapamycin p=0.0004 **pAkt/Akt**: nicht-gestresst vs gestresst p =0.1887 ; DMSO vs Rapamycin p=0.8556; Nicht-gestresst:DMSO vs nicht-gestresst:Rapamycin p=0.9927; nicht-gestresst:DMSO vs. Gestresst:DMSO p= 0.9427; nicht-gestresst:DMSO vs gestresst:Rapamycin p=0.6979; nicht-gestresst:Rapamycin vs. Gestresst:DMSO p=0.8387; nicht-gestresst:Rapamycin vs gestresst:Rapamycin p=0.5347; gestresst:DMSO vs. Gestresst:Rapamycin p=0.9500 ; **c Nucleus accumbens**: Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post hoc. **pS6/S6** nicht-gestresst vs gestresst p = 0.2784; DMSO vs Rapamycin p=0.1134; DMSO:nicht-gestresst vs. DMSO:gestresst p=0.7408; DMSO:nicht-gestresst vs Rapamycin:nicht-gestresst p= 0.7837 DMSO:nicht-gestresst vs Rapamycin:gestresst p= 0.9804; DMSO:gestresst vs Rapamycin:nicht-gestresst p=0.2365; DMSO:gestresst vs. Rapamycin:gestresst p= 0.9194; Rapamycin:nicht-gestresst:vs. Rapamycin:gestresst p=0.5594; **pAkt/Akt** nicht-gestresst vs gestresst p = 0.7242; DMSO vs Rapamycin p=0.6139; DMSO:nicht-gestresst vs. DMSO:gestresst p>0.9999; DMSO:nicht-gestresst vs Rapamycin:nicht-gestresst p= 0.9983 DMSO:nicht-gestresst vs Rapamycin:gestresst p= 0.9260; DMSO:gestresst vs Rapamycin:nicht-gestresst p=0.9995; DMSO:gestresst vs. Rapamycin:gestresst p= 0.9063; Rapamycin:nicht-gestresst:vs. Rapamycin:gestresst p=0.8619; * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p<0.001.

3.2.5 Gewichtsanalyse nach chronisch-sozialem Stress bei *Tsc2*^{-/-} Mäusen

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle der mTOR-Signalkaskade in Zusammenhang mit Stressresilienz. Nachdem in 3.2 die Auswirkung der Hemmung des mTOR-Signalweges mittels pharmakologischer Intervention durch Rapamycin untersucht wurde sollte nun die Auswirkung einer mTOR Hyperaktivität beleuchtet werden. Hierfür wurde das *Tsc2* Mausmodell verwendet. Bei diesem Mausmodell weist das Gen *Tsc2*, welches für Tuberin kodiert, auf einem Allel eine Deletion in Exon 2 auf. Dies resultiert in einem Verlust der Proteinexpression für das mutierte Allel und es kann nur noch über ein wildtypisches Allel Protein gebildet werden. Die Menge an gebildetem Tuberin nimmt somit ab. Tuberin bildet, zusammen mit dem von *Tsc1* kodierten Hamartin einen Komplex, welcher die mTORC1 Signalisierung inhibiert. Im *Tsc2* Mausmodell ist diese Inhibierung des mTORC1 folglich geschwächt und es kommt zu einer Verstärkung der mTOR Aktivität.

Für diese Arbeit wurden männliche *Tsc2*-Mäuse und ihre männlichen wildtypischen Geschwister im Alter von 3 Monaten verwendet. Zunächst wurde DNA aus Ohrstanzen isoliert und diese für eine PCR zur Genotypisierung verwendet (s. 2.2.2.2.1 und 2.2.2.2.2). Die Mäuse wurden einem 14-tägigen Stressparadigma unterzogen. Das Gewicht wurde jeden Tag dokumentiert und für die Gruppen verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass die gestressten wildtypischen Mäuse (*Tsc2*-wt gestresst) schneller an Gewicht zunahmten, als die ungestressten wildtypischen Kontrolltiere (*Tsc2*-wt nicht-gestresst). An Tag 11 zeigte sich hier ein signifikanter Unterschied. Diese Beobachtung bestätigte die Ergebnisse aus 3.1.3.1. Für die heterozygoten Tiere (*Tsc2*-het nicht-gestresst und *Tsc2*-het gestresst) wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Nicht-Gestressten und Gestressten gefunden. Dabei fiel

auf, dass beide Gruppen eine Gewichtszunahme, vergleichbar derer der gestressten wildtypischen Mäuse zeigten.

Eine Woche nach Beendigung der Stressprozedur wurde mit den Verhaltenstests begonnen. Es wurde eine Testbatterie aus Social Interaction Test, Social Novelty Test, Elevated Plus Maze, Open Field, Y-maze, Grooming, Sugar Preference Test und Tail Suspension Test durchgeführt.

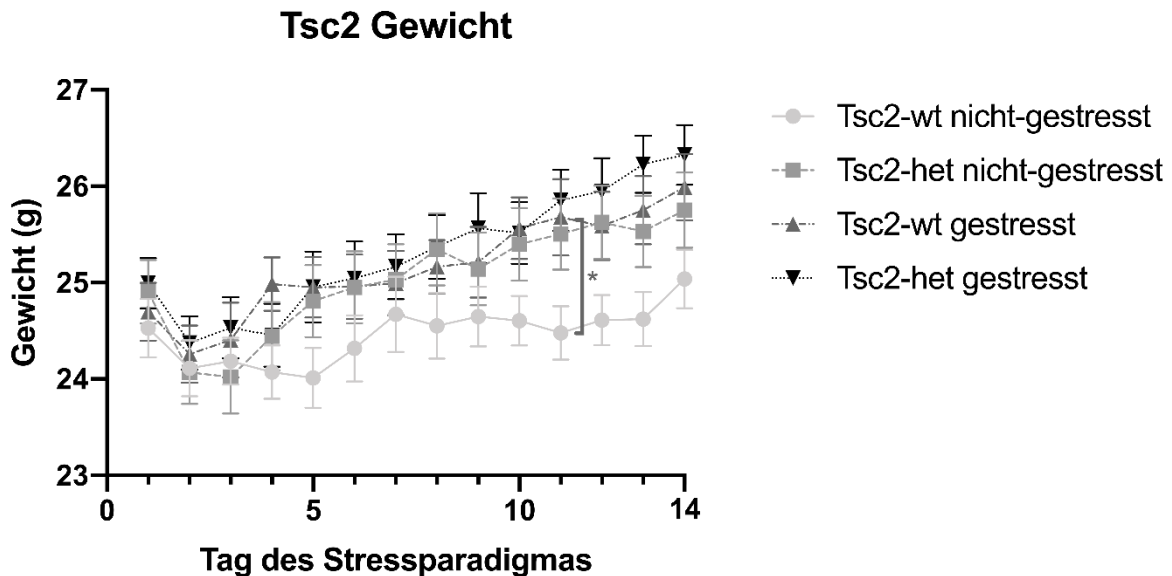


Abbildung 3.2.5: Ergebnis der Untersuchung der Gewichtsentwicklung bei ungestressten und gestressten Tsc2 Mäusen über den Zeitraum des Stressparadigmas. Verlaufsdigramm mit SEM. Nicht-gestresst:Tsc2-wt mit n = 19 , nicht-gestresst:Tsc2-het mit n = 21, gestresst:Tsc2-wt mit n = 19 und gestresst:Tsc2-het mit n = 21. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons test post hoc Tag 11: Tsc2-wt nicht-gestresst vs Tsc2-wt gestresst p= 0.0373; * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p<0.001

3.2.6 Sozialverhalten nach chronisch-sozialem Stress bei Tsc2+/- Mäusen

3.2.6.1 Social Interaction Test (SI)

Die Ergebnisse des SI Tests zeigten sowohl bei den heterozygoten Tsc2-Männchen, als auch den wildtypischen Geschwistertieren eine signifikante Erhöhung der sozialen Vermeidung im Vergleich mit den ungestressten Kontrollgruppen (Abb. 3.2.6.1). Desweiteren wurden weder bei den ungestressten noch bei den gestressten Gruppen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen gefunden.

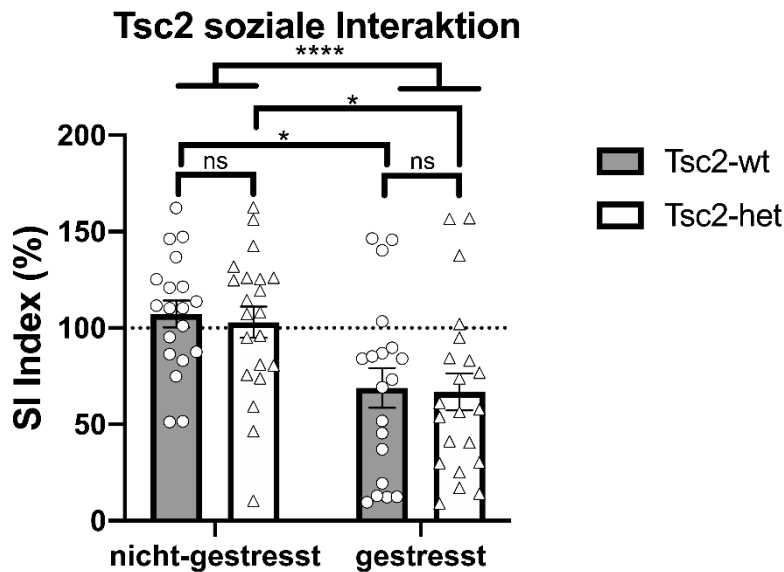


Abbildung 3.2.6.1: Ergebnis der Untersuchung der sozialen Interaktion bei ungestressten und gestressten *Tsc2* Mäusen. Balkendiagramm mit SEM. Nicht-gestresst:*Tsc2*-wt mit n=19, nicht-gestresst:*Tsc2*-het mit n = 21, gestresst:*Tsc2*-wt mit n= 18 und gestresst:*Tsc2*-het mit n= 21. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post hoc nicht-gestresst:*Tsc2*-wt vs. Nicht-gestresst:*Tsc2*-het p=0.9869; nicht-gestresst:*Tsc2*-wt vs gestresst:*Tsc2*-wt p= 0.0203; nicht-gestresst:*Tsc2*-wt vs gestresst:*Tsc2*-het p= 0.0103; nicht-gestresst:*Tsc2*-het vs. Gestresst:*Tsc2*-wt p=0.0408; nicht-gestresst:*Tsc2*-het vs. Gestresst:*Tsc2*-het p= 0.0216; gestresst:*Tsc2*-wt vs. Gestresst:*Tsc2*-het p= 0.9983 ; * p < 0.05, ** p < 0.01, ****p<0.001.

3.2.6.2 Social Novelty (SN)

Für die Analyse des Social Novelty Testung (s. 2.2.4.2.2) wurde im ersten Teil zunächst auf soziales Verhalten getestet. Hierfür wurden zunächst ein leerer Zylinder und ein Zylinder mit einer unbekanntem Maus dargeboten und die in direktem Kontakt um die Zylinder verbrachte Zeit (Schnüffelzeit) gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.2.6.2 dargestellt. Die ungestressten wildtypischen Mäuse verbrachten signifikant mehr Zeit mit der Maus als mit dem leeren Zylinder (Abb. 3.2.6.2 a). Auch die gestressten wildtypischen Mäuse verbrachten tendenziell mehr Zeit mit der Maus als mit dem leeren zylindrischen Käfig, jedoch war der Unterschied nicht signifikant (p = 0.0733). Bei den heterozygoten Tieren zeigte sich ein anderes Bild. Hier war bei beiden Gruppen (ungestresst, als auch gestresst) ein signifikanter Unterschied zwischen dem leeren Zylinder und dem Zylinder mit Maus zu erkennen. Die Ergebnisse zeigten, dass bei wildtypischen Tieren der Stress tendenziell zu einer verminderten Präferenz für die Maus und somit geringeren Sozialverhalten führt. Die *Tsc2* heterozygoten Tiere zeigten weder im ungestressten, noch im gestressten Zustand eine nennenswerte Beeinträchtigung. Im zweiten Teil des Tests waren keine signifikanten Unterschiede zu finden (Abb. 3.2.6.2 b). Tendenzuell verbrachten aber alle Gruppen mehr Zeit mit der neuen Maus (Maus 2), als mit der bereits bekannten (Maus 1).

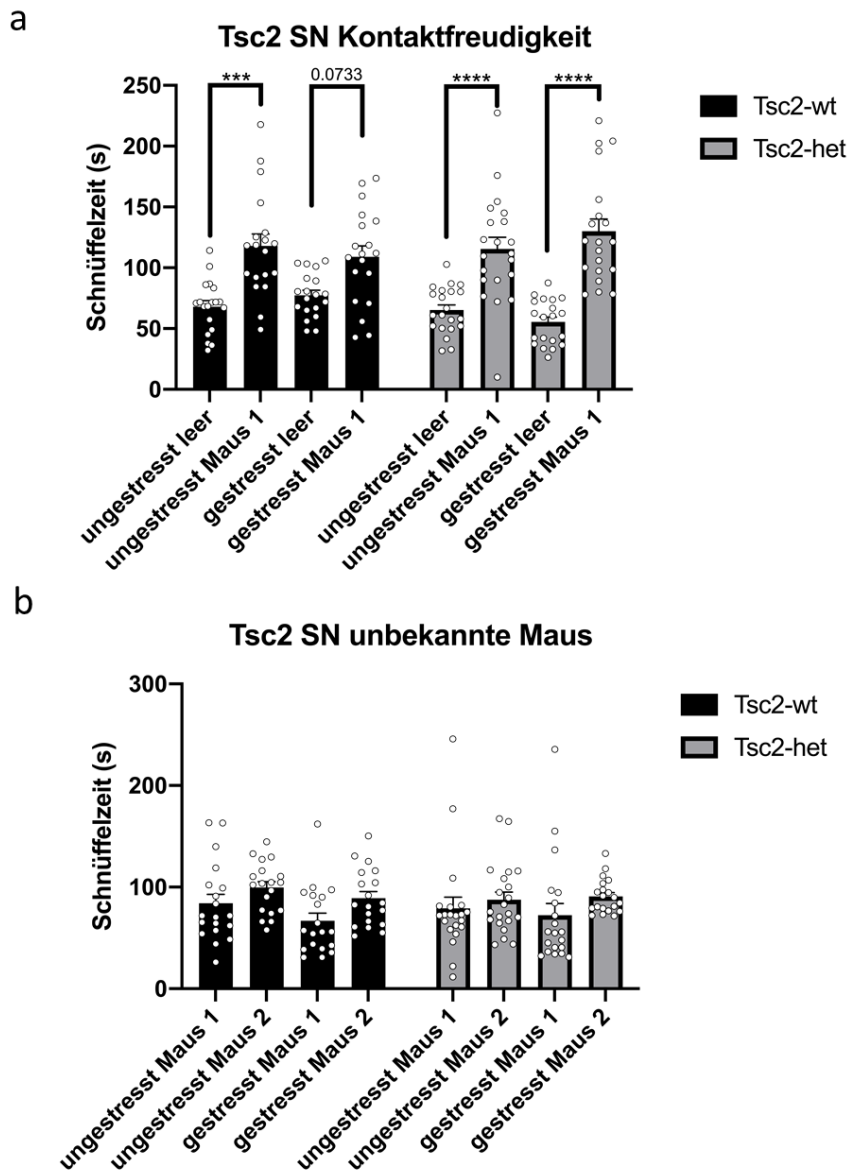


Abbildung 3.2.6.2: Ergebnis des Social Novelty Tests. a Kontaktfreudigkeit Balkendiagramm mit SEM. 2way ANOVA mit Tukey post hoc. ungestresst leer:Tsc2-wt ungestresst Maus 1:Tsc2-wt $p=0.0002$, gestresst leer:Tsc2-wt vs. Gestresst Maus 1:Tsc2-wt $p=0.0733$, ungestresst leer:Tsc2-het vs ungestresst Maus 1:Tsc2-het $p<0.0001$, gestresst leer:Tsc2-het vs gestresst Maus 1:Tsc2-het $p<0.0001$ **b unbekannte Maus** Balkendiagramm mit SEM. 2way ANOVA mit Tukey post hoc. ungestresst Maus1:Tsc2-wt vs ungestresst Maus 2:Tsc2-wt $p=0.8951$, gestresst Maus 1:Tsc2-wt vs. gestresst Maus 2:Tsc2-wt $p=0.5709$, ungestresst Maus 1:Tsc2-het vs ungestresst Maus 2:Tsc2-het $p=0.6497$ gestresst Maus 1:Tsc2-het vs gestresst Maus 2:Tsc2-het $p=0.7617$ * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p<0.001$.

3.2.7. Angstverhalten nach CSDS bei Tsc2^{+/-} Mäusen

Um das Angstverhalten der heterozygoten Tsc2 Mäuse zu analysieren wurden ein Elevated Plus Maze (s. 2.2.4.3.1) und ein Open Field Test (s. 2.2.4.3.2) durchgeführt.

3.2.7.1 Elevated Plus Maze (EPM)

Die Ergebnisse des EPM zeigten, dass die nicht-gestressten Tiere signifikant mehr Zeit in den offenen Armen verbrachten als die gestressten Tiere (Abb. 3.2.7.1). Die gestressten Tiere verhielten sich also ängstlicher als die ungestressten Tiere. Bei der Unterscheidung der Genotypen zeigte sich, dass die wildtypischen nicht-gestressten Mäuse signifikant mehr Zeit in den offenen Armen verbrachten als die gestressten Wildtypen. Für die heterozygoten Tsc2-Tiere war der Unterschied jedoch nicht signifikant. Dabei zeigte sich auch, dass die ungestressten Tsc2^{+/-} Mäuse tendenziell weniger Zeit in den offenen Armen verbrachten, als die ungestressten Wildtypen. Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Dies zeigte, dass die heterozygoten Tiere tendenziell ängstlicher waren als ihre wildtypischen Geschwistertiere.

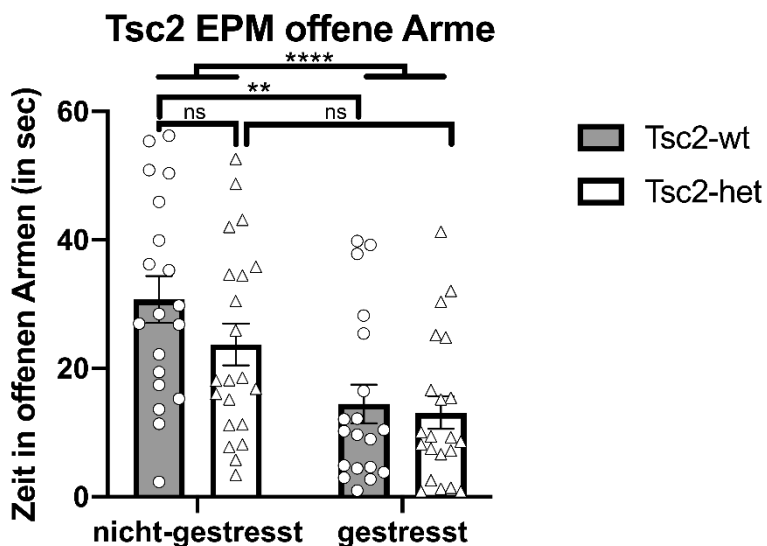


Abbildung 3.2.7.1: Ergebnis der Untersuchung des Angstverhaltens bei ungestressten und gestressten Tsc2 Mäusen mittels EPM. Balkendiagramm mit SEM. Nicht-gestresst:Tsc2-wt mit n= 19 , nicht-gestresst:Tsc2-het mit n = 21, gestresst:Tsc2-wt mit n= 19 und gestresst:Tsc2-het mit n= 21. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post hoc nicht-gestresst:nicht-gestresst vs gestresst: p<0.0001, Tsc2-wt vs Tsc2-het p= 0.1820. Tsc2-wt vs. Nicht-gestresst:Tsc2-het p=0.3892; nicht-gestresst:Tsc2-wt vs gestresst:Tsc2-wt p=0.0030 ; nicht-gestresst:Tsc2-wt vs gestresst:Tsc2-het p= 0.0008; nicht-gestresst:Tsc2-het vs. Gestresst:Tsc2-wt p=1611; nicht-gestresst:Tsc2-het vs. Gestresst:Tsc2-het p= 0.0713; gestresst:Tsc2-wt vs. Gestresst:Tsc2-het p= 0.9893 ; * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p<0.001.

3.2.7.2 Open Field (OF)

Im Open Field verbrachten die ungestressten Tiere signifikant mehr Zeit im Zentrum als die gestressten Tiere (Abb. 3.2.7.2 a). Das Zentrum bot den Tieren dabei weniger Schutz und wies aufgrund der geringeren Beschattung eine höhere Helligkeit auf. Eine Vermeidung des Zentrums kann also mit einem stärkeren Angstverhalten assoziiert werden. Zudem

verbrachten die heterozygoten Tiere dabei tendenziell weniger Zeit im Zentrum als ihre wildtypischen Geschwistertiere. Im Open Field wurde als weiterer Parameter die während der Testphase zurückgelegte Strecke gemessen. Hierbei zeigte sich, dass die gestressten Tsc2+/- Männchen im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant weniger Strecke zurücklegten (Abb.3.2.7 b). Duclot et al. haben bei Experimenten mit Ratten einen ähnlichen Phänotyp gesehen (Duclot et al., 2011). Sie assoziierten die geringe Lokomotion und das geringe Explorationsverhalten mit depressionsähnlichem Verhalten. Zusammenfassend ist für beide Tests festzustellen, dass gestresste Mäuse ein höheres Maß an Angst zeigten. Bei den gestressten Heterozygoten zeigten sich zudem Anzeichen eines depressionsähnlichen Phänotyps.

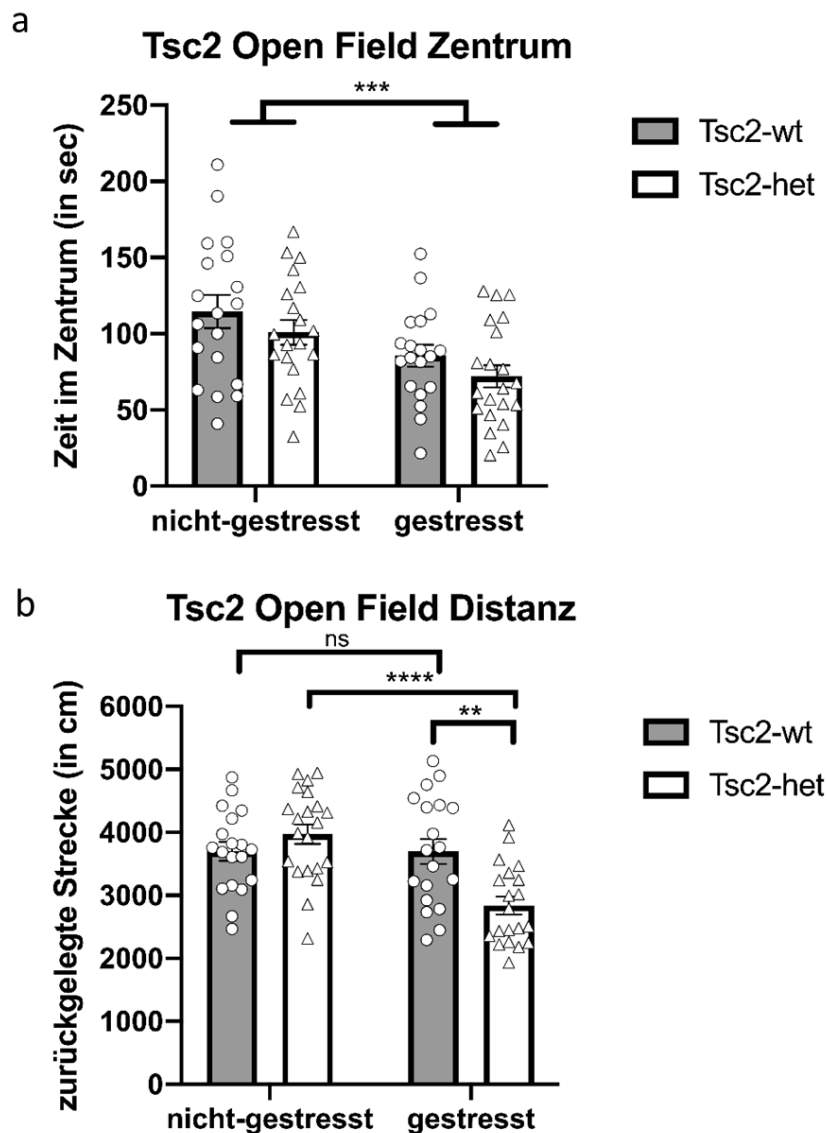


Abbildung 3.2.7.2: a Ergebnis der Untersuchung des Angstverhaltens im Open Field Tests bei ungestressten und gestressten Tsc2 Mäusen. Balkendiagramm mit SEM. Nicht-gestresst:Tsc2-wt mit n=19 , nicht-gestresst:Tsc2-het mit n =20, gestresst:Tsc2-wt mit n=19 und gestresst:Tsc2-het mit n=21. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's

Ergebnisse

multiple comparisons test post hoc. Nicht-gestresst vs gestresst $p=0.0009$; Tsc2-wt vs Tsc2-het $p=0.1141$. nicht-gestresst:Tsc2-wt vs. Nicht-gestresst:Tsc2-het $p=0.6719$; nicht-gestresst:Tsc2-wt vs gestresst:Tsc2-wt $p=0.0856$; nicht-gestresst:Tsc2-wt vs gestresst:Tsc2-het $p=0.0032$; nicht-gestresst:Tsc2-het vs. Gestresst:Tsc2-wt $p=0.5653$; nicht-gestresst:Tsc2-het vs. Gestresst:Tsc2-het $p=0.0715$; gestresst:Tsc2-wt vs. Gestresst:Tsc2-het $p=0.6722$ **b Ergebnis der Untersuchung der zurückgelegten Strecke im Open Field Tests bei ungestressten und gestressten Tsc2 Mäusen.** Balkendiagramm mit SEM. Nicht-gestresst:Tsc2-wt mit $n=19$, nicht-gestresst:Tsc2-het mit $n=21$, gestresst:Tsc2-wt mit $n=19$ und gestresst:Tsc2-het mit $n=20$. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post hoc. Nicht-gestresst vs gestresst $p=0.0008$; Tsc2-wt vs Tsc2-het $p=0.0759$ interaction $p=0.0008$. nicht-gestresst:Tsc2-wt vs. Nicht-gestresst:Tsc2-het $p=0.6188$; nicht-gestresst:Tsc2-wt vs gestresst:Tsc2-wt $p>0.9999$; nicht-gestresst:Tsc2-wt vs gestresst:Tsc2-het $p=0.0021$; nicht-gestresst:Tsc2-het vs. Gestresst:Tsc2-wt $p=0.6220$; nicht-gestresst:Tsc2-het vs. Gestresst:Tsc2-het $p<0.0001$; gestresst:Tsc2-wt vs. Gestresst:Tsc2-het $p=0.0020$; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

3.2.8 Kognition nach CSDS in Mäusen bei Tsc2+/- Mäusen

3.2.8.1 Y-Maze

Der Y-Maze Test (s. 2.2.4.4.2) sollte verwendet werden, um das Kurzzeitgedächtnis bei Mäusen zu bewerten (Krauter et al., 2019). Spontane Wechsel der Arme sind dabei ein Maß für das räumliche Arbeitsgedächtnis. Dieses konnte bewertet werden, indem man den Mäusen erlaubte, alle drei Arme des Labyrinths zu erkunden. Dabei wurde ausgenutzt, dass Nagetiere von einer angeborenen Neugier angetrieben, zuvor unbesuchte Bereiche zu erkunden. Mäuse mit intaktem räumlichem Arbeitsgedächtnis und somit funktionierenden präfrontalen Cortex erinnerten sich besser an den gerade besuchten Arm und zeigten eine Tendenz dazu den Arm aufzusuchen, in dem sie zuvor länger nicht gewesen waren. Die Ergebnisse des Y-Maze zeigten zum einen, dass die nicht-gestressten Tiere weniger spontane Richtungsänderungen machten als die gestressten Tiere (Abb. 3.2.8.1). Zum anderen zeigte der Vergleich von wildtypischen und heterozygoten Tieren, dass die heterozygoten Tiere mehr spontane Richtungsänderungen machten als ihre wildtypischen Geschwister. Es erscheint, als würde sowohl die Exposition zum Stress als auch der Defekt in einer Kopie des *Tsc2* Gens das räumliche Arbeitsgedächtnis verbessern.

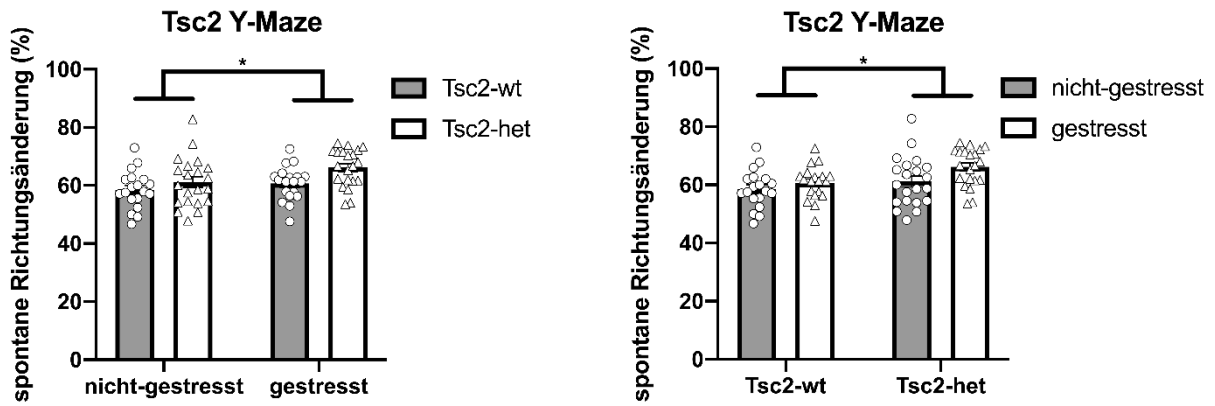


Abbildung 3.2.8.1: Ergebnis der Untersuchung der spatialen Gedächtniskonsolidierung bei ungestressten und gestressten Tsc2 Mäusen. Balkendiagramm mit SEM. Nicht-gestresst:Tsc2-wt mit $n=19$, nicht-gestresst:Tsc2-het mit $n=21$, gestresst:Tsc2-wt mit $n=19$ und gestresst:Tsc2-het mit $n=21$. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post hoc. Nicht-gestresst vs gestresst $p=0.0235$; Tsc2-wt vs Tsc2-het $p=0.0107$ interaction $p=0.3686$. nicht-gestresst:Tsc2-wt vs. Nicht-gestresst:Tsc2-het $p=0.6226$; nicht-gestresst:Tsc2-wt vs gestresst:Tsc2-wt $p=0.7662$; nicht-gestresst:Tsc2-wt vs gestresst:Tsc2-het $p=0.0045$; nicht-gestresst:Tsc2-het vs. Gestresst:Tsc2-wt $p=0.9965$; nicht-gestresst:Tsc2-het vs. Gestresst:Tsc2-het $p=0.0995$; gestresst:Tsc2-wt vs. Gestresst:Tsc2-het $p=0.0698$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.2.9. Generelles Wohlbefinden

3.2.9.1 Grooming

Körperpflege ist bei vielen Tierarten ein inertes Verhalten, welches in der Hygieneaufrechterhaltung und anderen physiologisch wichtigen Prozessen wie Thermoregulation, sozialer Kommunikation oder Entregung eine Rolle spielt (Kalueff et al., 2015). Die Beurteilung des Körperpflegeverhaltens von Nagetieren ist für die translationale neurowissenschaftliche Forschung potenziell nützlich, da eine abweichende Körperpflege mit menschlichen Störungen assoziiert werden kann. Daher wurde für diese Arbeit im Rahmen eines Grooming Tests (s. 2.2.4.5.1) die Zeit gemessen, welche die Tiere mit Körperpflege verbrachten. Die Analyse zeigte, dass die nicht-gestressten wildtypischen Tiere im Mittel 28,4207 s mit Körperpflege verbrachten (Abb. 3.2.9.1). Im Vergleich dazu wendeten die nicht-gestressten heterozygoten Tiere im Mittel mehr Zeit für die Körperpflege auf (36,2879 s). Die gemessenen mittleren Zeiten waren sowohl für die gestressten wildtypischen Tiere (36,338s) als auch die gestressten heterozygoten Tiere (36,4165 s) ebenfalls höher als die der nicht-gestressten Tiere. Kein Unterschied wurde bei der gestressten Gruppe zwischen den Genotypen (wt vs. Tsc2-het) gefunden. Aufgrund der hohen Standardabweichungen waren die beobachteten Unterschiede jedoch nicht signifikant.

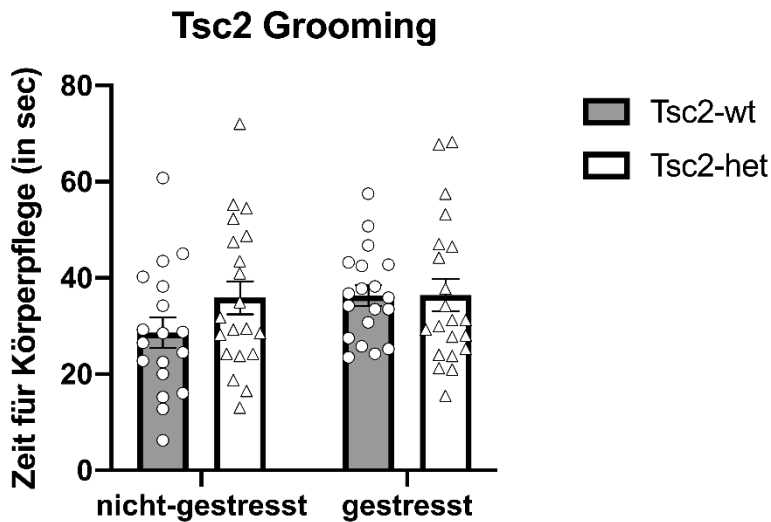


Abbildung 3.2.9.1: Ergebnis der Untersuchung des Groomingverhaltens bei ungestressten und gestressten Tsc2 Mäusen. Balkendiagramm mit SEM. Nicht-gestresst:Tsc2-wt mit n=19 , nicht-gestresst:Tsc2-het mit n=21, gestresst:Tsc2-wt mit n=19 und gestresst:Tsc2-het mit n=21. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post hoc. Nicht-gestresst vs gestresst p=0.1855; Tsc2-wt vs Tsc2-het p=0.2389 interaction p=0.2490. nicht-gestresst:Tsc2-wt vs. Nicht-gestresst:Tsc2-het p=0.3628; nicht-gestresst:Tsc2-wt vs gestresst:Tsc2-wt p=0.3193; nicht-gestresst:Tsc2-wt vs gestresst:Tsc2-het p= 0.2900; nicht-gestresst:Tsc2-het vs. Gestresst:Tsc2-wt p=9996; nicht-gestresst:Tsc2-het vs. Gestresst:Tsc2-het p=0.9993; gestresst:Tsc2-wt vs. Gestresst:Tsc2-het p>0.9999 ; * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p<0.001.

3.2.10 Testung auf depressive Verhaltensweisen nach chronisch-sozialem Stress bei Tsc2^{+/-}-Mäusen

3.2.10.1 Sugar Preference Test (SPT)

Zum Abschluss der Verhaltensbatterie wurden der Sugar Preference Test und der Tail Suspension Test durchgeführt, die auf depressive Verhaltensweisen testen sollten. Der Sugar Preference Test nutzt Anhedonie als Kernsymptom von Depressionen. Anhedonie ist die Unfähigkeit, Freude durch Belohnungen oder Annehmlichkeiten zu empfinden. Beim Sugar Preference Test wird dies durch den Konsum von Zuckerwasser getestet (s. 2.2.4.6.1). Die Ergebnisse zeigten, dass die nicht-gestressten Wildtypen das Zuckerwasser zu 75,2498 % präferierten (Abb. 3.2.10.1). Die nicht-gestressten heterozygoten Tiere hatten mit 63,6806% eine geringere Präferenz für das angezuckerte Wasser. Auch die gestressten wildtypischen Mäuse zeigten mit 63,8782% eine geringere Präferenz als ihre ungestresste Vergleichsgruppe. Die Gruppe der gestressten Heterozygoten hatte mit 73,0908 % Zuckerpräferenz im Mittel einen höheren Wert als die nicht-gestressten Heterozygoten und die gestressten wildtypischen Geschwistertiere. Während also sowohl die nicht-gestressten heterozygoten Tiere, als auch die gestressten Wildtypen eine geringere Präferenz für das angezuckerte Wasser zeigten, erreichten die gestressten Heterozygoten einen ähnlichen Wert wie die ungestressten Wildtypen. Es scheint also, als würde die Exposition gegenüber Stress

die heterozygoten Tsc2 Tiere aus der Ahedonie bringen. Es fällt auf, dass die individuellen Unterschiede im Verhalten hier sehr hoch sind. Daher waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu detektieren.

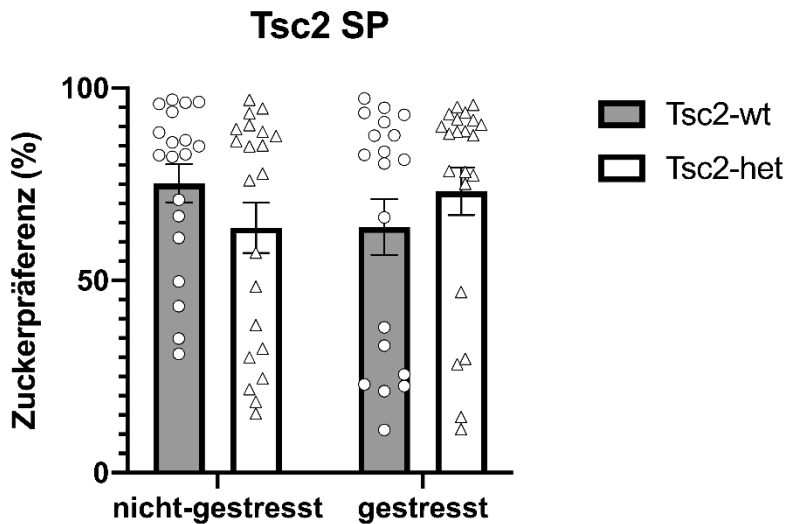


Abbildung 3.2.10.1: Ergebnis der Untersuchung der Zuckerpräferenz bei ungestressten und gestressten Tsc2 Mäusen. Balkendiagramm mit SEM. Nicht-gestresst:Tsc2-wt mit n=19, nicht-gestresst:Tsc2-het mit n=21, gestresst:Tsc2-wt mit n=19 und gestresst:Tsc2-het mit n=21. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post hoc. Nicht-gestresst vs gestresst p=0.8769; Tsc2-wt vs Tsc2-het p=0.8524 interaction p=0.1038. nicht-gestresst:Tsc2-wt vs. Nicht-gestresst:Tsc2-het p=0.5682; nicht-gestresst:Tsc2-wt vs gestresst:Tsc2-wt p=0.6015; nicht-gestresst:Tsc2-wt vs gestresst:Tsc2-het p= 0.9950; nicht-gestresst:Tsc2-het vs. Gestresst:Tsc2-wt p>0.9999; nicht-gestresst:Tsc2-het vs. Gestresst:Tsc2-het p=0.7018; gestresst:Tsc2-wt vs. Gestresst:Tsc2-het p= 0.7312 ; * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p<0.001.

3.2.10.2 Tail Suspension

Der Tail Suspension Test ist ein Verhaltenstest für Mäuse der zur Messung von verzweifelterm Verhalten oder "depressionsähnlichem" Verhalten und erlernter Hilflosigkeit dient. Er ist nützlich für das Screening von potenziellen Antidepressiva und bei der Bewertung anderer Manipulationen, die depressionsbedingte Verhaltensweisen beeinflussen (Steru et al., 1985; Can et al., 2012). Für den Tail Suspension Test wurden die Mäuse für 6 Minuten am Schwanz aufgehängt. Es wurde die Latenzzeit bis zur ersten Inaktivität bestimmt und die Gesamtzeit der Inaktivität innerhalb der fünf letzten Minuten gemessen (s. 2.2.4.6.2). Die Auswertung der Gesamtzeit der Inaktivität innerhalb der letzten fünf Minuten der Testzeit zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 3.2.10.2 a). In der Gruppe der nicht-gestressten Tiere wiesen die heterozygoten Tiere im Mittel eine höhere Inaktivitätszeit auf, als die wildtypische Vergleichsgruppe. Betrachtete man hingegen die Gruppe der gestressten Tiere, wiesen hier die Wildtypen tendenziell (nicht signifikant) eine höhere Inaktivitätszeit auf. Die Inaktivitätszeit der gestressten Heterozygoten bewegte sich im Mittel auf dem Niveau der nicht-gestressten Wildtypen. Die Analyse der Latenz erbrachte keine signifikanten

Unterschiede (Abb. 3.2.10.2 b). Jedoch zeigte sich, dass die Zeitspanne bis zur ersten Inaktivität bei den heterozygoten Tieren im Vergleich zu den Wildtypen tendenziell etwas größer war. Im Vergleich war die Zeitspanne bis zur ersten Inaktivität bei den gestressten Tieren größer als bei den Ungestressten.

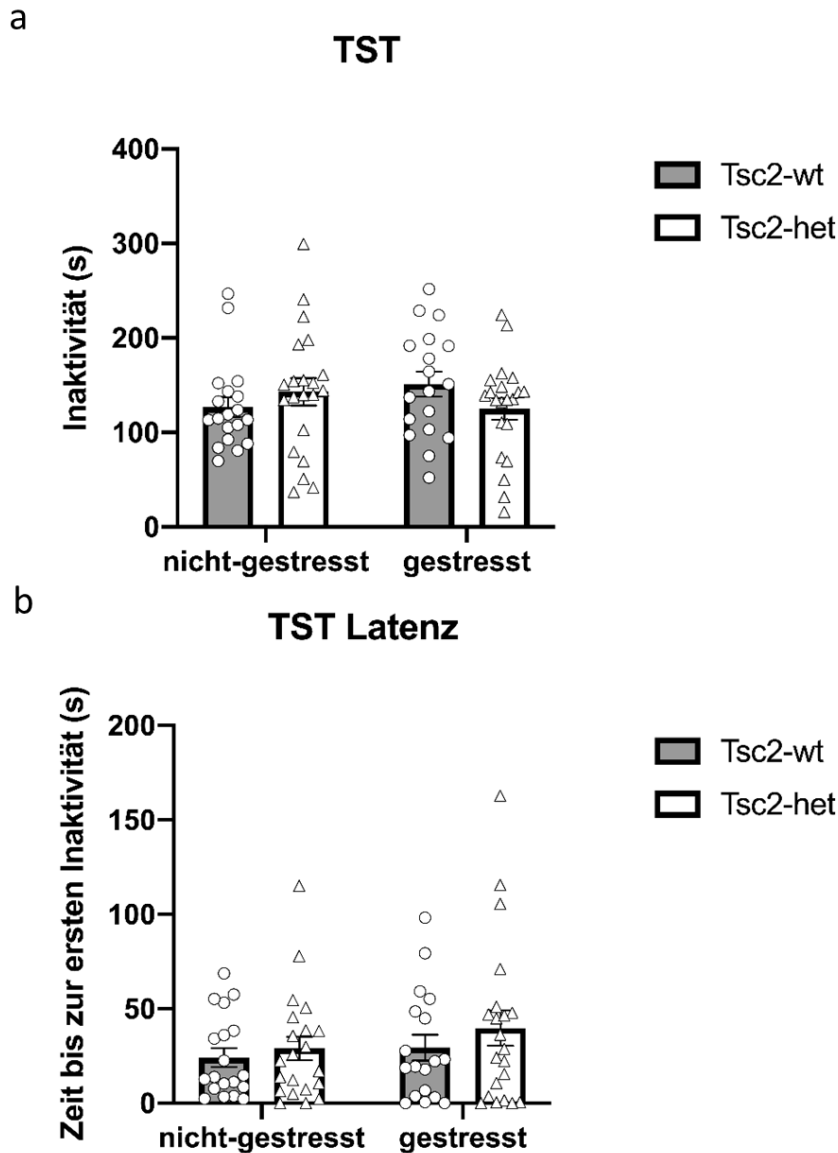


Abbildung 3.2.10.2: a Ergebnis der Untersuchung der Inaktivität beim Tail Suspension Test bei ungestressten und gestressten Tsc2 Mäusen. Balkendiagramm mit SEM. Nicht-gestresst:Tsc2-wt mit n=19 , nicht-gestresst:Tsc2-het mit n =21, gestresst:Tsc2-wt mit n=19 und gestresst:Tsc2-het mit n=21. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post hoc. Nicht-gestresst vs gestresst p=0.1008; Tsc2-wt vs Tsc2-het p=0.8109 interaction p=0.6954 nicht-gestresst:Tsc2-wt vs. Nicht-gestresst:Tsc2-het p=0.8030; nicht-gestresst:Tsc2-wt vs gestresst:Tsc2-wt p=0.5635; nicht-gestresst:Tsc2-wt vs gestresst:Tsc2-het p= 0.9995; nicht-gestresst:Tsc2-het vs. Gestresst:Tsc2-wt p=0.9705; nicht-gestresst:Tsc2-het vs. Gestresst:Tsc2-het p=0.7274; gestresst:Tsc2-wt vs. Gestresst:Tsc2-het p= 0.4773 **b Ergebnis der Untersuchung der Latenz beim Tail Suspension Test bei ungestressten und gestressten Tsc2 Mäusen.** Balkendiagramm mit SEM. Nicht-gestresst:Tsc2-wt mit n=19 , nicht-gestresst:Tsc2-het mit n =21, gestresst:Tsc2-wt mit n=19 und gestresst:Tsc2-het mit n=21. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post hoc. Nicht-gestresst vs gestresst p=0.2677; Tsc2-wt vs Tsc2-het p=0.2908 interaction p=0.7040 nicht-gestresst:Tsc2-wt vs. Nicht-gestresst:Tsc2-het p=0.9619; nicht-gestresst:Tsc2-wt vs gestresst:Tsc2-wt p=0.9579; nicht-gestresst:Tsc2-wt vs gestresst:Tsc2-het p= 0.4115; nicht-gestresst:Tsc2-het vs. Gestresst:Tsc2-wt p>0.9999; nicht-gestresst:Tsc2-het vs. Gestresst:Tsc2-het p=0.6938; gestresst:Tsc2-wt vs. Gestresst:Tsc2-het p= 0.7413 * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p<0.001.

3.3 Verhaltensversuche mit Mäusen mit veränderter Endothel-und Koagulationskaskade nach chronisch sozialem Stress

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte die Beeinträchtigung der Integrität der BHS untersucht werden. Hierzu wurde ein Mausmodell verwendet, bei dem die BHS aufgrund einer genetischen Veränderung nur eingeschränkt funktioniert. Bei den verwendeten Mausstämmen waren Teile des *Procr* – Gens mit flox-Sequenzen flankiert worden. Das Gen kodiert den endothelial protein c receptor (*EPCR*) (vgl. 1. 7.4.2.). Durch Parrung mit einem Stamm, der die Cre-Rekombinase gewebspezifisch exprimiert, wurde ein vollständiger Knock-Out des Rezeptors in allen endothelialen und hämatopoetischen Zellen erreicht. Die Cre-negativen Tiere dienten als wildtypische Kontrollen. In dem anderen Modell, das in dieser Arbeit zum Einsatz kam, entstand spontan eine Mutation in der Palmitoylierungsstelle von EPCR (*EPCR^{C/S}*). Dies führte zu einer veränderten subzellulären Lokalisation und in der Folge zu einem Funktionsverlust von EPCR in der Signaltransduktion. Dieser Stamm wurde mit dem ursprünglichen Stamm ohne Mutation verglichen (*EPCR^{flox129}*). Das Fehlen von EPCR resultiert in einer Störung der Barriere der BHS und in breiten pro-inflammatorischen Effekten.

Die Mäuse wurden zunächst einem 10-tägigen Stressparadigma unterzogen. Eine Woche nach Beendigung des chronisch sozialen Stresses durchliefen die Tiere eine Verhaltensbatterie aus SI Test, EPM, 24h NORT und Nest Building.

3.3.1 Sozialverhalten nach chronisch-sozialem Stress in Mäusen mit Defekt im *Procr* Gen

3.3.1.1 Social Interaction Test (SI)

Die Ergebnisse des Stammes mit Knock Out von *Procr* zeigten für die ungestressten Tiere einen mittleren SI Index von 120,369 (*EPCR^{del} KO*, nicht-gestresst) (Abb. 3.3.1.1. a). Dieser war damit tendenziell, aber nicht signifikant, niedriger als der Index der ungestressten wildtypischen Geschwistertiere (158,004). Im Vergleich dazu zeigten die gestressten Tiere eine signifikant niedrigere soziale Interaktionsfähigkeit. Der mittlere SI-Index der gestressten wildtypischen Tiere (gestresst, *EPCR^{del} wt*) betrug 50,1436 und für die gestressten KO-Mäuse (gestresst, *EPCR^{del} KO*) lag er bei 42,1403. Zwischen den beiden gestressten Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den SI-Index gefunden. Jedoch zeigte sich, dass in der Gruppe der gestressten *EPCR^{del} wt* drei Tiere mit einem Wert über 100 zu finden waren. Diese drei Tiere waren per Definition Resiliente. Das entsprach 17,65 % aller gestressten Tiere (Abb.3.3.1.2 a). Im Gegensatz dazu war innerhalb der Gruppe der gestressten *EPCR^{del} KO* kein Tier mit einem Wert über 100 zu finden. In der Gruppe der gestressten Tiere mit KO von *Procr* gab es somit keine Resilienten.

Für den Stamm mit Mutation in der Palmitoylierungsstelle zeigte sich eine ähnliche Verteilung. Der mittlere SI-Index betrug für die ungestressten EPCRC/S Mäuse 138,829 und 177,599 für die ungestressten Kontrolltiere (EPCRflox129, Abb. 3.3.1.1 b). In der Gruppe der gestressten Tiere lag der Mittelwert bei 158,637 für die Kontroll-EPCRflox129 Tiere und bei 56,4331 für die EPCRC/S Tiere. In der Gruppe der gestressten EPCRC/S Mäuse waren ebenfalls keine Resilienten Tiere zu finden (Abb. 3.3.1.1 b und Abb. 3.3.1.2 b). Im Gegensatz dazu wiesen 4 von 6 Tieren in der gestressten Kontroll-EPCRflox129 Gruppe einen Wert über 100 auf. Dies entsprach einem Anteil von 66,67 % der Gruppe (Abb. 3.3.1.2 b). Diese Gruppe zeigte somit, im Vergleich mit der für C57BL/6-Mäuse bekannten Verteilung, einen hohen Anteil Resilienter Tiere.

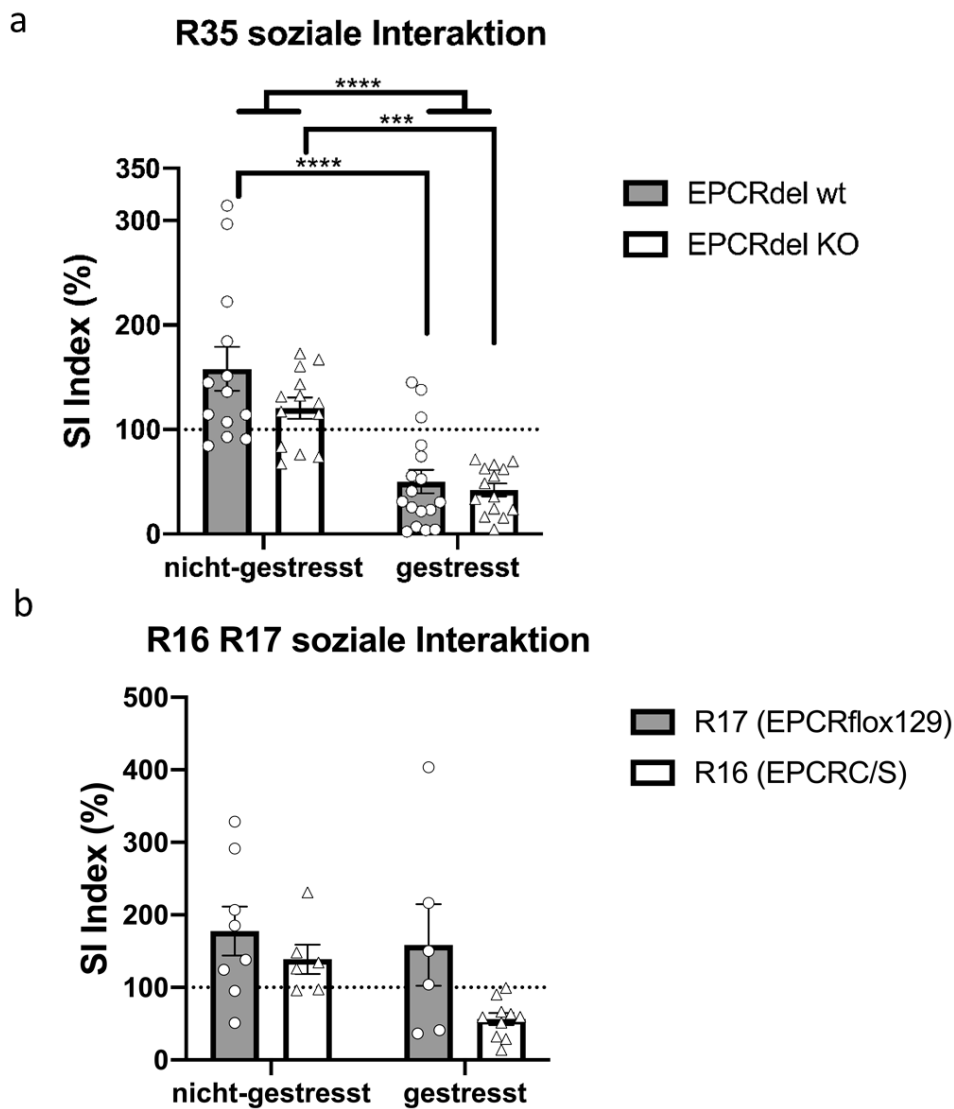
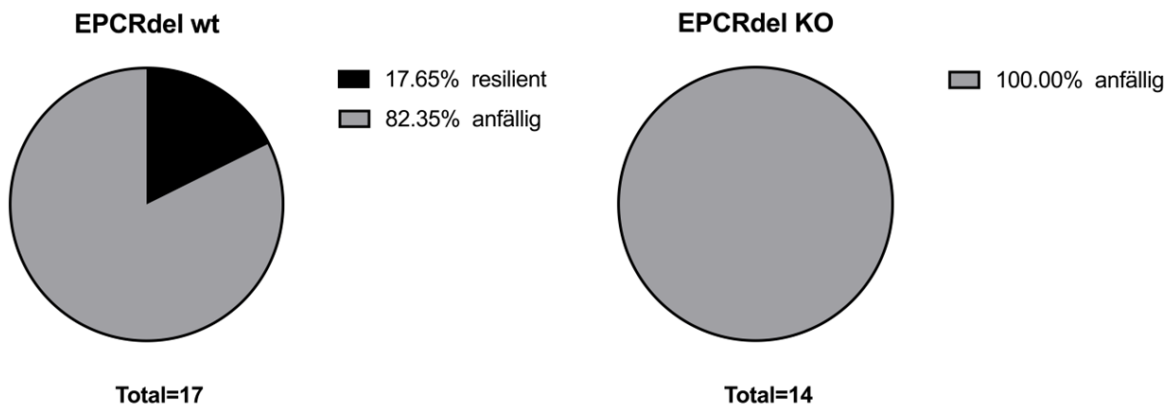


Abbildung 3.3.1.1: a Ergebnis der Untersuchung der sozialen Interaktion von Tieren mit EPCR Defizienz. Balkendiagramm mit SEM. EPCRdel wt:nicht-gestresst mit n= 13, EPCRdel KO:nicht-gestresst mit n=13, EPCRdel wt:gestresst n= 17 und EPCRdel KO :gestresst mit n= 14. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post hoc. Nicht-gestresst:EPCRdel wt vs nicht-gestresst:EPCRdel KO p=0.2131; nicht-gestresst:EPCRdel wt vs.

Ergebnisse

gestresst:EPCRdel wt $p < 0.0001$; nicht-gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel KO $p < 0.0001$; nicht-gestresst:EPCRdel KO vs gestresst:EPCRdel wt $p = 0.0015$; nicht-gestresst:EPCRdel KO vs. Gestresst:EPCRdel KO $p = 0.0006$; gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel KO $p = 0.9684$ **b Ergebnis der Untersuchung der sozialen Interaktion von Tieren mit veränderter EPCR Lokalisation** Balkendiagramm mit SEM. nicht-gestresst:R17 (EPCRflox129) mit $n = 8$, nicht-gestresst:R16 (EPCRC/S) mit $n = 5$, gestresst:R17 (EPCRflox129) mit $n = 6$, gestresst:R16 (EPCRC/S) mit $n = 10$. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons tset post hoc. Nicht-gestresst:R17 (EPCRflox129) vs. Nicht-gestresst:R16 (EPCRC/S) $p = 0.8210$, nicht-gestresst.R17 (EPCRflox129) vs. Gestresst:R17 (EPCRflox129) $p = 0.9737$, nicht-gestresst:R17 (EPCRflox129) vs. Gestresst:R16 (EPCRC/S) $p = 0.0230$, nicht-gestresst:R16 (EPCRC/S) vs. gestresst.R17 (EPCRflox129) $p = 0.9754$, nicht-gestresst:R16 (EPCRC/S) vs gestresst:R16 (EPCRC/S) $p = 0.2405$, gestresst:R17 (EPCRflox129) vs. Gestresst:R16 (EPCRC/S) $p = 0.1032$ * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

a



b

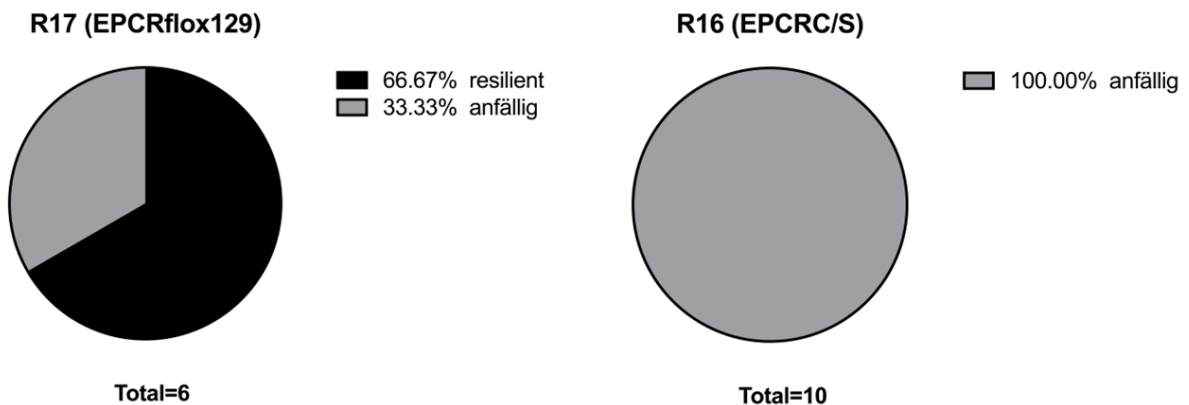


Abbildung 3.3.1.2: Relative Verteilung der Resilienten und der stressAnfälligeen Tiere innerhalb der Stressgruppe zu den bei den EPCR-KO Tieren und ihren wildtypischen Geschwistern (a) und dem Stamm mit veränderter Lokalisation von EPCR mit dem entsprechenden wildtypischen Kontrollstamm (b)

3.3.2 Angstverhalten nach chronisch-sozialem Stress in Mäusen mit Defekt im *Procr* Gen

3.3.2.1 Elevated Plus Maze (EPM)

Um das Angstverhalten zu analysieren wurde ein EPM durchgeführt. Für die Tiere mit *Procr* Defizienz zeigte die Analyse der aus dem EPM gewonnenen Daten, dass die nicht-gestressten Tiere signifikant mehr Zeit in den offenen Armen verbrachten, als die gestressten Tiere (Abb. 3.3.2.1 a). Die nicht-gestressten wildtypischen Tiere verbrachten tendenziell (nicht signifikant) mehr Zeit in den offenen Armen als ihre gestresste Vergleichsgruppe. Zusammengefasst zeigte dies, dass die nicht-gestressten Tiere signifikant mehr Zeit in den offenen Armen verbrachten als die gestressten Tiere.

Für den Stamm mit veränderter Lokalisation von EPCR und dessen Kontrollstamm konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Die gestressten Tiere explorierten die offenen Arme in ähnlichem Ausmaß, wie die ungestressten Tiere. Im Vergleich zu dem Stamm mit Verlust von EPCR zeigten beide Stämme generell höhere mittlere Explorationszeiten (R17 (EPCRflox129): nicht-gestresst = 41,89 s; R16 (EPCRC/S: nicht-gestresst = 58,2933s; R17 (EPCRflox129):gestresst = 46,0133 s; R16 (EPCRC/S: gestresst = 37,416 s) (Abb. 3.3.2.1 b).

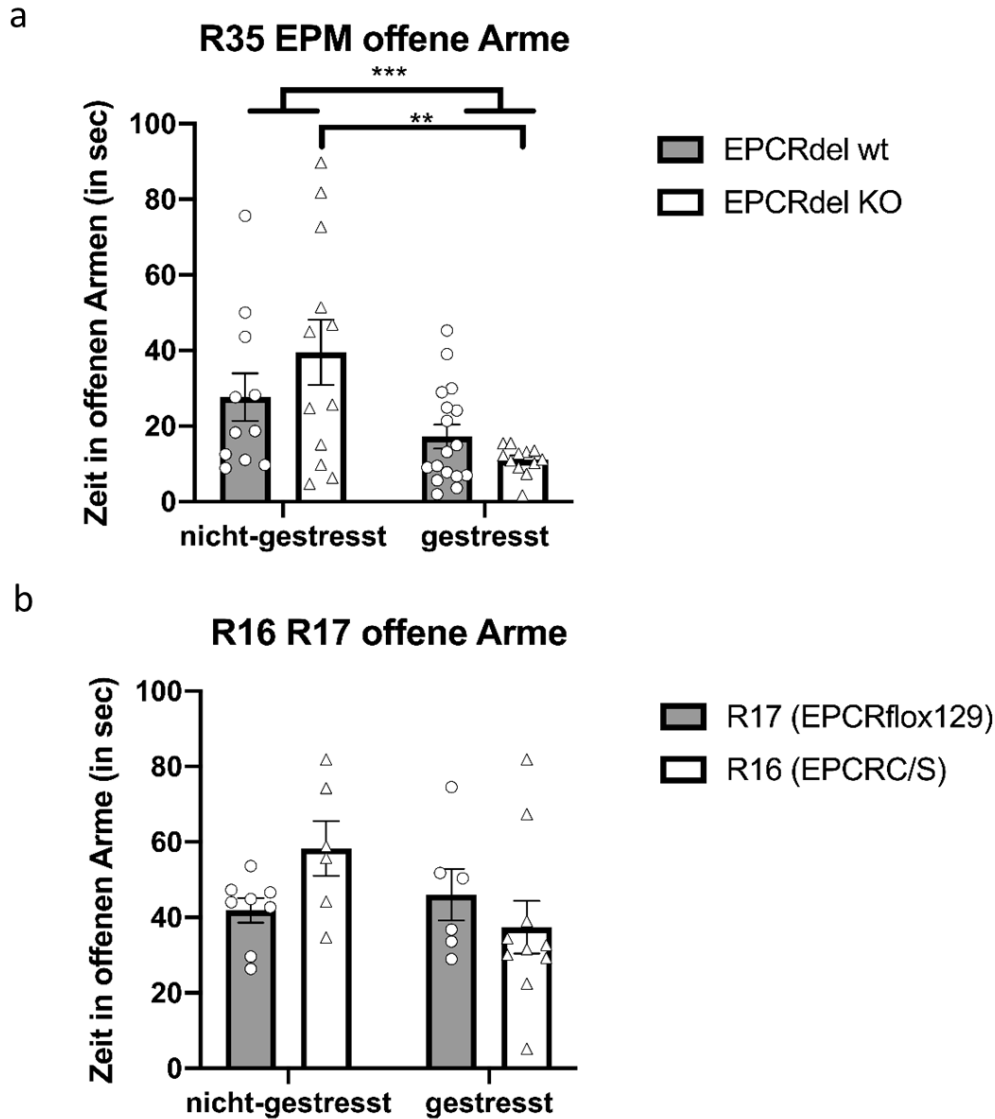


Abbildung 3.3.2.1: a Ergebnis der Untersuchung der sozialen Interaktion bei ungestressten und gestressten von Tieren mit EPCR Defizienz. Balkendiagramm mit SEM. EPCRdel wt:nicht-gestresst mit n = 13, EPCRdel KO:nicht-gestresst mit n = 13, EPCRdel wt:gestresst n = 17 und EPCRdel KO :gestresst mit n= 14. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post Nicht-gestresst:EPCRdel wt vs nicht-gestresst:EPCRdel KO p = 0.4455; nicht-gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel wt p = 0.4869; nicht-gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel KO p=0.1662; nicht-gestresst:EPCRdel KO vs. Gestresst:EPCRdel wt p = 0.0153; nicht-gestresst:EPCRdel KO vs. Gestresst:EPCRdel KO p = 0.0031; gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel KO p = 0.8243 **b Ergebnis der Untersuchung der sozialen Interaktion bei ungestressten und gestressten von Tieren mit veränderter EPCR Lokalisation.** Balkendiagramm mit SEM. R17 (EPCRflox129):nicht-gestresst mit n = 8, R16 (EPCRC/S):nicht-gestresst mit n = 6, R17 (EPCRflox129):gestresst n = 6 und R16 (EPCRC/S):gestresst mit n= 10. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post Nicht-gestresst:EPCRdel wt vs nicht-gestresst:EPCRdel KO p = 0.3220; nicht-gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel wt p = 0.9712; nicht-gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel KO p=0.9479; nicht-gestresst:EPCRdel KO vs. Gestresst:EPCRdel wt p = 0.6190; nicht-gestresst:EPCRdel KO vs. Gestresst:EPCRdel KO p = 0.1188; gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel KO p = 0.7749; * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p<0.001.

3.3.3 Kognitive Leistung nach CSS in Mäusen mit Defekt im *Procr* Gen

3.3.3.1 24 h Novel Object Recognition Task (24 h NORT)

Zur Testung der kognitiven Leistungsfähigkeit wurde ein 24h NORT durchgeführt. Der Diskriminierungsindex zeigte für die nicht-gestressten Cre-negativen Tiere mit intaktem *Procr* Gen mit 0,164028 einen ähnlichen Wert wie für C57BL6J zum gleichen Zeitpunkt in der longitudinalen Analyse (vgl. 3.1.1.2). Ähnlich den Ergebnissen der C57BL6J Tiere in der longitudinalen Analyse zeigten auch hier die gestressten wildtypischen Tiere mit intaktem *Procr* Gen eine signifikante Reduktion der Diskriminierung (Abb. 3.3.3.1 a). Die nicht-gestressten Tiere mit Knock-out von *Procr* wiesen ebenfalls einen niedrigeren Diskriminierungsindex auf (-0.020). Der Unterschied zu den nicht-gestressten Tieren mit intaktem *Procr* war hier jedoch nicht signifikant. Für die gestressten Tiere mit Verlust von *Procr* kehrte sich dieser Effekt um. Sie zeigten einen den ungestressten wildtypischen Tieren vergleichbaren mittleren Diskriminierungsindex (0.187951). Die Exposition gegenüber Stress scheint somit in den EPCR-KO Tiere zu einer Verbesserung des Langzeitgedächtnisses zu führen.

Beim Stamm mit Mutation in der Palmitoylierungsstelle und dem entsprechenden Kontrollstamm konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abb. 3.3.3.1 b). Der mittlere Diskriminierungsindex war jedoch sowohl bei den nicht-gestressten Mäusen mit Defekt (0.0708087), als auch bei den beiden jeweiligen Stressgruppen (0.105821 und 0.0892389) tendenziell niedriger als bei den ungestressten Tieren mit wildtypischen Allelen.

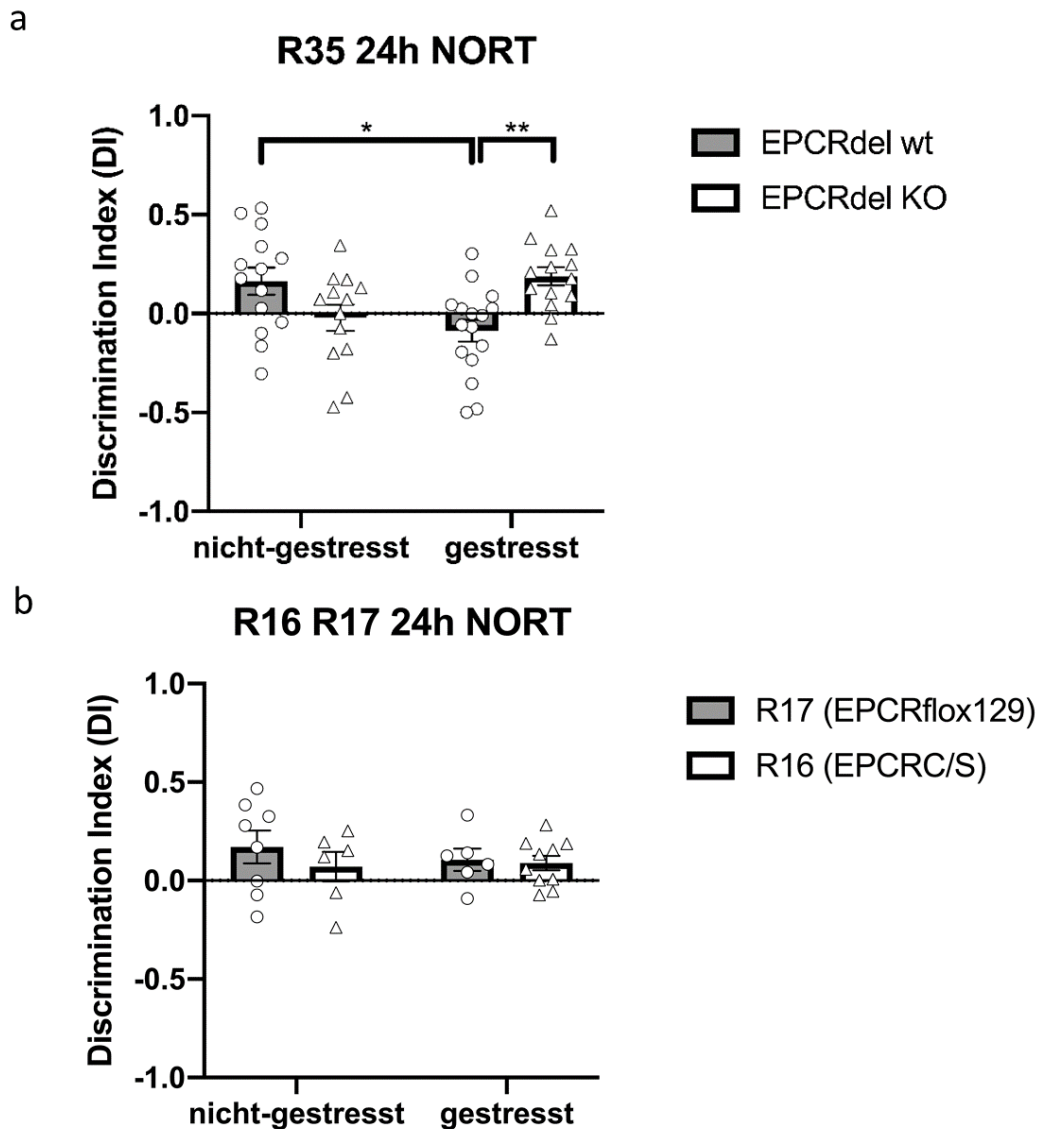


Abbildung 3.3.3.1 : a Ergebnis der Untersuchung der kognitiven Leistung bei ungestressten und gestressten von Tieren mit EPCR Defizienz. Balkendiagramm mit SEM. EPCRdel wt:nicht-gestresst mit n = 13, EPCRdel KO:nicht-gestresst mit n = 13, EPCRdel wt:gestresst n = 16 und EPCRdel KO :gestresst mit n= 14. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post. EPCRdelwt vs. EPCRdel KO p= 0.7246 ; nicht-gestresst vs. Gestresst p= 0.4536.. Nicht-gestresst:EPCRdel wt vs nicht-gestresst:EPCRdel KO p = 0.1561; nicht-gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel wt p = 0.0182; nicht-gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel KO p= 0.9921; nicht-gestresst:EPCRdel KO vs. Gestresst:EPCRdel wt p = 0.8591; nicht-gestresst:EPCRdel KO vs. Gestresst:EPCRdel KO p = 0.0876; gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel KO p = 0.0081; * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p<0.001 **b Ergebnis der Untersuchung der kognitiven Leistung bei ungestressten und gestressten von Tieren mit veränderter EPCR Lokalisation** Balkendiagramm mit SEM. R17 (EPCRflox129):nicht-gestresst mit n = 8, R16 (EPCRC/S):nicht-gestresst mit n = 6, R17 (EPCRflox129):gestresst n = 6 und R16 (EPCRC/S):gestresst mit n= 10. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post Nicht-gestresst:EPCRdel wt vs nicht-gestresst:EPCRdel KO p = 0.7079; nicht-gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel wt p = 0.8964; nicht-gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel KO p=0.7517; nicht-gestresst:EPCRdel KO vs. Gestresst:EPCRdel wt p = 0.9849; nicht-gestresst:EPCRdel KO vs. Gestresst:EPCRdel KO p = 0.9968; gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel KO p = 0.9977; * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p<0.001.

3.3.4 Nestbauverhalten nach CSS in Mäusen mit Defekt im Procr Gen

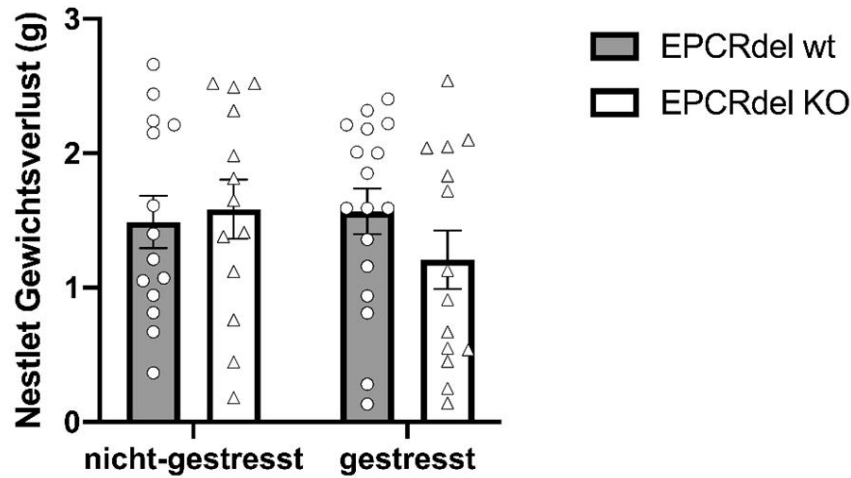
3.3.4.1 Nest Building (NB)

Zum Abschluss der Verhaltensbatterie wurde das Nestbauverhalten der Mäuse analysiert. Hierbei wurde zum einen die Qualität des Nestbaus bewertet und zum anderen wurde gemessen, wieviel Nistmaterial verwendet wurde. Für den Stamm mit Deletion von *Procr* zeigten sich sowohl bei der Bewertung des Nests, als auch bei der verwendeten Nistmaterialmenge keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.3.4.1.1 a und b). Allerdings zeigten die gestressten KO-Tiere sowohl bei der Bewertung des Nestbaus als auch dem verwendeten Material tendenziell schwächere Werte als die anderen Gruppen.

Auch für den Stamm mit funktionellem Defekt in der Palmitoylierungsstelle und dem entsprechenden Kontrollstamm wurden sowohl für Nestbauqualität als auch Nestmaterialverbrauch keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen gefunden (Abb. 3.3.4.1.2 a und b).

a

R35 Nestbau Nestlet Gewichtsverlust



b

R35 Nestbau Bewertungsskala

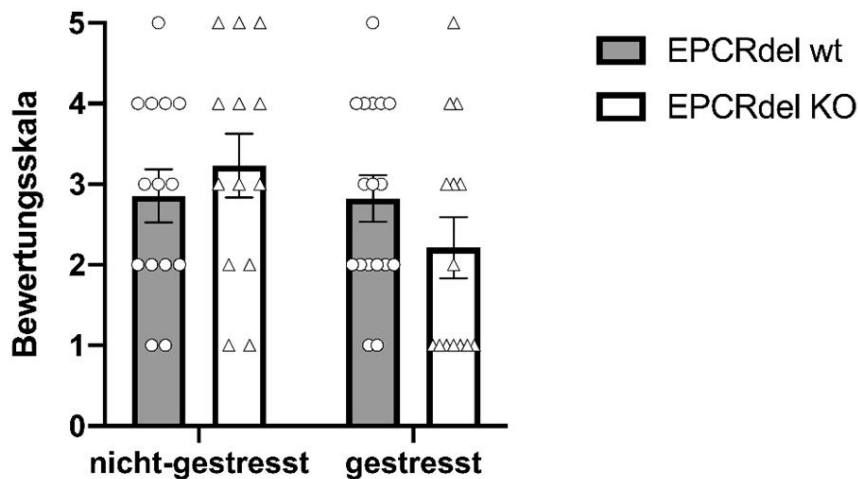
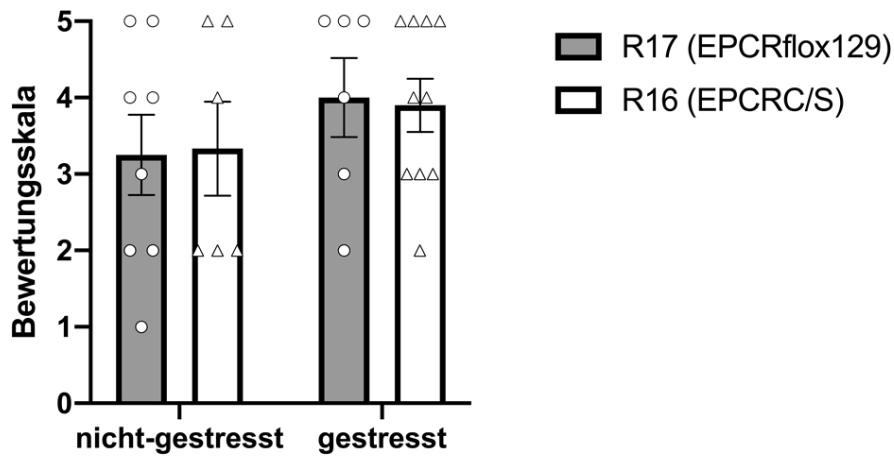


Abbildung 3.3.4.1.1: a Ergebnis der Untersuchung des Nestbauverhaltens bei ungestressten und gestressten von Tieren mit EPCR Defizienz. Balkendiagramm mit SEM. EPCRdel wt:nicht-gestresst mit n = 13, EPCRdel KO:nicht-gestresst mit n = 13, EPCRdel wt:gestresst n = 17 und EPCRdel KO :gestresst mit n= 14. EPCRdel wt vs. EPCRdel KO p= 0.4616; nicht-gestresst vs. Gestresst p= 0.5126 Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post Nicht-gestresst:EPCRdel wt vs nicht-gestresst:EPCRdel KO p = 0.9876; nicht-gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel wt p = 0.9913; nicht-gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel KO p=0.7625; nicht-gestresst:EPCRdel KO vs. Gestresst:EPCRdel wt p > 0.9999; nicht-gestresst:EPCRdel KO vs. Gestresst:EPCRdel KO p = 0.5739; gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel KO p = 0.5575 **b Ergebnis der Untersuchung des Nestbauverhaltens bei ungestressten und gestressten von Tieren mit veränderter EPCR Lokalisation.** Balkendiagramm mit SEM. EPCRdel wt:nicht-gestresst mit n = 13, EPCRdel KO:nicht-gestresst mit n = 13, EPCRdel wt:gestresst n = 17 und EPCRdel KO :gestresst mit n= 14. EPCRdel wt vs. EPCRdel KO p= 0.; nicht-gestresst vs. Gestresst p= 0.5126 Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post Nicht-gestresst:EPCRdel wt vs nicht-gestresst:EPCRdel KO p = 0.8806; nicht-gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel wt p = 0.9999; nicht-gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel KO p=0.5688; nicht-gestresst:EPCRdel KO vs. Gestresst:EPCRdel wt p = 0.8337; nicht-gestresst:EPCRdel KO vs. Gestresst:EPCRdel KO p = 0.1961; gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel KO p = 0.5748; * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p<0.001

a

R16 R17 Nestbau Bewertungsskala

b

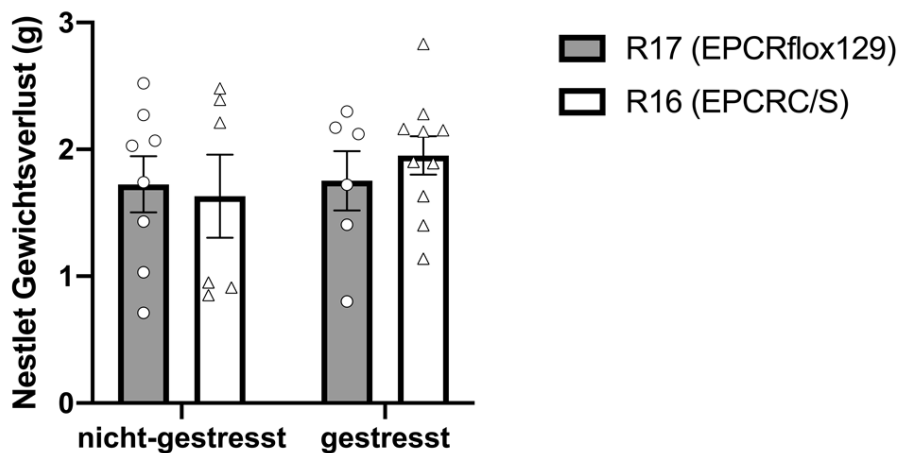
R16 R17 Nestbau Gewichtsverlust

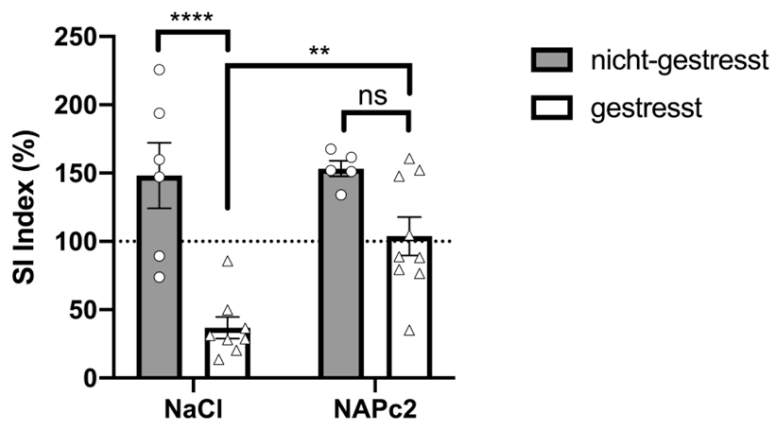
Abbildung 3.3.4.1.2: a Ergebnis der Untersuchung des Nestbauerhaltens bei ungestressten und gestressten von Tieren mit EPCR Lokalisation. Balkendiagramm mit SEM. R17 (EPCRflox129):nicht-gestresst mit n = 8, R16 (EPCRC/S):nicht-gestresst mit n = 6, R17 (EPCRflox129):gestresst n = 6 und R16 (EPCRC/S):gestresst mit n= 10. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post Nicht-gestresst:EPCRdel wt vs nicht-gestresst:EPCRdel KO p = 0.9994; nicht-gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel wt p = 0.7238; nicht-gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel KO p=0.7318; nicht-gestresst:EPCRdel KO vs. Gestresst:EPCRdel wt p = 0.8199; nicht-gestresst:EPCRdel KO vs. Gestresst:EPCRdel KO p = 0.8410; gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel KO p = 0.9989 **b Ergebnis der Untersuchung des Nestbauerhaltens bei ungestressten und gestressten von Tieren mit EPCR Lokalisation.** Balkendiagramm mit SEM. R17 (EPCRflox129):nicht-gestresst mit n = 8, R16 (EPCRC/S):nicht-gestresst mit n = 6, R17 (EPCRflox129):gestresst n = 6 und R16 (EPCRC/S):gestresst mit n= 10. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post Nicht-gestresst:EPCRdel wt vs nicht-gestresst:EPCRdel KO p = 0.9919; nicht-gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel wt p = 0.9998; nicht-gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel KO p=0.8608; nicht-gestresst:EPCRdel KO vs. Gestresst:EPCRdel wt p = 0.9858; nicht-gestresst:EPCRdel KO vs. Gestresst:EPCRdel KO p = 0.7412; gestresst:EPCRdel wt vs. Gestresst:EPCRdel KO p = 0.9203* p < 0.05, ** p < 0.01, ***p<0.001.

3.3.5 Sozialverhalten nach chronisch-sozialem Stress in Mäusen mit Defekt im *Procr* Gen und anschließender NAPc2 Behandlung

Im letzten Experiment wurde untersucht inwieweit durch Gabe des Thrombin Inhibitors NAPc2 eine Verbesserung des Phänotyps im Sozialverhalten in den Palmitylierungs-defizienten Tieren erreicht werden konnte. Hierfür wurden Mäuse vom Stamm EPCR (EPCRC/S) für 10 Tage gestresst bzw. als ungestresste Kontrollen gehalten. Anschließend wurde den Tieren über einen Zeitraum von einer Woche täglich NAPc2 oder Kochsalzlösung (Vehikel) injiziert. 8 Tage nach Beendigung der Stressprozedur wurden die Tiere in einem Social Interaction Test auf ihr Sozialverhalten getestet.

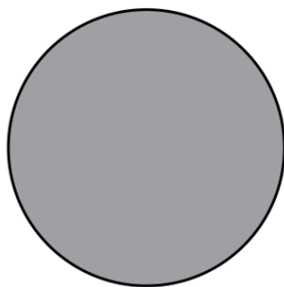
Die Auswertung zeigte, dass die gestressten, mit Vehikel behandelten Tiere im Mittel einen signifikant niedrigeren Wert aufwiesen als die ungestressten Kontrolltiere. Auch fanden sich in der gestressten Gruppe keine resilienten Tiere (Abb. 3.3.5). Dies bestätigte das in 3.3.1.1 erhaltene Ergebnis. Im Unterschied zu den mit Kochsalzlösung behandelten Mäusen zeigte sich bei den NAPc2 behandelten Tieren eine andere Verteilung. Die gestressten, mit NAPc2 injizierten Mäuse zeigten im Mittel einen signifikant höheren SI Index als die gestressten, mit Vehikel Injizierten. Vier Mäuse in der Gruppe der mit dem Inhibitor behandelten Gruppe wiesen zudem einen Wert über 100 auf und konnten somit als Resiliente klassifiziert werden. Dies entsprach einem Anteil von 44,44% Resilienten (Abb. 3.3.5 b). Der Unterschied zwischen den nicht-gestressten und den gestressten NAPc2 behandelten Tieren war nicht signifikant. Auch der Vergleich der beiden nicht-gestressten Gruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied. Zusammengefasst zeigte dieses Ergebnis, dass die Gabe von NAPc2 zu einer signifikanten Verbesserung der sozialen Interaktion in der Gruppe führte.

a soziale Interaktion nach Gabe von NAPc2



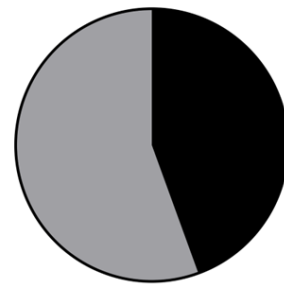
b

R16 (EPCRC/S) DMSO



Total=8

R16 (EPCRC/S) NAPc2



Total=9

Abbildung 3.3.5: Ergebnis der Untersuchung der sozialen Interaktion bei ungestressten und gestressten von Tieren mit veränderter EPCR Lokalisation: a Balkendiagramm mit SEM. nicht-gestresst: NaCl mit n = 6, gestresst:NaCl mit n= 8, nicht-gestresst:NAPc2 mit n=5, gestresst:NAPc2 mit n= 9. Untersuchung der Signifikanzen mit 2way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test post hoc. gestresst:NaCl vs. gestresst:NAPc2 p= 0.0076, gestresst:NaCl vs. Nicht-gestresst:NaCl p<0.0001, gestresst:NaCl vs. Nicht-gestresst: NAPc2 p=0.0001, gestresst:NAPc2 vs. Nicht-gestresst:NaCl p= 0.1521, gestresst:NAPc2 vs. Nicht-gestresst:NAPc2 p=0.1234, nicht-gestresst:NaCl vs. Nicht-gestresst:NAPc2 p=0.9964 * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p<0.001 b Tortendiagramm der Anteile an Resilienten und Anfälligen bei den mit Vehikel (links) und den mit dem Inhibitor behandelten gestressten Tieren (rechts)

4 Diskussion

4.1 Longitudinale Verhaltensanalyse bei C56BL6/JRj nach chronisch sozialem Stress (CSS)

4.1.1 Verhaltensanalysen in C57BL/JRj zu unterschiedlichen Zeitpunkten

In der vorliegenden Arbeit wurde das Sozialverhalten und die Gedächtniskonsolidierung von wildtypischen C57BL/6 Mäusen nach chronisch sozialem Stress longitudinal charakterisiert. Dazu durchliefen männliche C57BL/6 Mäuse im Alter von 12 Wochen zunächst ein chronisch soziales Stressparadigma. Danach wurden die Mäuse auf ihr Sozialverhalten und ihre Objektrekognition getestet. Im ersten Experiment erfolgte die Testung an drei verschiedenen Zeitpunkten. Der erste Zeitpunkt (T1) wurde bei 24 Stunden, der zweite Zeitpunkt (T2) bei 7 Tagen und der dritte Zeitpunkt (T3) bei 3 Wochen nach Beendigung des chronisch sozialen Stressparadigmas definiert. Die Mäuse wurden dabei nur zu einem Zeitpunkt getestet, also entweder zu T1 oder T2 oder T3. Im zweiten Experiment wurden die Tiere ebenfalls zu drei Zeitpunkten getestet. Hierbei wurde T1 durch einen vierten Zeitpunkt (T4) bei 6 Wochen nach Beendigung des chronisch sozialen Stresses ersetzt. Im zweiten Experiment wurden dieselben Mäuse zu allen Zeitpunkten getestet. Es fand also eine wiederholte Testung statt. Die Ergebnisse zeigen, dass zusätzlich zum SI-Verhalten auch die Erkennung neuer Objekte in einer Testumgebung mit 24 Stunden zwischen Probe und Testphase bei C57BL/6J-Mäusen 7 Tage nach der letzten Niederlage einer CSD-Exposition beeinträchtigt ist. Es war keine Korrelation zwischen beeinträchtigtem SI und neuartigem Objekterkennungsverhalten zum 7-Tage-Zeitpunkt (T2) zu finden. Dies spricht für einen unabhängigen Einfluss von CSD auf das Sozialverhalten und das Objektgedächtnis. Dies wird auch durch die unterschiedlichen longitudinalen Verläufe beider Verhaltensmerkmale nach der CSD-Exposition unterstützt. Die Beeinträchtigung der Erkennung neuer Objekte wurde nur bei T2, nicht aber bei T1 beobachtet und schien sich dann bei T3 zu verbessern, zeigte aber bei T4 wieder eine Beeinträchtigung. Das SI-Verhalten hingegen schien bereits bei T1 beeinträchtigt zu sein und blieb bis T3 beeinträchtigt. Bei T4 jedoch schien sich das SI-Verhalten bei der Betrachtung der Gruppendynamik zu erholen.

Mehrere Hirnregionen wurden mit sozialer Vermeidung und depressivem Verhalten nach CSD-Exposition in Verbindung gebracht, darunter der präfrontale Kortex, die Amygdala, der ventrale tegmentale Bereich, der ventrale Hippocampus und der Nucleus accumbens (Bagot et al., 2016; Hultman et al., 2018; Mayberg et al., 2005; Nestler et al., 2002). Die Erkennung neuer Objekte, bei der 24 Stunden zwischen Test- und Probephase liegen, wurde dem Hippocampus zugeordnet (Antunes und Biala, 2012; Hammond et al., 2004). Die Daten legen nahe, dass

Stress beide Schaltkreise unabhängig voneinander beeinflusst. Darüber hinaus zeigen sie, dass Gedächtnisstörungen nach Stress keinen Einfluss auf das soziale Interaktionsverhalten haben und dass die Konnektivität zwischen diesen beiden Verhaltensdomänen gering ist.

Die Gruppenleistung nach CSD im sozialen Interaktionstest war bereits bei T1 beeinträchtigt, blieb bei T2 und T3 niedrig und stieg bei T4 wieder an. Interessanterweise war die soziale Interaktionsaktivität sowohl bei gestressten als auch bei nicht gestressten Tieren nach dem ersten Test reduziert. Dieser Effekt könnte auf eine Abnahme des Interesses der nicht mehr naiven Tiere zurückzuführen sein. Untersuchungen an verschiedenen Mäusestämmen haben gezeigt, dass das Durchlaufen einer Verhaltenstestbatterie und die wiederholte Exposition gegenüber einem bestimmten Verhaltenstest aufgrund der Gewöhnung und des Lernens aus früheren Erfahrungen zu Veränderungen der emotionalen Zustände und Reaktionen führen kann (Cnops et al., 2022).

Trotz allem waren signifikante Unterschiede in der Gruppenleistung zwischen Kontroll- und gestressten Tieren bei T2 und T3 zu erkennen (Abbildung 3.1.2.1.1 a), während bei T4 die Kontroll- und gestressten Gruppen ähnlich abschnitten, was auf eine Erholung der gestressten Tiere bei T4 hindeutet. Dies könnte auf einen Extinktions-Prozess der sozialen Vermeidung zurückzuführen sein, wie er bereits zuvor diskutiert wurde (Ayash et al., 2020). Die Daten sprechen für zugrundeliegende molekulare und funktionelle Effekte, die sich während oder kurz nach der CSD-Exposition etablieren und einen Anpassungsprozess verursachen, der schließlich zur vollständigen Erholung bei T4 führt. Die einzelnen Spuren zeichnen jedoch ein viel komplizierteres und dynamischeres Bild.

Betrachtet man die Tiere, die bei T2 nach der Stressbelastung am besten abschnitten, so fielen drei von fünf bei T4 deutlich unter den Wert von 100 SI-Scores, der als Schwellenwert für Resilientes bzw. Anfälliges Verhalten gilt. Vier von fünf Tieren aus der Gruppe mit den schlechtesten Leistungen erholten sich dagegen zwischen T2 und T4 signifikant, und zwei erreichten Werte über 100 SI-Scores und erfüllten damit das Kriterium der Resilienz. Diese Beobachtungen deuten auf einen dynamischen Prozess hin. Anstatt nur zwei Gruppen zu definieren, nämlich Resiliente und Anfällige zu einem Zeitpunkt, der relativ nahe an der CSD-Exposition liegt, belegen unsere Daten die Existenz von vier Gruppen: (i) resilient kurz nach dem chronisch sozialen Stress und immer noch resilient bei T4, (ii) resilient kurz nach der dem chronisch sozialen Stress und sich später entwickelnde Beeinträchtigungen, (iii) anfällig kurz nach dem chronisch sozialen Stress und, obwohl sich die Situation verbessert, immer noch beeinträchtigt im SI-Verhalten bei T4 und (iv) anfällig kurz nach dem chronisch sozialen Stress, aber mit einer Erholung zur Resilienz bei T4.

Die Erkennung neuer Objekte ist bei T1 unbeeinflusst, nimmt bei T2 ab, durchläuft dann eine Erholungsphase bei T3 und neigt schließlich dazu, bei T4 nach CSD-Exposition wieder abzunehmen. Dies deutet darauf hin, dass die molekularen Mechanismen, die NORT

beeinflussen, für einige Tage nach der Exposition stabil bleiben, bevor sie abfallen. Dies könnte ein Hinweis auf die Beteiligung von Proteinen oder mRNA mit einer langen Halbwertszeit sein, die abgebaut werden müssen, bevor eine Wirkung erkannt werden kann. Gleichzeitig unterliegt die Beeinträchtigung der Erkennung neuer Objekte vorübergehenden Veränderungen, die zu einer Erholung bei T3 führen. Dies deutet auf kurzfristige homöostatische Prozesse hin, die in der Zeit zwischen T2 und T4 einsetzen und versuchen, die durch chronischen Stress verursachten Auswirkungen zu kompensieren. Alternativ zu den Reparaturmechanismen der durch CSD-Stress verursachten molekularen Veränderungen könnte die Erholung auch auf aktive Anpassungsprozesse zurückzuführen sein, die z.B. Veränderungen in der Gen-/Proteinexpression schnell kompensieren können. Der Rückgang des Objekterkennungsverhaltens bei T4 spricht jedoch für einen hochdynamischen und komplexen homöostatischen Prozess, der mit der Zeit unterschiedliche Auswirkungen auf das Verhalten hat.

Beim Menschen ist die PTBS (posttraumatische Belastungsstörung) eine pathologische Reaktion auf ein Stress-Trauma, die sich erheblich auf die Lebensqualität der betroffenen Patienten auswirkt. PTBS ist definiert als eine Kombination von Symptomen aus vier Symptomclustern, die nach einem traumatischen Ereignis auftreten und länger als einen Monat anhalten (Watkins et al., 2018; Shalev et al., 1998). Ähnlich wie bei Mäusen können menschliche Probanden eine sofortige oder schnelle Reaktion auf Stress als akute Belastungsstörung (weniger als 48 Stunden nach dem Ereignis) oder eine Anpassungsstörung (mehr als eine Woche und weniger als einen Monat nach dem Ereignis) zeigen, die psychologische und kognitive Symptome umfassen kann (Shalev et al., 1998). Sie erholen sich dann entweder oder zeigen und entwickeln weiterhin Symptome, die möglicherweise zu einer PTBS führen. Obwohl sich die Lebensspannen von Menschen und Mäusen erheblich unterscheiden, folgen die molekularen Mechanismen, die wahrscheinlich den Stressreaktionen zugrunde liegen, einschließlich der Protein- und mRNA-Stabilität, der Transkription und Translation sowie der epigenetischen Markierung, ähnlichen Zeitskalen. Ein Mausmodell für stressinduzierte Resilienz oder Anfälligkeit sollte dies berücksichtigen und das Langzeitverhalten im Längsschnitt betrachten. Die Tatsache, dass unsere Daten keine Korrelationen zwischen kurz- und langfristigem Verhalten nach CSD zeigen, deutet darauf hin, dass die Unterscheidung zwischen resilientem und anfälligem Ergebnis nicht kurz nach der Stressbelastung in dem hier verwendeten CSD-Modell getroffen werden sollte. Wie bereits früher vorgeschlagen (Kalisch et al., 2019) und durch die in dieser Arbeit generierten Daten bestätigt, ist die Anpassung nach einer chronischen sozialen Niederlage kein Schwarz-Weiß-Schema für Resilienz oder Anfälligkeit, sondern ein dynamischer Prozess, bei dem homöostatische Mechanismen die Hirnnetzwerke auf wellenförmige Weise zu beeinflussen scheinen. Möglicherweise wird der Weg in die Pathologie durch zusätzliche Faktoren

beeinflusst, die zu verschiedenen Zeitpunkten und in verschiedenen Stadien nach der CSD-Exposition auf das Netzwerk einwirken können oder auch nicht. Es könnte dann eine wichtige Rolle spielen, in welchem Stadium sich das Netzwerk befindet. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass nur durch die Einbeziehung von Längsschnittbeobachtungen der Verhaltensreaktionen erwachsener Tiere das chronisch soziale Stressparadigma ein plausibles Modell für die komplexen Störungen der psychischen Funktionen beim Menschen nach Traumata, sein kann. Es wäre daher auch interessant zu sehen, wie sich das Verhalten erwachsener Tiere im Längsschnitt in anderen Modellen von chronischem Stress entwickelt.

4.1.2 Expressionsstudien von aktivitätsabhängigen Genen in Gedächtniskonsolidierenden Gehirnregionen

Auf der Grundlage der im sozialen Interaktionstest gewonnenen Ergebnissen konnte angenommen werden, dass die Entwicklung depressiver Verhaltensweisen auf eine veränderte funktionelle Aktivität innerhalb der Hirnregionen des mesokortikolimbischen Systems zurückzuführen ist. Um diese Annahme zu bestätigen wurden Expressionsstudien der aktivitätsabhängigen Gene *Arc*, *c-Fos* und *Zif268* zwischen ungestressten Kontrolltieren, ausgewählten Resilienten und ausgewählten Anfälligen durchgeführt. Die Gene gehören zur Gruppe der sogenannten IEGs, welche aufgrund ihrer schnellen Transkription infolge einer Verhaltenserfahrung als Aktivitätsmarker in Neuronen verwendet werden (Kubik et al., 2007). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Mäuse, welche psychosozialen Stress ausgesetzt waren, eine stressbedingte Plastizität durch epigenetische Veränderungen bei bestimmten Genen wie dem neurotrophen Faktor des Gehirns (BDNF) und den IEGs entwickeln (Rusconi et al., 2016; Tsankova et al., 2006; Covington et al., 2010). Für dieses Vorhaben wurden C57BL/6 Tiere einer chronisch sozialen Stressprozedur unterzogen oder als ungestresste Kontrollen gehalten und nach einer Woche in einem Social Interaction Test getestet (vgl. 2.2.4.2.1). Nach Beendigung des Social Interaction Tests wurden die Tiere abgetötet und die Gehirne mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Basierend auf den Daten des Sozialverhaltens wurden die gestressten Tiere in Resiliente und Anfällige klassifiziert. Aus der ungestressten Kontrollgruppe, der Gruppe der Resilienten und der Gruppe der Anfälligen wurden jeweils sechs Tiere ausgewählt. Für die Expressionsstudien wurden PFC, Nacc, Hippocampus und VTA an einem Kryostaten präpariert und für die Analyse mittels qPCR aufbereitet (vgl. 2.2.2.3). Die Expressionsanalysen zeigten für keines der untersuchten IEGs in keiner der analysierten Gehirnregionen signifikante Expressionsunterschiede zwischen Kontrollen, Resilienten und Anfälligen (3.1.3.3).

Zinkfingerprotein 268, ist ein aktivitätsabhängiger neuronaler Transkriptionsfaktor, der über drei verschiedene Zinkfingerdomänen an die DNA bindet (Manning et al., 2017). Er scheint

eine Rolle bei der neuronalen Plastizität zu spielen. Die Expression von *Zif268* im mPFC wurde positiv mit sozialem Verhalten korreliert (Stack et al., 2010; Covington et al., 2010). Covington et al. beschrieben eine verringerte Expression von *Zif268* im mPFC von resilienten und anfälligen Tieren im Vergleich zu nicht-gestressten Kontrollen. Die Autoren dieser Studie stellten zudem fest, dass die Arc Expression in Resilienten Tieren höher war als in stressanfälligen Tieren. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, ähnlich der Resultate von Covington et al. einen (nicht-signifikanten) Trend zu einer Reduktion der Expression von *Zif268* in gestressten Tiere im Vergleich zu den nicht-gestressten Kontrollen. Zudem zeigen sie auch eine tendenziell höhere Expression von Arc im Vergleich mit den anderen beiden Gruppen (vgl). Arc wird im adulten Gehirn konstitutiv exprimiert (Covington et al., 2010). Abweichungen von der basalen Expression sind daher schwieriger zu detektieren. Weder die in der hier vorgelegten Arbeit generierten Ergebnisse noch die in der Literatur gezeigten Resultate zeigen signifikante Unterschiede in der Expression von Arc im PFC. Es ist festzuhalten, dass die Ergebnisse der Expressionsanalyse der aktivitätsabhängigen Gene im PFC dieser Arbeit die Resultate der Literatur weitgehend stützen.

Die soziale Erkennung wird in Nagern zu einem großen Teil durch den Hippocampus vermittelt (Liu et al., 2022). Strukturell handelt es sich um einen Schaltkreis bei dem die Information zunächst im entorhinalen Cortex (EC) ankommt und dann sequentiell über den Gyrus dentatus (DG) sowie die CA3 und CA1- Subregionen im Hippocampus verarbeitet wird. Nach chronisch sozialem Stress weisen gestresste BALB/c Mäuse im CA3 Kern eine geringere Expression an c-Fos auf als ungestresste Kontrollen (Okamura et al., 2022). Der Transkriptionsfaktor c-fos wird vorübergehend stark induziert und hat eine Halbwertszeit von Minuten bis zu einigen Stunden (Manning et al., 2017). Es wird angenommen, dass er auf eine Vielzahl von Genen reguliert, die mit Zelldifferenzierung, Zell- und Synapsenentwicklung, synaptischer Plastizität und Lernen verbunden sind (Manning et al., 2017). Die direkte Verknüpfung zu zellulärer Aktivität hat dazu geführt, dass er als Marker für die Aktivierung von Hirnregionen nach Herausforderung in Verhaltenstests verwendet wird (Manning et al. 2017). Allerdings ist seine direkte Rolle für neuronalen Funktionen noch nicht vollständig geklärt (Manning et al. 2017).

Im Gegensatz zu der Studie von Okamura zeigte eine ältere Studie keine Veränderung der frühen aktivitätsabhängigen Genen in den hippocampalen Regionen Gyrus dentatus, CA1 und CA3 von gestressten Mäusen im Vergleich zu ungestressten Tieren (Matsuda et al., 1996). Auch die in dieser Arbeit generierten Daten zeigten keine signifikanten Unterschiede.

In vielen Studien werden jugendliche C57BL6 Männchen für den chronisch sozialen Stress verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten C57BL/6 Männchen waren junge erwachsene Tiere. Ein erhöhte Stresssensitivität während der Jugendphase reflektiert altersabhängige Unterschiede in der Expression von aktivitätsabhängigen Genen, die die synaptische

Plastizität beeinflussen. Es konnte in Ratten gezeigt werden, dass chronisch sozialer Stress in Jugend- bzw. früher Erwachsenenphase die Expression der IEGs *Bdnf*, *Arc*, *Carp* und *Tieg 1* in Hirnlysaten von PFC, Nacc und Hippocampus sehr unterschiedlich beeinflusst (Coppens et al., 2011). Im Hippocampus war die mRNA aller vier Gene nach chronisch sozialem Stress während der Jugendphase erhöht. Hingegen war keines der Gene nach chronisch sozialem Stress in der erwachsenen Phase erhöht. Das Alter der für diese Arbeit verwendeten Tiere wäre folglich eine Erklärung für die geringen Effekte bei den untersuchten IEGs.

4.1.3 Adulte C57BL6/JRj zeigen geringe Expressionsunterschiede von Proteinen der mTOR-Signalkaskade in stressassoziierten Gehirnregionen

Proteinanalysen, welche im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführt wurden, zeigten geringe kompensatorische Effekte in der Expression der mTOR Signalwegproteine pS6, S6, pAkt, Akt, phospho-p70S6 und p70S6 in Mäusen. Krishnan et al. beschrieben eine Erhöhung der Menge an der phosphorylierten Form von Akt, der Glycogen Synthase 3 β (Gsk-3 β) und ERK1/2 (extracellular signal regulated kinase) im Nucleus accumbens von stressanfälligen Mäusen (Krishnan et al., 2007). Hierbei wurde kein Unterschied in der Menge an Gesamtprotein der entsprechenden Proteine zwischen den Gruppen festgestellt. Die Mäuse wurden in dieser Studie einem 10-tägigen chronisch sozialen Stress ausgesetzt und 24 h nach Beendigung der Stressprozedur in ihrer sozialen Interaktion getestet. Vergleicht man die in dieser Arbeit gewonnenen Proteinexpressionsdaten zum Zeitpunkt T1 sind diese kongruent, da hier die Menge an phosphoryliertem Akt bzw. das Verhältnis von Phosphoryliertem zu Gesamt Akt-protein im Nucleus accumbens in den stressanfälligen Tieren tendenziell oder sogar signifikant höher war als in den Gruppen der Kontroll- oder Resilienten Tieren. Es konnte zudem in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch die Menge an phosphoryliertem S6 im Nucleus accumbens von stressanfälligen Mäusen größer war als in den anderen Gruppen.

Bei chronisch sozial gestressten Ratten wurde auch im ventralen tegmentalen Areal eine Erhöhung der Menge an phosphorylierten mTOR-Signalkaskadenproteinen beschrieben (Der-Avakian et al., 2014). Die in dieser Arbeit generierten Resultate zeigten für das ventrale tegmentale Areal nur zum Zeitpunkt T1 eine Veränderung. Das geringere Verhältnis von phosphoryliertem Akt zu Gesamtprotein in den stressanfälligen Tieren erscheint zunächst kontraintuitiv. Dieser Effekt könnte aber auf eine negative Rückkopplung der mTORC 1 Signalisierung auf die Insulinrezeptorsignalisierung zurückzuführen sein (McCabe et al., 2020).

Für den Hippocampus wurde eine Reduktion der mTOR Ziel-Proteine nach chronisch sozialem Stress beschrieben (Jiang et al., 2019). Zum ersten Zeitpunkt (T1) zeigen die in dieser Arbeit

generierten Ergebnisse keine Unterschiede in der mTOR Regulation in dieser Region. Allerdings zeigen auch die Daten des 24 h NORT keine signifikanten Unterschiede zu diesem Zeitpunkt. Da der 24 h NORT auf hippocampaler Funktion beruht, ist eine Regulation zu diesem Zeitpunkt nicht unbedingt zu erwarten. In einem Stressmodell von chronischer Einschränkung (Chronic Restraint Stress) zeigte sich ebenfalls eine Herunterregulierung von Proteinen der mTORC1 Signalisierung (Luo et al., 2021). In dieser Studie wurde zudem aufgezeigt, dass sich die Veränderung der mTOR Target-Proteinexpression/phosphorylierung zwischen dem dorsalen und dem ventralen Hippocampus unterscheidet. In dieser Arbeit wurde für die Untersuchungen der gesamte Hippocampus ohne Unterscheidung in einzelne Subregionen betrachtet. Die Analyse des Hippocampus als Gesamtes könnte zu einer Überlagerung von Effekten in einzelnen Subregionen geführt haben. In einer Studie mit Ratten, welche chronisch unvorhersagbarem Stress (CUS, Chronic Unpredictable Stress) ausgesetzt wurden, bei der die Gehirnregionen ebenfalls als Ganzes analysiert wurden, konnten ebenfalls keine Unterschiede im Hippocampus beobachtet werden (Chandran et al., 2013). In der Studie wurden auch für den frontalen Cortex keine signifikanten Unterschiede gefunden. Dies stimmt mit den in dieser Arbeit gezeigten Analysen zum präfrontalen Cortex zu den drei Zeitpunkten T1 bis T3 überein. Die Effekte auf die mTOR Regulation waren nach einer Woche insgesamt vermindert. Daraus lässt sich schließen, dass mTOR akut eine Rolle bei der Ausbildung des stressbedingten Phänotyps spielt, dies jedoch schon während oder kurz nach Stressexposition passiert und sich anschließend wieder normalisiert.

Da sowohl das Verhältnis der AMPA Rezeptoruntereinheiten GluA1 als auch GluA2 und die mTOR-abhängige Synthese von PSD95 einen Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit und somit die Stressresilienz haben können wurden diese zum Zeitpunkt T2 untersucht. PSD-95 ist ein Gerüstprotein, das sich an der postsynaptischen Seite exzitatorischer Synapsen befindet und direkt oder indirekt an NMDA- und AMPA-Rezeptoren, Kaliumkanäle und damit verbundene Signalproteine bindet, was dazu führt, dass diese sich während der Bildung und Aufrechterhaltung dendritischer Stacheln zusammenschließen (Kivisäkk et al., 2022). Reife Hippocampus-Neuronen exprimieren vor allem zwei Kombinationen von AMPAR-Untereinheiten, GluA1/GluA2 oder GluA2/GluA3 heterotetramer Rezeptoren (Park, 2018). Die Regulierung der genauen Lokalisierung und Anzahl der AMPARs an der Zelloberflächenmembran ist entscheidend für die meisten exzitatorischen synaptischen Übertragungen im Normalzustand und auch für die synaptische Langzeitplastizität, wie LTP und LTD (Long Term Potentiation und Long Term Depression). Die tendenziell höhere Menge von GluA1 und das höhere Verhältnis von GluA1 zu GluA2 im Nucleus accumbens gestresster Tiere deutet auf eine Neubildung von neuen GluA1-haltigen Synapsen mit veränderter synaptischer Plastizität in den gestressten Tieren hin (Di et al., 2019). Diese Synapsen zeigen im Gegensatz zu "älteren" GluA2-haltigen sowohl eine höhere Frequenz in der Feuerrate als

eine höhere Amplitude. In den anderen Hirnregionen waren weder für die AMPA-Rezeptor Untereinheiten noch für PSD95 signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu finden. Betrachtet man die Defizite, welche die gestressten Tiere in der Kognition zum Zeitpunkt T2 aufweisen, erscheint dieses Ergebnis zunächst nicht schlüssig. Man würde erwarten, dass insbesondere bei den stressanfälligen Tieren eine Verschiebung des GluA1 zu GluA2 Verhältnisses zugunsten von GluA1 oder auch zu einer Reduktion von PSD95 im Hippocampus kommt. Auch hier ist wieder anzumerken, dass der Hippocampus als Ganzes analysiert wurde. Effekte in einzelnen Subregionen können folglich nicht ausgeschlossen werden. Ein weiterer Aspekt sind stressbedingte regionspezifische Effekte auf die Plastizität der neuronalen Dornfortsätze. CSDS erhöht bei Mäusen die Dichte der Dornfortsätze auf den mittelgroßen dornentragenden Neuronen (MSN) im NAc (Christoffel et al., 2011). Im Hippocampus wiederum kommt es zu einem Verlust der Dichte an Dornfortsätzen. Im PFC wurde eine Abnahme von reifen pilzförmigen Dornfortsätzen und eine Zunahme an unreifen dünnen Dornfortsätzen beschrieben. Die Änderung der Morphologie hat wiederum Einfluss auf die Zusammensetzung der postsynaptischen Dichte und in der Folge auf die Gesamtkomposition der synaptischen bzw. neuronalen Proteine.

Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine PSD-95 und GluA1/2 befinden sich auf der postsynaptischen Seite. Interessanterweise sind Moleküle, von denen bekannt ist, dass sie für das Andocken von Vesikeln und das Priming entscheidend sind, wie z. B. Rab3-interagierende Moleküle (RIMs), an der Entwicklung der LTP beteiligt (Christoffel et al., 2011). Es wäre also wichtig hier auch präsynaptische Proteine zu untersuchen.

Die Analyse der Proteine der mTOR-Signalkaskade und der Proteine der postsynaptischen Dichte drei Wochen nach Stressexposition zeigte ebenfalls nur geringe Expressionsunterschiede. Neben den zuvor genannten Gründen muss hier auch beachtet werden, dass sich die Mäuse von dem Stressparadigma erholt haben.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass direkt nach dem chronisch sozialen Stress die Effekte in der mTOR Regulation zwischen den ungestressten, Resilienten und Anfälligen Tieren insbesondere im Nucleus accumbens am Größten waren. Diese Daten werden von der Literatur gestützt. Betrachtet man jedoch die anderen untersuchten Hirnregionen zeigen sich nur geringe bis keine Effekte. Auch zu den späteren Zeitpunkten zeigen sich nur geringe Effekte auf die Phosphorylierung der Targetproteine der mTOR-Signalkaskade und die Expression der AMPA-Rezeptoruntereinheiten sowie des postsynaptischen Proteins PSD95. In Bezug auf die in dieser Arbeit gezeigten Defizite in der Gedächtniskonsolidierung überrascht dies. Man würde erwarten, dass in Hirnregionen, welche an der Gedächtniskonsolidierung beteiligt sind bei Proteinen, die die postsynaptische Plastizität und folglich die Langzeitpotenzierung beeinflussen, eine Regulation stattfindet.

4.2 Verhaltensversuche nach Intervention in die mTOR-Signalkaskade

4.2.1 Die Gabe des mTOR-Inhibitors Rapamycin führt zu einer Rettung des stressanfälligen Phänotyps in adulten C57BL6/JRj nach chronisch sozialem Stress

In einem zweiten Schritt wurde für die vorliegende Arbeit das Sozialverhalten, die Gedächtniskonsolidierung und das Nestbauverhalten von wildtypischen C57BL/6 Mäusen nach pharmakologischer Intervention mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin untersucht. In der Literatur wurde bereits zuvor eine pro-resiliente Wirkung des mTOR-Inhibitors Rapamycin beschrieben. Cleary et al. konnten sowohl für Mäuse als auch Ratten zeigen, dass eine Behandlung mit Rapamycin einen antidepressiven Effekt sowohl im FST, als auch TS hatte (Cleary et al., 2008). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass in einem Mausmodell mit mutmaßlicher Hyperaktivität der mTOR-Signalkaskade die Gabe von Rapamycin eine Steigerung der sozialen Interaktion bewirkte (Sato et al., 2012).

Unsere Beobachtung, dass eine Rapamycin-Behandlung, die direkt nach CSDS verabreicht wird, sowohl den individuellen SI-Index der besiegten Tiere als auch den Anteil der resilienten Tiere innerhalb der gestressten Gruppe erhöht, deutet darauf hin, dass Rapamycin ein Kandidat für ein Medikament gegen Stressresilienz ist. Die im Vergleich zur vehikelbehandelten Gruppe höheren DI Werte weisen außerdem auf eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten nach Behandlung hin. In einer weiteren Studie soll dieser Effekt durch gezielte Injektion von Rapamycin in den dorsalen Hippocampus weiter untersucht werden. Ein schlechteres Nestbauverhalten wurde auch nach Gabe anderer Wirkstoffe, insbesondere Hallozinogenen wie Meskalin, Amphetamin und Tetrahydrocannabinol (THC), festgestellt (Schneider et al., 1970; Moschovakis et al., 1978).

Die Ergebnisse dieser Arbeit können vielversprechende Auswirkungen auf die Umsetzung im Menschen haben, da es bedeutet, dass Substanzen, die die mTOR-Kinase hemmen, zur Stärkung der Resilienz nach einem Trauma eingesetzt werden könnten. Es sind jedoch weitere Studien erforderlich, um die genaue resilienzfördernde Wirkung von mTOR-Inhibitoren zu klären.

4.2.2 Die Gabe des mTOR-Inhibitors Rapamycin führt zu einer allgemeinen Herunterregulierung der mTOR Aktivität im Gehirnparenchym

Nach Beendigung der Rapamycinbehandlung und der Verhaltensexperimente wurden die Gehirne entnommen und die Gehirnregionen PFC, Hippocampus und Nucleus accumbens auf ihre mTOR Regulation untersucht. Die signifikante Reduktion der Menge an phosphoryliertem

S6 im PFC und Hippocampus, sowie die tendenzielle Reduktion im Nucleus accumbens zeigt eine Inhibition der mTOR Signalkaskade nach Rapamycin-Gabe. Bei der Regulation von Akt zeigte sich hingegen kein Effekt. Eine Interpretation ist hier schwierig. In der Literatur wurde gezeigt, dass geringe Konzentrationen von Rapamycin zu einer erhöhten Akt und ERK Phosphorylierung durch einen mTORC1-abhängigen Mechanismus führen, weil das durch Rapamycin inhibierte Raptor die Aktivierung von Akt und ERK induziert. Höhere Dosen von Rapamycin unterdrücken hingegen die Akt und ERK Phosphorylierung vorzugsweise durch den mTORC2 Signalweg, da die Unterdrückung von Rictor zur Inhibierung der Akt und ERK Phosphorylierung führt (Chen et al., 2010). Es fällt jedoch auf, dass es keine gezielte Regulierung in einer Gehirnregion gibt und sich stattdessen ein breiter Effekt im gesamten Gehirnparenchym zeigt.

4.2.3. Heterozygote Tsc2 Mäuse zeigen nach chronisch-sozialem Stress im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen geringe Unterschiede im Verhalten

Neben der Untersuchung der Auswirkung der Hemmung des mTOR-Signalweges mittels pharmakologischer Intervention durch Rapamycin wurden auch Auswirkung einer mTOR Hyperaktivität in einem heterozygoten Tsc2 Mausmodell untersucht. Das Gen *Tsc2*, welches für Tuberin kodiert, weist auf einem Allel eine Deletion in Exon 2 auf, was letztlich zu einem Verlust der Genexpression des mutierten Allels führt (Onda et al., 1999). Da nur noch über das verbleibende wildtypische Allel Tuberin exprimiert wird, reduziert sich die Menge von Tuberin auf die Hälfte. Tuberin bildet, zusammen mit dem von Tsc1 kodierten Hamartin einen Komplex, welcher die mTORC1 Signalkaskade inhibiert. Im Tsc2 Mausmodell ist diese Inhibierung des mTORC1 Komplexes folglich geschwächt und es kommt zu einer Verstärkung der mTOR Aktivität. Bei Menschen führen Mutationen in TSC1 oder TSC2 zu einer genetischen Störung, welche Tuberöse Sklerose (TS) genannt wird (Winden et al., 2019). Patienten weisen häufig Epilepsie, Intelligenzminderung, Autismusspektrumsstörungen (ASD) und andere Manifestationen auf. Studien deuten darauf hin, dass Erwachsene mit ASD anfälliger sind für Stress als gesunde Probanden und daher auch eine höhere Anfälligkeit für neuropsychiatrische Krankheiten aufweisen (Bishop-Fitzpatrick et al., 2015). In diesem Teil sollte untersucht werden inwieweit chronisch-sozialer Stress das Verhalten im Tsc2-Mausmodell, welches einen autistischen Phänotyp aufweist, beeinflusst. Die Tiere wurden im Alter von drei Monaten gestresst und anschließend in verschiedenen Verhaltenstests auf ihr Sozialverhalten, ihr generelles Angstverhalten, ihre kognitiven Fähigkeiten, ihr generelles Wohlbefinden und depressives Verhalten hin untersucht. Die gestressten Tiere zeigten eine signifikant verringerte soziale Interaktion im Social Interaction Test (SI). Dieses Ergebnis zeigt, dass das Stressparadigma effektiv ein Vermeidungsverhalten sowohl bei heterozygoten wie

auch wildtypischen Mäusen nach Sressexposition induzieren konnte. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass heterozygote Tsc1 (Tsc1 +/-) Mäuse eine verringerte soziale Explorationsrate, heterozygote Tsc2 Mäuse hingegen ein normales Sozialverhalten aufweisen (Provenzano et al 2012). Die in dieser Arbeit generierten Daten zeigen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen im Social Interaction Test. Dies gilt sowohl für den Vergleich von gestressten Tiere, als auch den Vergleich der ungestressten Tiere. Interessanterweise zeigen die wildtypischen, gestressten Tiere im Social Novelty Test keine signifikanten Unterschiede in der Kontaktfreudigkeit zwischen dem leeren Zylinder und dem Zylinder mit einer C57BL6J, was als gestörtes Sozialverhalten interpretiert werden kann. Die gestressten heterozygoten Tsc2 Mäuse hingegen zeigen hier einen signifikanten Unterschied. Die heterozygoten Tsc2-Mäuse zeigen folglich im Vergleich in diesem Test nach Stressexposition ein besseres Sozialverhalten, als ihre gestressten wildtypischen Geschwister. Dies ist ein Punkt, der weiter untersucht werden sollte.

Als Nächstes wurden, um das generelle Angstverhalten zu untersuchen ein EPM und ein OFT durchgeführt. Alle gestressten Tiere (wildtypische und heterozygote Tsc2) zeigten ein höheres Angstverhalten im EPM, im OFT zeigten nur die heterozygoten Tsc2 Tiere Auffälligkeiten. Es konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass chronisch sozialer Stress zu einem erhöhten Angstverhalten in EPM und OFT bei Mäusen führt (Qi et al., 2022). Es wurde dabei gezeigt, dass insbesondere die Verknüpfung des NAc mit dem VTA kritisch für die Etablierung von stressinduziertem Angstverhalten ist. Bei den Ergebnissen des OFT ist anzumerken, dass nur die gestressten heterozygoten Tiere einen Effekt bei der zurückgelegten Strecke zeigten. Dies lässt vermuten, dass die Beeinträchtigung bei den heterozygoten Tieren größer ist, als bei den wildtypischen Geschwistertieren. Bisherige Studien zeigten kein angst-ähnliches Verhalten in ungestressten heterozygoten Tsc2-Mäusen (Ehninger et al., 2008), jedoch eine Tendenz zu angst-ähnlichem Verhalten im OFT (Ehninger et al., 2011). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeichnen ein ähnliches Bild. Auch hier konnte zwischen den ungestressten heterozygoten Tsc2 Mäusen und ihren wildtypischen Geschwistertieren kein signifikanter Unterschied gefunden werden, aber sowohl im EPM als auch OFT schnitten die heterozygoten Tiere tendenziell schlechter ab.

Zur Testung des Kurzzeitgedächtnisses wurde ein Y-Maze Test durchgeführt. Spontane Richtungswechsel, als Maß des räumlichen Arbeitsgedächtnisses, können dadurch bewertet werden, dass man Mäusen erlaubt alle drei Arme des Maze zu erkunden. Hierbei nutzt man die den Mäusen angeborene Neugier, zuvor nicht-besuchte Bereiche zu erkunden. Eine Maus mit intaktem Arbeitsgedächtnis und damit intakten präfrontalen kortikalen Funktionen erinnert sich welchen Arm sie zuvor besucht hat und wird dann bevorzugt in den zuvor nicht-besuchten Arm laufen. Interessanter Weise zeigte der Test eine bessere Kognition für gestresste Tiere. Dabei zeigten heterozygote Tsc2 +/- Tiere eine bessere Leistung nach Stress als ihre

wildtypischen Geschwistertiere. In verschiedenen Studien mit Ratten wurde bereits gezeigt, dass chronisch sozialer Stress zu einer Beeinträchtigung des Arbeitsgedächtnisses führt (Yu et al., 2011; Novick et al., 2013). Patienten mit TS zeigen Defizite im exekutiven Arbeitsgedächtnis und im Erinnerungsgedächtnis (Ridler et al., 2007). In heterozygoten *Tsc2* +/- Mäusen konnte zudem gezeigt werden, dass diese eine Beeinträchtigung des Hippocampus-abhängigen räumlichen Gedächtnisses aufwiesen (Ehninger et al., 2008). Es wäre folglich anzunehmen, dass die Tiere auch Defizite im Arbeitsgedächtnis aufweisen. Die Verbesserung der kognitiven Leistung der heterozygoten *Tsc2* +/- Tiere, insbesondere nach Stress, überrascht also. Die meisten Studien zeigen eine Verschlechterung des räumlichen Arbeitsgedächtnis bei Neuroentwicklungsstörungen wie Autismus-Spektrum-Störungen (Nakamura et al., 2021). Paradoxerweise gibt es aber auch Studien, welche Verbesserungen in spezifischen räumlichen Gedächtnisfähigkeiten zeigen. Dies stimmt auch mit der Literatur einiger ASD Mausmodelle überein bei welchen ebenfalls sowohl Beeinträchtigungen als auch Verbesserungen des räumlichen Gedächtnisses gezeigt wurden. Eine Erklärung wäre, dass es zu spezifischen Veränderungen in der räumlichen Navigation kommt. Dabei wäre die allozentrische räumliche Navigation der Patienten bzw. Tiere beeinträchtigt, die egozentrische Navigation hingegen nicht. Die egozentrischen räumlichen Referenzen beziehen sich dabei immer relativ auf das Individuum und werden oft als Navigationsstrategie zusammengefasst, die auf den Links-Rechts Wechseln des Individuums beruht. Die allozentrische Referenz ist hingegen unabhängig vom Individuum und verrechnet verschiedene externe Landmarken miteinander. Ein detaillierteres Verständnis der zellulären und funktionellen Arbeitsweise der gedächtniskonsolidierenden Hirnregionen ist notwendig, um diese heterogenen phänotypischen Ausprägungen des räumlichen Gedächtnisses besser interpretieren zu können. Hierfür könnten weitere Verhaltenstests wie der Morris Water Maze, der Barnes Maze oder der T-Maze durchgeführt werden. Bei post-mortem Analysen wären insbesondere Parvalbumine Interneurone interessant, da für diese bereits eine Rolle für das Arbeitsgedächtnis beschrieben wurde (Perlman et al., 2021). Immunhistochemische Studien zeigten nach Stressexposition einen Verlust an Parvalbumin Interneuronen in Subregionen des Hippocampus und des präfrontalen Cortex. Die größten Effekte im präfrontalen Cortex wurden dabei in adoleszenten Tieren beobachtet, bei adulten Tieren hingegen zeigte sich eine Reduktion im infralimbischen Cortex jedoch nicht im prälimbischen Cortex. In einer Studie mit chronisch sozial gestressten Ratten zeigte sich im Hippocampus nach 72 Stunden eine Reduktion von Parvalbumin (PV) positiven Zellen und perineuronalen Netzen (PNN) im CA1 (Koskinen et al., 2019). Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse dieser Studie eine erhöhte Anzahl an PV positiven und PNN positiven Zellen 8 Wochen nach Beendigung der Stressprozedur. Dies lässt auf eine Remodellierung der extrazellulären Matrix schließen. Die Matrix-Metalloproteinase-vermittelte Zerstörung von extrazellulären Verbindungen ist ein

essentieller Mechanismus durch den die Remodellierung der extrazellulären Matrix ermöglicht wird. In der Studie von Koskinen et al. konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von MMP-2 bei Tieren mit Depressions-ähnlichem Verhalten reduziert ist. Da bereits zuvor gezeigt werden konnte, dass die Regulation von MMPs zumindest teilweise durch den mTOR Signalweg vermittelt wird, ergäbe sich hier ein vielversprechender Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen. Neben der Untersuchung von Proteinen der mTOR-Signalkaskade wäre hier auch eine Analyse der MMP Aktivität mittels Zymographie als SDS-PAGE oder in situ möglich. Die Analyse des Grooming Verhaltens zeigte erwartbare Ergebnisse. Das Selbstkörperpflegeverhalten von Nagetieren zeigt einen hohen Grad an Komplexität und Organisation und beinhaltet eine Serie von einzelnen Bewegungen, welche eine funktionelle Abfolge ergeben. Die Abfolge ist zum einen repetitiv und zum anderen immer gleichbleibend. Die Selbstkörperpflegesequenzen können durch experimentelle Manipulationen bidirektional wie genetischen Mutationen und psychologischen Stress beeinflusst werden. Stress kann die Selbstpflege stark beeinflussen, indem es die Häufigkeit oder die Gesamtdauer der Durchgänge erhöht. Zudem führen Stressoren durch Beeinträchtigung der cephalokaudalen Progression auch zu einer desorganisierten Körperpflege. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine erhöhte Grundangst bei bestimmten Mäuse- und Rattenstämmen häufig mit verstärkter Selbstpflege und verstärkter Unordnung im Ablauf der Pflege einhergeht. Die neurobiologischen Grundlagen der Wechselwirkung zwischen Stress und Selbstpflege sind nicht vollständig erforscht, aber Hirnregionen, die an Affekten beteiligt sind, insbesondere die Amygdala, sind dabei involviert. Die Selbstkörperpflege wird unter anderem vom limbischen System mit Amygdala und Hypothalamus beeinflusst (Kalueff et al. 2015). Die Amygdala ist eine limbische Gehirnregion die bei der Regulation von Motivation, wie Angst oder Verlangen eine Rolle spielt. In verschiedenen Studien wurden bei Ratten Korrelationen zwischen Angstverhalten, der Dopaminausschüttung in der Amygdala und dem Körperpflegeverhalten gefunden (Homborg et al. 2002).

Da Stress und Angst die Selbstpflege von Nagetieren zu beeinflussen scheinen, kann man abnormales Pflegeverhalten als Maß für Stress oder Angst in verschiedenen experimentellen Modellen und Tests verwenden. Auch in der vorliegenden Arbeit verbrachten die gestressten Tiere tendenziell mehr Zeit mit Selbstpflege als die ungestressten Kontrollen. Hierbei wurde jedoch nicht untersucht, inwieweit das Pflegeverhalten durch Desorganisation oder durch Abbrüche gekennzeichnet ist. Hierfür könnten die Videoaufnahmen des Pflegeverhaltens noch einmal analysiert werden. In Bezug auf Autismus Spektrum Störungen geht man davon aus, dass die Episoden der Selbstpflege bei Nagetieren pathologische, repetitive Verhaltensweisen rekapitulieren können. Für das hier verwendete Mausmodell zeigte sich bei den heterozygoten *Tsc2* Tieren tatsächlich eine höhere Selbstpflege als bei wildtypischen Tieren. In einer anderen Studie wurde für heterozygote *Tsc2* +/- Mäuse eine höhere Frequenz beim

Selbstpflegeverhalten festgestellt (Kashii et al., 2022). Dies stützt die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse. Eine weitere Studie zeigte keine Unterschiede zwischen wildtypischen und *Tsc2* Mäusen bei der mit Selbstpflege verbrachten Zeit (Chévere-Torres et al., 2012). Jedoch muss hier beachtet werden, dass ein Mausmodell verwendet wurde, welches ein dominant-negatives im Sinne eines gain-of-function TSC2 exprimiert. TSC2 war hier noch in der Lage TSC1 zu binden, jedoch führte die Mutation innerhalb der GAP Domäne und des Rabaptin-5 Bindemotivs zu einer Inaktivierung des TSC Komplexes. Das hier benutzte Mausmodell stellt ein loss-of-function Modell dar. Aufgrund dieser Unterschiede ist nicht unbedingt zu erwarten, dass die Ergebnisse des transgenen Mausmodells bei Chévere-Torres et al. mit den Resultaten des in dieser Arbeit verwendeten heterozygoten KO Modell übereinstimmen.

In SPT und TST wurden die Tiere auf Anzeichen von Anhedonie und depressiven Verhaltensweisen getestet. Bei den ungestressten Tieren zeigte sich, dass die heterozygoten Tiere tendenziell mehr Zuckerwasser konsumierten und eine höhere Inaktivität im TS aufwiesen, was als stärkeres depressives Verhalten interpretiert werden konnte. Dieses Ergebnis ist erwartbar da auch für Patienten mit ASD Diagnose bereits eine hohe Koinzidenz mit mentalen Problemen und Depression beschrieben wurde (van Heijst et al., 2020). Nach Stress zeigten die wildtypischen Tiere tendenziell stärkere depressive Verhaltensweisen wie sie in der Literatur bereits zuvor beschrieben wurden (Quian et al., 2020; Golden et al., 2011). Interessanterweise zeigten die gestressten heterozygoten *Tsc2* Tiere tendenziell geringere depressive Effekte. Hierbei könnte es sich um ausgleichende Effekte innerhalb der mTOR-Signalkaskade handeln, welche letztlich zu einer Verbesserung des Phänotyps führen. Hierzu könnte man mittels proteinanalytischer Methoden, wie z. B. Western Blot, die Effekte weitergehend untersuchen.

Zusammenfassend kann für die Untersuchungen an dem *Tsc2* Mausmodell nach chronisch sozialem Stress festgestellt werden, dass *Tsc2* +/- Mäuse ähnlich wie ihre wildtypischen Geschwistertiere beeinflusst werden und es nur geringe Unterschiede zwischen beiden Gruppen gibt. Mäuse mit heterozygoter Mutation in *Tsc2* zeigen im Sozialverhalten nach Stressexposition eine ähnliche Verteilung an resiliente und anfällige Tiere wie ihre wildtypischen Geschwister. Im allgemeinen Angstverhalten zeigte sich tatsächlich eine stärkere Beeinflussung der gestressten *Tsc2* +/- Mäuse. Die Untersuchung des Arbeitsgedächtnis zeigte vielversprechende Ansätze hinsichtlich einer Verbesserung der gestressten Tiere auf. Die Untersuchung der Gedächtnisfunktion sollte durch weitere, insbesondere stärker Hippocampus-basierende, Verhaltenstests ergänzt werden. Das Körperpflegeverhalten war bei beiden gestressten Gruppen gleich. Auch bei den Untersuchungen zu depressivem Verhalten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei den gestressten Gruppen. Eine erwartete stärkere Beeinflussung der heterozygoten *Tsc2*

Mäuse konnte nicht festgestellt werden. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass der Phänotyp des untersuchten Tsc2 Modells vergleichsweise mild ist. Eine Erklärung wäre, dass die mTOR Regulation sich bei den hier untersuchten adulten Tsc2 +/- Tieren aufgrund kompensatorischer Effekte nur geringfügig unterscheidet. Folglich wären auch bei gestressten Tieren nur geringe bis keine Effekte zu erwarten. Zur Untersuchung der molekularen Mechanismen innerhalb der mTOR Signalkaskade sollten weitere proteinbiochemische Analysen für die mit Stress assoziierten Gehirnregionen durchgeführt werden. Desweiteren sollte in weiterführenden Experimenten untersucht werden, ob sich die pro-resilienten Effekte durch Inhibierung der mTOR Signalkaskade mittels Rapamycin auch für das Tsc2 Mausmodell reproduzieren lassen.

4.3 Verhaltensversuche mit Mäusen mit veränderter Endothel-und Koagulationskaskade nach chronisch sozialem Stress

Die in 4.1.3 eingehenden biochemische Analysen von Proteinen der mTOR-Signalkaskade in verschiedenen Hirnregionen zeigten nur geringe Unterschiede zwischen Anfälligen und Resilienten Tieren. Dies deutete darauf hin, dass die in 4.2.1 beobachtete Rapamycin-Wirkung wahrscheinlich vor Allem peripher ist.

Es konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass durch CSDS verursachter chronischer Stress bei Anfälligen wildtypischen Mäusen zu einer erhöhten Permeabilität der BHS führt. Die Integrität der BHS erfordert eine ausgewogene Kommunikation zwischen den Komponenten der neurovaskulären Einheit (Endothelzellen, Muralzellen, Astrozyten und extrazelluläre Matrix). Veränderungen in den Signalwegen, die dieses Zusammenspiel steuern, führen zu einer Störung der Integrität der BHS. Die Störung der BHS Integrität wird dabei durch eine Abnahme von endothelialen Tight-Junction-Proteinen (TJ) vermittelt, was zu einer Infiltration von Zytokinen und Interleukinen und zur Ausprägung depressionsähnlicher Verhaltensweisen führt (Menard et al., 2017, vgl 1.6)

Verschiedene Studien konnten bereits zuvor eine Verbindung zwischen chronischem Stress, welcher durch psychische Belastung und traumatischen Erlebnissen verursacht wurde, und kardiovaskulären Erkrankungen herstellen (Sandrini et al., 2020). Unter stressigen Bedingungen implementiert ein Individuum einen adaptiven Prozess, welcher über die Aktivierung der HPA Achse und das ANS, zu einer Sekretion von verschiedenen Glucocorticoid Hormonen und Catecholaminen (Noradrenalin und Adrenalin) führen und damit direkt oder indirekt zu Unterschieden in der Homöostase führen. Es kommt unter stressigen Bedingungen letztlich zu einer vermehrten Bildung von Blutplättchen, einer Dysfunktion der Endothelzellen und der Blutgerinnung, einer verstärkten Immunantwort und vermehrter Fibrinolyse.

Es konnte gezeigt werden, dass aktiviertes Protein C neben seiner klassischen Rolle als rückgekoppelter Inhibitor der Thrombingenerierung innerhalb der Blutgerinnungskaskade auch direkt auf Signalkaskaden und Genexpression der Immunantwort und Apoptose einwirkt (Joyce et al., 2001). Darauf basierend konnte gezeigt werden, dass die Zytoprotektion in den Endothelzellen durch die Aktivierung von PAR1 mittels APC vermittelt wird (Riewald et al., 2002). Dabei wird EPCR als Ko-Rezeptor für die Spaltung von PAR1 verwendet. In entsprechenden Folgestudien konnte in mehreren Zelltypen zytoprotektive Effekte wie (1) die Änderung des Genexpressionsprofils, (2) der anti-inflammatorischen Aktivität, (3) der antiapoptotischen Aktivität und (4) des Schutzes der endothelen Barrierefunktion nachgewiesen werden (Mosnier et al., 2007) (Vgl 1.7.6).

Daher wurden Mausmodelle verwendet bei denen die Signalisierung über EPCR gestört ist. In dem einen Mausmodell kommt es zu einem Verlust (Knock Out) des für EPCR kodierenden Gens *Procr* in allen hämatopoetischen und endothelialen Zellen. In dem anderen Modell wird EPCR zwar expremiert, die subzelluläre Lokalisation in der Zellmembran ist jedoch aufgrund einer Mutation in der Palmitoylierungsstelle gestört. Die zytoprotektive Signalisierung mittels EPCR verhindert die Aktivierung des NF-kappaB-Signalweges, welcher mittels des mTOR - Signalweges die Expression von Matrixmetalloproteasen wie MMP9 und in der Folge die Integrität der BHS beeinflusst (Rao et al., 2014; van Skike et al., 2018). Es war folglich anzunehmen, dass ein Verlust des Proteins (Knock-Out) oder ein Funktionsverlust (loss of function) von EPCR zu einer verringerten zytoprotektiven Signalisierung und folglich auch einer Verminderung der BHS-Integrität führen würde. Im KO Modell war in der Gruppe der gestressten Tiere mit EPCR Deletion kein einziges Tier resilient. In der Gruppe der gestressten wildtypischen Geschwister zeigte sich die bekannte Verteilung in resiliente und anfällige Tiere. Dieses Ergebnis bestärkte die Annahme, dass eine erhöhte Permeabilität der BHS mit einer erhöhten Stressanfälligkeit assoziiert war. Auch im Mausmodell mit Dislokation von EPCR zeigte sich bei den gestressten Mäusen mit Defekt, dass keine resilienten Tiere vorhanden waren. Der Kontrollstamm mit Expression von EPCR zeigte eine hohe Anzahl an resilienten Tieren. Der Stamm zeigt eine höhere Expression an EPCR als die wildtypischen Geschwistertiere des KO Modells (persönliche Kommunikation Prof. Dr. Wolfram Ruf). Es wäre daher anzunehmen, dass eine stärkere Expression von EPCR pro-resiliente Effekte hat. Beim KO Modell zeigten die gestressten Tiere eine Erhöhung des generellen Angstverhaltens. Zudem zeigte sich, dass die gestressten Tiere mit Verlust des *Procr* Gens stärker betroffen waren als ihre gestressten wildtypischen Geschwistertiere. In einer Studie bei der Mäuse durch Bewegungseinschränkung chronisch gestresst wurden zeigte sich bei den gestressten Tieren ebenfalls ein erhöhtes Angstverhalten im EPM und eine erhöhte BHS Permeabilität (Lee et al., 2018).

Für das KO Modell zeigte sich bei der Testung der Gedächtnisleistung eine Verschlechterung bei den ungestressten KO Mäusen im Vergleich zu den ungestressten wildtypischen Kontrollen. Da aufgrund des Fehlens von EPCR eine stärkere Signalübertragung mittels Thrombin erfolgt, wird die Expression proinflammatorischer Gene gefördert und die BHS Integrität gestört (Rao et al., 2014). Dies wird in einem Mausmodell bestätigt, bei dem durch minimal traumatische Gehirnverletzung die Neuroinflammation indiziert wurde und sich die Thrombinaktivität, die PAR1 Aktivierung und die Menge an TNF-alpha erhöhten (Goldermann et al., 2022). Diese Tiere zeigten ebenfalls eine signifikante Verschlechterung der Gedächtnisleistung. Ähnliche Effekte erwartet man in der hier vorliegenden Arbeit auch für die gestressten wildtypischen Tiere. Interessanterweise führte der Stress bei den Tieren mit Deletion von EPCR zu einer Verbesserung der Kognition. Weitergehende Studien mit weiteren Gedächtnis-konsolidierenden Tests sollten untersuchen, inwieweit chronischer Stress tatsächlich zu einer Verbesserung des Phänotyps bei diesem Mausmodell führen könnte.

Der Einsatz des Thrombin-spezifischen Inhibitors NAPc2 (vgl. 1.7.6; Lee et al., 2003). führte zu einer Verbesserung des Phänotyps im Mausmodell mit EPCR Dislokation. Dieses Ergebnis bestätigt, dass eine spezifische Modulation der Thrombin-PAR1-Signalisierung pro-resiliente Effekte hat.

In weiterführenden Studien soll nun die Störung der Integrität der BHS in beiden EPCR Modellen verifiziert werden. Hierzu sollen die Tiere mit 0.7 kDa Gadolinium-Kontrastmittel behandelt und im Anschluss MRI Aufnahmen gemacht werden. Zudem sollen in einem weiteren Schritt fluoreszierende Tracer (Cadaverine-Alexa 555 (95 kD), Ovoalbumin (45 kD) Albumin (69 kD) mit unterschiedlichen Molekülgrößen verwendet werden. Hierbei wären insbesondere der Nucleus accumbens und dorsale Hippocampus als Zielregionen interessant (Menard et al., 2017; Vennin et al., 2022). Menard et al. konnten für den Nucleus accumbens zeigen, dass chronisch sozialer Stress in Mäusen zu einer höheren Permeabilität in den Anfälligen Tieren führt (Menard et al., 2017).

Mit dem Gewebe aus den verschiedenen Hirnregionen soll zudem eine Proteinexpressionsanalyse von BHS-assoziierten Proteinen wie Claudinen, ZO1-3, MMP-9 und JAMs durch Western Blot durchgeführt werden um potentielle Lecks der BHS Integrität und die dafür verantwortlichen Proteine zu identifizieren. Eine Möglichkeit zur Untersuchung von strukturellen Veränderungen der TJ-Proteine und der Veränderung des zellulären Transports mittels Transzytose bietet der Einsatz von Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) (Segarra et al., 2018).

Desweiteren soll der Effekt der Thrombin-Inhibition im Hinblick auf pro-resiliente Effekte durch Einsatz von Hirudin untersucht werden. Hierbei soll untersucht werden, ob die Effekte tatsächlich von der luminalen Seite der Gefäße vermittelt werden, oder ob die Signalinduktion auch von der gefäßabgewandten Seite vermittelt werden kann. Hierfür könnte Hirudin

intracranial in den dorsalen Hippocampus injiziert werden. Neben der Untersuchung des Effekts der Thrombin-Inhibition sollte auch der der Effekt der mTOR-Inhibition durch intracraniale Injektion von Rapamycin in den dorsalen Hippocampus untersucht werden.

Da vermutet wird, dass der Abbau der TJ Proteine durch die Matrixmetalloprotease MMP9 erfolgt soll in einem weiteren Experiment der MMP9 Inhibitor Doxycyclin verwendet werden. Dieser soll wie in den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten mit Rapamycin (s. 3.2) über mehrere Tage intraperitoneal injiziert werden

5 Literaturverzeichnis

- Abbott, N. Joan; Rönnbäck, Lars; Hansson, Elisabeth (2006): Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. In: *Nature reviews. Neuroscience* 7 (1), S. 41–53. DOI: 10.1038/nrn1824.
- Aird, William C. (2007): Phenotypic heterogeneity of the endothelium. I. Structure, function, and mechanisms. In: *Circulation research* 100 (2), S. 158–173. DOI: 10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a.
- Aird, William C. (2007): Phenotypic heterogeneity of the endothelium. II. Representative vascular beds. In: *Circulation research* 100 (2), S. 174–190. DOI: 10.1161/01.RES.0000255690.03436.ae.
- Antunes, M.; Biala, G. (2012): The novel object recognition memory. Neurobiology, test procedure, and its modifications. In: *Cognitive processing* 13 (2), S. 93–110. DOI: 10.1038/sj.npp.1301232.
- Armulik, Annika; Genové, Guillem; Betsholtz, Christer (2011): Pericytes. Developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. In: *Developmental cell* 21 (2), S. 193–215. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.07.001.
- Armulik, Annika; Genové, Guillem; Mäe, Maarja; Nisancioglu, Maya H.; Wallgard, Elisabet; Niaudet, Colin et al. (2010): Pericytes regulate the blood-brain barrier. In: *Nature* 468 (7323), S. 557–561. DOI: 10.1038/nature09522.
- Ayash, Sarah; Schmitt, Ulrich; Lyons, David M.; Müller, Marianne B. (2020): Stress inoculation in mice induces global resilience. In: *Translational psychiatry* 10 (1), S. 200. DOI: 10.1146/annurev.psych.121208.131631.
- Ayash, Sarah; Schmitt, Ulrich; Müller, Marianne B. (2020): Chronic social defeat-induced social avoidance as a proxy of stress resilience in mice involves conditioned learning. In: *Journal of psychiatric research* 120, S. 64–71. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2019.10.001.
- Bae, Jong-Sup; Yang, Likui; Manithody, Chandrashekhara; Rezaie, Alireza R. (2007): The ligand occupancy of endothelial protein C receptor switches the protease-activated receptor 1-dependent signaling specificity of thrombin from a permeability-enhancing to a barrier-protective response in endothelial cells. In: *Blood* 110 (12), S. 3909–3916. DOI: 10.1182/blood-2007-06-096651.
- Bae, Jong-Sup; Yang, Likui; Rezaie, Alireza R. (2007): Receptors of the protein C activation and activated protein C signaling pathways are colocalized in lipid rafts of endothelial cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (8), S. 2867–2872. DOI: 10.1073/pnas.0611493104.
- Bagot, Rosemary C.; Cates, Hannah M.; Purushothaman, Immanuel; Lorsch, Zachary S.; Walker, Deena M.; Wang, Junshi et al. (2016): Circuit-wide Transcriptional Profiling Reveals Brain Region-Specific Gene Networks Regulating Depression Anfälligeity. In: *Neuron* 90 (5), S. 969–983. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.04.015.
- Bagot, Rosemary C.; Parise, Eric M.; Peña, Catherine J.; Zhang, Hong-Xing; Maze, Ian; Chaudhury, Dipesh et al. (2015): Ventral hippocampal afferents to the nucleus accumbens regulate Anfälligeity to depression. In: *Nature communications* 6, S. 7062. DOI: 10.1038/ncomms8062.
- Balazs, Alejandro B.; Fabian, Attila J.; Esmon, Charles T.; Mulligan, Richard C. (2006): Endothelial protein C receptor (CD201) explicitly identifies hematopoietic stem cells in murine bone marrow. In: *Blood* 107 (6), S. 2317–2321. DOI: 10.1182/blood-2005-06-2249.
- Baldini, Sara; Restani, Laura; Baroncelli, Laura; Coltelli, Maila; Franco, Roberta; Cenni, Maria Cristina et al. (2013): Enriched early life experiences reduce adult anxiety-like behavior in rats. A role for insulin-like growth factor 1. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33 (28), S. 11715–11723. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3541-12.2013.
- Bergum, P. W.; Cruikshank, A.; Maki, S. L.; Kelly, C. R.; Ruf, W.; Vlasuk, G. P. (2001): Role of zymogen and activated factor X as scaffolds for the inhibition of the blood coagulation factor VIIa-tissue factor complex by recombinant nematode anticoagulant protein c2. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (13), S. 10063–10071. DOI: 10.1074/jbc.M009116200.
- Berton, Olivier; McClung, Colleen A.; DiLeone, Ralph J.; Krishnan, Vaishnav; Renthal, William; Russo, Scott J. et al. (2006): Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. In: *Science (New York, N.Y.)* 311 (5762), S. 864–868. DOI: 10.1126/science.1120972.
- Bishop-Fitzpatrick, Lauren; Mazefsky, Carla A.; Minshew, Nancy J.; Eack, Shaun M. (2015): The relationship between stress and social functioning in adults with autism spectrum disorder and without intellectual disability. In: *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* 8 (2), S. 164–173. DOI: 10.1016/j.jidevneu.2014.05.012.

Literaturverzeichnis

- Bochenek, Magdalena L.; Gogiraju, Rajinikanth; Großmann, Stefanie; Krug, Janina; Orth, Jennifer; Reyda, Sabine et al. (2022): EPCR-PAR1 biased signaling regulates perfusion recovery and neovascularization in peripheral ischemia. In: *JCI insight* 7 (14). DOI: 10.1172/jci.insight.157701.
- Bonanno, George A. (2004): Loss, trauma, and human resilience. Have we underestimated the human capacity to thrive after extremely aversive events? In: *The American psychologist* 59 (1), S. 20–28. DOI: 10.1037/0003-066X.59.1.20.
- Brockhurst, J.; Cheleuitte-Nieves, C.; Buckmaster, C. L.; Schatzberg, A. F.; Lyons, D. M. (2015): Stress inoculation modeled in mice. In: *Translational psychiatry* 5 (3), e537. DOI: 10.1038/tp.2015.34.
- Brown, E. J.; Albers, M. W.; Shin, T. B.; Ichikawa, K.; Keith, C. T.; Lane, W. S.; Schreiber, S. L. (1994): A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. In: *Nature* 369 (6483), S. 756–758. DOI: 10.1038/369756a0.
- Cao, Jun-Li; Covington, Herbert E.; Friedman, Allyson K.; Wilkinson, Matthew B.; Walsh, Jessica J.; Cooper, Donald C. et al. (2010): Mesolimbic dopamine neurons in the brain reward circuit mediate Anfälligkeit to social defeat and antidepressant action. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (49), S. 16453–16458. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3177-10.2010.
- Cappello, M.; Vlasuk, G. P.; Bergum, P. W.; Huang, S.; Hotez, P. J. (1995): Ancylostoma caninum anticoagulant peptide. A hookworm-derived inhibitor of human coagulation factor Xa. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (13), S. 6152–6156. DOI: 10.1073/pnas.92.13.6152.
- Chandran, Agata; Iyo, Abiye H.; Jernigan, Courtney S.; Legutko, Beata; Austin, Mark C.; Karolewicz, Beata (2013): Reduced phosphorylation of the mTOR signaling pathway components in the amygdala of rats exposed to chronic stress. In: *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 40, S. 240–245. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2012.08.001.
- Chaudhury, Dipesh; Walsh, Jessica J.; Friedman, Allyson K.; Juarez, Barbara; Ku, Stacy M.; Koo, Ja Wook et al. (2013): Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. In: *Nature* 493 (7433), S. 532–536. DOI: 10.1038/nature11713.
- Chen, Jianling; Alberts, Ian; Li, Xiaohong (2014): Dysregulation of the IGF-I/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in autism spectrum disorders. In: *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 35, S. 35–41. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2014.03.006.
- Chen, Xian-Guo; Liu, Fei; Song, Xing-Fu; Wang, Zhi-Hua; Dong, Zi-Qiang; Hu, Zhi-Quan et al. (2010): Rapamycin regulates Akt and ERK phosphorylation through mTORC1 and mTORC2 signaling pathways. In: *Molecular carcinogenesis* 49 (6), S. 603–610. DOI: 10.1002/mc.20628.
- Chévere-Torres, Itzamarie; Maki, Jordan M.; Santini, Emanuela; Klann, Eric (2012): Impaired social interactions and motor learning skills in tuberous sclerosis complex model mice expressing a dominant/negative form of tuberin. In: *Neurobiology of disease* 45 (1), S. 156–164. DOI: 10.1016/j.nbd.2011.07.018.
- Christoffel, Daniel J.; Golden, Sam A.; Russo, Scott J. (2011): Structural and synaptic plasticity in stress-related disorders. In: *Reviews in the neurosciences* 22 (5), S. 535–549. DOI: 10.1515/RNS.2011.044.
- Chuang, Jen-Chieh; Cui, Huxing; Mason, Brittany L.; Mahgoub, Melissa; Bookout, Angie L.; Yu, Hana G. et al. (2010): Chronic social defeat stress disrupts regulation of lipid synthesis. In: *Journal of lipid research* 51 (6), S. 1344–1353. DOI: 10.1194/jlr.M002196.
- Chung, J.; Kuo, C. J.; Crabtree, G. R.; Blenis, J. (1992): Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. In: *Cell* 69 (7), S. 1227–1236. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90643-q.
- Cleary, C.; Linde, J. A. S.; Hiscock, K. M.; Hadas, I.; Belmaker, R. H.; Agam, G. et al. (2008): Antidepressive-like effects of rapamycin in animal models. Implications for mTOR inhibition as a new target for treatment of affective disorders. In: *Brain research bulletin* 76 (5), S. 469–473. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2008.03.005.
- Cnops, Vanja; Iyer, Vinaya Rajagopal; Parathy, Nageiswari; Wong, Peiyan; Dawe, Gavin S. (2022): Test, rinse, repeat. A review of carryover effects in rodent behavioral assays. In: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 135, S. 104560. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2022.104560.
- Coomber, B. L.; Stewart, P. A. (1985): Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. In: *Microvascular research* 30 (1), S. 99–115. DOI: 10.1016/0026-2862(85)90042-1.
- Coppens, Caroline M.; Siripornmongkolchai, Taweepon; Wibrand, Karin; Alme, Maria Nordheim; Buwalda, Bauke; Boer, Sietse F. de et al. (2011): Social Defeat during Adolescence and Adulthood Differentially Induce BDNF-

Literaturverzeichnis

- Regulated Immediate Early Genes. In: *Frontiers in behavioral neuroscience* 5, S. 72. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2006.04687.x.
- Courtoy, P. J.; Boyles, J. (1983): Fibronectin in the microvasculature. Localization in the pericyte-endothelial interstitium. In: *Journal of ultrastructure research* 83 (3), S. 258–273. DOI: 10.1016/s0022-5320(83)90133-8.
- Covington, Herbert E.; Lobo, Mary Kay; Maze, Ian; Vialou, Vincent; Hyman, James M.; Zaman, Samir et al. (2010): Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (48), S. 16082–16090. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1731-10.2010.
- Cuevas, P.; Gutierrez-Diaz, J. A.; Reimers, D.; Dujovny, M.; Diaz, F. G.; Ausman, J. I. (1984): Pericyte endothelial gap junctions in human cerebral capillaries. In: *Anatomy and embryology* 170 (2), S. 155–159. DOI: 10.1007/BF00319000.
- Cunningham, John T.; Rodgers, Joseph T.; Arlow, Daniel H.; Vazquez, Francisca; Mootha, Vamsi K.; Puigserver, Pere (2007): mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex. In: *Nature* 450 (7170), S. 736–740. DOI: 10.1038/nature06322.
- Daneman, Richard; Zhou, Lu; Agalliu, Dritan; Cahoy, John D.; Kaushal, Amit; Barres, Ben A. (2010): The mouse blood-brain barrier transcriptome. A new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. In: *PLoS one* 5 (10), e13741. DOI: 10.1371/journal.pone.0013741.
- Daneman, Richard; Zhou, Lu; Kebede, Amanuel A.; Barres, Ben A. (2010): Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. In: *Nature* 468 (7323), S. 562–566. DOI: 10.1038/nature09513.
- Deacon, Robert M. J. (2006): Assessing nest building in mice. In: *Nature protocols* 1 (3), S. 1117–1119. DOI: 10.1038/nprot.2006.170.
- Del Zoppo, G. J.; Milner, R.; Mabuchi, T.; Hung, S.; Wang, X.; Koziol, J. A. (2006): Vascular matrix adhesion and the blood-brain barrier. In: *Biochemical Society transactions* 34 (Pt 6), S. 1261–1266. DOI: 10.1042/BST0341261.
- Der-Avakian, Andre; Mazei-Robison, Michelle S.; Kesby, James P.; Nestler, Eric J.; Markou, Athina (2014): Enduring deficits in brain reward function after chronic social defeat in rats. Anfalligkeit, resilience, and antidepressant response. In: *Biological psychiatry* 76 (7), S. 542–549. DOI: 10.1016/j.biopsych.2014.01.013.
- Di, Shi; Jiang, ZhiYing; Wang, Sen; Harrison, Laura M.; Castro-Echeverry, Eduardo; Stuart, Thomas C. et al. (2019): Labile Calcium-Permeable AMPA Receptors Constitute New Glutamate Synapses Formed in Hypothalamic Neuroendocrine Cells during Salt Loading. In: *eNeuro* 6 (4). DOI: 10.1152/jn.1992.67.1.84.
- Díaz-Flores, L.; Gutiérrez, R.; Madrid, J. F.; Varela, H.; Valladares, F.; Acosta, E.; Martín-Vasallo, P. (2009): Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. In: *Histology and histopathology* 24 (7), S. 909–969. DOI: 10.14670/HH-24.909.
- Disse, Jennifer; Petersen, Helle Heibroch; Larsen, Katrine S.; Persson, Egon; Esmon, Naomi; Esmon, Charles T. et al. (2011): The endothelial protein C receptor supports tissue factor ternary coagulation initiation complex signaling through protease-activated receptors. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (7), S. 5756–5767. DOI: 10.1074/jbc.M110.201228.
- Duclot, Florian; Hollis, Fiona; Darcy, Michael J.; Kabbaj, Mohamed (2011): Individual differences in novelty-seeking behavior in rats as a model for psychosocial stress-related mood disorders. In: *Physiology & behavior* 104 (2), S. 296–305. DOI: 10.1016/j.physbeh.2010.12.014.
- Duggan, B. M.; Dyson, H. J.; Wright, P. E. (1999): Inherent flexibility in a potent inhibitor of blood coagulation, recombinant nematode anticoagulant protein c2. In: *European journal of biochemistry* 265 (2), S. 539–548. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00781.x.
- Duman, Ronald S.; Li, Nanxin (2012): A neurotrophic hypothesis of depression. Role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 367 (1601), S. 2475–2484. DOI: 10.1098/rstb.2011.0357.
- Efeyan, Alejo; Zoncu, Roberto; Chang, Steven; Gumper, Iwona; Snitkin, Harriet; Wolfson, Rachel L. et al. (2013): Regulation of mTORC1 by the Rag GTPases is necessary for neonatal autophagy and survival. In: *Nature* 493 (7434), S. 679–683. DOI: 10.1038/nature11745.
- Ehninger, Dan; Silva, Alcino J. (2011): Increased levels of anxiety-related behaviors in a Tsc2 dominant negative transgenic mouse model of tuberous sclerosis. In: *Behavior genetics* 41 (3), S. 357–363. DOI: 10.1007/s10519-010-9398-1.

Literaturverzeichnis

- Faraco, Giuseppe; Park, Laibaik; Anrather, Josef; Iadecola, Costantino (2017): Brain perivascular macrophages. Characterization and functional roles in health and disease. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 95 (11), S. 1143–1152. DOI: 10.1007/s00109-017-1573-x.
- Fenton, Tim R.; Gout, Ivan T. (2011): Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 43 (1), S. 47–59. DOI: 10.1016/j.biocel.2010.09.018.
- Fortin, Dale A.; Srivastava, Taasin; Dwarakanath, Diya; Pierre, Philippe; Nygaard, Sean; Derkach, Victor A.; Soderling, Thomas R. (2012): Brain-derived neurotrophic factor activation of CaM-kinase kinase via transient receptor potential canonical channels induces the translation and synaptic incorporation of GluA1-containing calcium-permeable AMPA receptors. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32 (24), S. 8127–8137. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6034-11.2012.
- Franklin, Tamara B.; Saab, Bechara J.; Mansuy, Isabelle M. (2012): Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. In: *Neuron* 75 (5), S. 747–761. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.08.016.
- Friedman, Allyson (2014): Neuroscience. Jump-starting natural resilience reverses stress Anfälligkeit. In: *Science (New York, N.Y.)* 346 (6209), S. 555. DOI: 10.1126/science.1260781.
- Friedman, Allyson K.; Walsh, Jessica J.; Juarez, Barbara; Ku, Stacy M.; Chaudhury, Dipesh; Wang, Jing et al. (2014): Enhancing depression mechanisms in midbrain dopamine neurons achieves homeostatic resilience. In: *Science (New York, N.Y.)* 344 (6181), S. 313–319. DOI: 10.1126/science.1249240.
- Fukudome, K.; Esmon, C. T. (1994): Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (42), S. 26486–26491.
- Gallo, Francisco T.; Katche, Cynthia; Morici, Juan F.; Medina, Jorge H.; Weisstaub, Noelia V. (2018): Immediate Early Genes, Memory and Psychiatric Disorders. Focus on c-Fos, Egr1 and Arc. In: *Frontiers in behavioral neuroscience* 12, S. 79. DOI: 10.3389/fnbeh.2018.00079.
- Gerhardt, Holger; Wolburg, Hartwig; Redies, Christoph (2000): N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken. In: *Developmental Dynamics* 218 (3), S. 472–479. DOI: 10.1002/1097-0177(200007)218:3<472::AID-DVDY1008>3.0.CO;2-%23.
- Ghosh, Samit; Pendurthi, Usha R.; Steinoe, Anne; Esmon, Charles T.; Rao, L. Vijaya Mohan (2007): Endothelial cell protein C receptor acts as a cellular receptor for factor VIIa on endothelium. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (16), S. 11849–11857. DOI: 10.1074/jbc.M609283200.
- Gleeson, Eimear M.; O'Donnell, James S.; Preston, Roger J. S. (2012): The endothelial cell protein C receptor. Cell surface conductor of cytoprotective coagulation factor signaling. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69 (5), S. 717–726. DOI: 10.1007/s00018-011-0825-0.
- Golden, Sam A.; Christoffel, Daniel J.; Heshmati, Mitra; Hodes, Georgia E.; Magida, Jane; Davis, Keithara et al. (2013): Epigenetic regulation of RAC1 induces synaptic remodeling in stress disorders and depression. In: *Nature medicine* 19 (3), S. 337–344. DOI: 10.1038/nm.3090.
- Golderman, Valery; Ben-Shimon, Marina; Maggio, Nicola; Dori, Amir; Gofrit, Shany Guly; Berkowitz, Shani et al. (2022): Factor VII, EPCR, aPC Modulators. Novel treatment for neuroinflammation. In: *Journal of neuroinflammation* 19 (1), S. 138. DOI: 10.1186/s12974-022-02505-y.
- Griffin, John H.; Zlokovic, Berislav V.; Mosnier, Laurent O. (2015): Activated protein C. Biased for translation. In: *Blood* 125 (19), S. 2898–2907. DOI: 10.1182/blood-2015-02-355974.
- Gu, Jian-Ming; Crawley, James T. B.; Ferrell, Gary; Zhang, Fangjiu; Li, Weihong; Esmon, Naomi L.; Esmon, Charles T. (2002): Disruption of the endothelial cell protein C receptor gene in mice causes placental thrombosis and early embryonic lethality. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (45), S. 43335–43343. DOI: 10.1074/jbc.M207538200.
- Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF. Imaging neural activity with temporal and cellular resolution using FISH. *Curr Opin Neurobiol.* 2001 Oct;11(5):579-84. doi: 10.1016/s0959-4388(00)00252-x. PMID: 11595491.
- Gwinn, Dana M.; Shackelford, David B.; Egan, Daniel F.; Mihaylova, Maria M.; Mery, Annabelle; Vasquez, Debbie S. et al. (2008): AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. In: *Molecular Cell* 30 (2), S. 214–226. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.03.003.
- Hall, Catherine N.; Reynell, Clare; Gesslein, Bodil; Hamilton, Nicola B.; Mishra, Anusha; Sutherland, Brad A. et al. (2014): Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. In: *Nature* 508 (7494), S. 55–60. DOI: 10.1038/nature13165.

Literaturverzeichnis

- Hammond, Rebecca S.; Tull, Laura E.; Stackman, Robert W. (2004): On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. In: *Neurobiology of learning and memory* 82 (1), S. 26–34. DOI: 10.1016/j.nlm.2004.03.005.
- Hara, Kenta; Maruki, Yoshiko; Long, Xiaomeng; Yoshino, Ken-ichi; Oshiro, Noriko; Hidayat, Sujuti et al. (2002): Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. In: *Cell* 110 (2), S. 177–189. DOI: 10.1016/s0092-8674(02)00833-4.
- Harvey, Brian H.; Shahid, Mohammed (2012): Metabotropic and ionotropic glutamate receptors as neurobiological targets in anxiety and stress-related disorders. Focus on pharmacology and preclinical translational models. In: *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 100 (4), S. 775–800. DOI: 10.1016/j.pbb.2011.06.014.
- Hawkins, Brian T.; Davis, Thomas P. (2005): The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. In: *Pharmacological reviews* 57 (2), S. 173–185. DOI: 10.1124/pr.57.2.4.
- Healy, Laura D.; Puy, Cristina; Fernández, José A.; Mitrugno, Annachiara; Keshari, Ravi S.; Taku, Nyiawung A. et al. (2017): Activated protein C inhibits neutrophil extracellular trap formation in vitro and activation in vivo. In: *The Journal of biological chemistry* 292 (21), S. 8616–8629. DOI: 10.1074/jbc.M116.768309.
- Hill, M. N. (2012): Introduction to the special issue on stress, emotional behavior, and the endocannabinoid system. A decade of research. In: *Neuroscience* 204, S. 1–4. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.01.038.
- Homberg, Judith R.; van den Akker, Margot; Raasø, Halfdan S.; Wardeh, George; Binnekade, Rob; Schoffelmeer, Anton N. M.; Vries, Taco J. de (2002): Enhanced motivation to self-administer cocaine is predicted by self-grooming behaviour and relates to dopamine release in the rat medial prefrontal cortex and amygdala. In: *The European journal of neuroscience* 15 (9), S. 1542–1550. DOI: 10.1046/j.1460-9568.2002.01976.x.
- Hudson, Christine C.; Liu, Mei; Chiang, Gary G.; Otterness, Diane M.; Loomis, Dawn C.; Kaper, Fiona et al. (2002): Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. In: *Molecular and cellular biology* 22 (20), S. 7004–7014. DOI: 10.1128/MCB.22.20.7004-7014.2002.
- Hultman, Rainbo; Ulrich, Kyle; Sachs, Benjamin D.; Blount, Cameron; Carlson, David E.; Ndubuizu, Nkemdilim et al. (2018): Brain-wide Electrical Spatiotemporal Dynamics Encode Depression Vulnerability. In: *Cell* 173 (1), 166–180.e14. DOI: 10.1016/j.cell.2018.02.012.
- Inoki, Ken; Kim, Joungmok; Guan, Kun-Liang (2012): AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 52, S. 381–400. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134537.
- Inoki, Ken; Li, Yong; Xu, Tian; Guan, Kun-Liang (2003): Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. In: *Genes & development* 17 (15), S. 1829–1834. DOI: 10.1101/gad.1110003.
- Jacinto, Estela; Facchinetti, Valeria; Liu, Dou; Soto, Nelyn; Wei, Shiniu; Jung, Sung Yun et al. (2006): SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and Regulates Akt Phosphorylation and Substrate Specificity. In: *Cell* 127 (1), S. 125–137. DOI: 10.1016/j.cell.2006.08.033.
- Jacinto, Estela; Loewith, Robbie; Schmidt, Anja; Lin, Shuo; Ruegg, Markus A.; Hall, Alan; Hall, Michael N. (2004): Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. In: *Nature cell biology* 6 (11), S. 1122–1128. DOI: 10.1038/ncb1183.
- Jiang, Ning; Lv, Jing-Wei; Wang, Hai-Xia; Lu, Cong; Wang, Qiong; Xia, Tian-Ji et al. (2019): Dammarane sapogenins alleviates depression-like behaviours induced by chronic social defeat stress in mice through the promotion of the BDNF signalling pathway and neurogenesis in the hippocampus. In: *Brain research bulletin* 153, S. 239–249. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2019.09.007.
- Johnson, John D.; Barnard, David F.; Kulp, Adam C.; Mehta, Devanshi M. (2019): Neuroendocrine Regulation of Brain Cytokines After Psychological Stress. In: *Journal of the Endocrine Society* 3 (7), S. 1302–1320. DOI: 10.1210/je.2019-00053.
- Joyce, D. E.; Gelbert, L.; Ciaccia, A.; DeHoff, B.; Grinnell, B. W. (2001): Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (14), S. 11199–11203. DOI: 10.1074/jbc.C100017200.
- Kalisch, Raffael; Cramer, Angélique O. J.; Binder, Harald; Fritz, Jessica; Leertouwer, IJsbrand; Lunansky, Gabriela et al. (2019): Deconstructing and Reconstructing Resilience. A Dynamic Network Approach. In: *Perspectives on psychological science : a journal of the Association for Psychological Science* 14 (5), S. 765–777. DOI: 10.1177/1745691619855637.

Literaturverzeichnis

- Kalueff, Allan V.; Stewart, Adam Michael; Song, Cai; Berridge, Kent C.; Graybiel, Ann M.; Fentress, John C. (2016): Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. In: *Nature reviews. Neuroscience* 17 (1), S. 45–59. DOI: 10.1038/nrn.2015.8.
- Kashii, Hirofumi; Kasa, Shinya; A, Sato; Hagino, Yoko; Nishito, Yasumasa; Kobayashi, Toshiyuki et al. (2022): Tsc2 mutation rather than Tsc1 mutation dominantly causes a social deficit in a mouse model of tuberous sclerosis complex. PREPRINT (Version 2) available at Research Square. DOI: 10.21203/rs.3.rs-2074843/v2.
- Kim, Do-Hyung; Sarbassov, D. D.; Ali, Siraj M.; King, Jessie E.; Latek, Robert R.; Erdjument-Bromage, Hediye et al. (2002): mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. In: *Cell* 110 (2), S. 163–175. DOI: 10.1016/s0092-8674(02)00808-5.
- Kim, Do-Hyung; Sarbassov, Dos D.; Ali, Siraj M.; Latek, Robert R.; Guntur, Kalyani V.P; Erdjument-Bromage, Hediye et al. (2003): GβL, a Positive Regulator of the Rapamycin-Sensitive Pathway Required for the Nutrient-Sensitive Interaction between Raptor and mTOR. In: *Molecular Cell* 11 (4), S. 895–904. DOI: 10.1016/S1097-2765(03)00114-X.
- Kivisäkk, Pia; Carlyle, Becky C.; Sweeney, Thadryan; Quinn, James P.; Ramirez, Christopher E.; Trombetta, Bianca A. et al. (2022): Increased levels of the synaptic proteins PSD-95, SNAP-25, and neurogranin in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. In: *Alzheimer's research & therapy* 14 (1), S. 58. DOI: 10.1186/s13195-022-01002-x.
- Koni, P. A.; Joshi, S. K.; Temann, U. A.; Olson, D.; Burkly, L.; Flavell, R. A. (2001): Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice. Impaired lymphocyte migration to bone marrow. In: *The Journal of experimental medicine* 193 (6), S. 741–754. DOI: 10.1084/jem.193.6.741.
- Kraeuter, Ann-Katrin; Guest, Paul C.; Sarnyai, Zoltán (2019): The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1916, S. 105–111. DOI: 10.1007/978-1-4939-8994-2_10.
- Krishnan, Vaishnav; Han, Ming-Hu; Graham, Danielle L.; Berton, Olivier; Renthal, William; Russo, Scott J. et al. (2007): Molecular adaptations underlying Anfälligkeit and resistance to social defeat in brain reward regions. In: *Cell* 131 (2), S. 391–404. DOI: 10.1016/j.cell.2007.09.018.
- Kubik, Stepan; Miyashita, Teiko; Guzowski, John F. (2007): Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. In: *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 14 (11), S. 758–770. DOI: 10.1101/lm.698107.
- Lamming, Dudley W. (2016): Inhibition of the Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR)–Rapamycin and Beyond. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 6 (5). DOI: 10.1101/cshperspect.a025924.
- Lamming, Dudley W.; Ye, Lan; Katajisto, Pekka; Goncalves, Marcus D.; Saitoh, Maki; Stevens, Deanna M. et al. (2012): Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. In: *Science (New York, N.Y.)* 335 (6076), S. 1638–1643. DOI: 10.1126/science.1215135.
- Larson, David M.; Carson, Mary P.; Haudenschild, Christian C. (1987): Junctional transfer of small molecules in cultured bovine brain microvascular endothelial cells and pericytes. In: *Microvascular research* 34 (2), S. 184–199. DOI: 10.1016/0026-2862(87)90052-5.
- Laszik, Z.; Mitro, A.; Taylor, F. B.; Ferrell, G.; Esmon, C. T. (1997): Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels. Implications for the control of the protein C pathway. In: *Circulation* 96 (10), S. 3633–3640. DOI: 10.1161/01.cir.96.10.3633.
- Le Xu; Nan, Jun; Lan, Yan (2020): The Nucleus Accumbens. A Common Target in the Comorbidity of Depression and Addiction. In: *Frontiers in neural circuits* 14, S. 37. DOI: 10.3389/fncir.2020.00037.
- Lee, A. Y. Y.; Vlasuk, G. P. (2003): Recombinant nematode anticoagulant protein c2 and other inhibitors targeting blood coagulation factor VIIa/tissue factor. In: *Journal of internal medicine* 254 (4), S. 313–321. DOI: 10.1046/j.1365-2796.2003.01224.x.
- Lenz, Guido; Avruch, Joseph (2005): Glutamatergic regulation of the p70S6 kinase in primary mouse neurons. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (46), S. 38121–38124. DOI: 10.1074/jbc.C500363200.
- Levone, Brunno R.; Cryan, John F.; O'Leary, Olivia F. (2015): Role of adult hippocampal neurogenesis in stress resilience. In: *Neurobiology of stress* 1, S. 147–155. DOI: 10.1016/j.ynstr.2014.11.003.
- Li, Yong; Inoki, Ken; Guan, Kun-Liang (2004): Biochemical and functional characterizations of small GTPase Rheb and TSC2 GAP activity. In: *Molecular and cellular biology* 24 (18), S. 7965–7975. DOI: 10.1128/MCB.24.18.7965-7975.2004.

Literaturverzeichnis

- Liu, Haoran; Zhang, Chenfeng; Ji, Yannan; Yang, Li (2018): Biological and Psychological Perspectives of Resilience. Is It Possible to Improve Stress Resistance? In: *Frontiers in human neuroscience* 12, S. 326. DOI: 10.3389/fnhum.2018.00326.
- Liu, Yang; Deng, Si-Long; Li, Liang-Xia; Zhou, Zi-Xiang; Lv, Qiu; Wang, Zhong-Yuan et al. (2022): A circuit from dorsal hippocampal CA3 to paravox nucleus mediates chronic social defeat stress-induced deficits in preference for social novelty. In: *Science advances* 8 (8), eabe8828. DOI: 10.1126/sciadv.abe8828.
- López-Sagasetta, J.; Montes, R.; Puy, C.; Díez, N.; Fukudome, K.; Hermida, J. (2007): Binding of factor VIIa to the endothelial cell protein C receptor reduces its coagulant activity. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 5 (9), S. 1817–1824. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2007.02648.x.
- Luo, Yu-Fei; Ye, Xiao-Xia; Fang, Ying-Zhao; Li, Meng-Die; Xia, Zhi-Xuan; Liu, Jian-Min et al. (2021): mTORC1 Signaling Pathway Mediates Chronic Stress-Induced Synapse Loss in the Hippocampus. In: *Frontiers in pharmacology* 12, S. 801234. DOI: 10.1016/j.biopsych.2017.05.016.
- Ma, Xiaojun; Blenis, John (2009): Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (5), S. 307–318. DOI: 10.1038/nrm2672.
- Majesky, Mark W. (2007): Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27 (6), S. 1248–1258. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.141069.
- Manning, Claire E.; Williams, Elizabeth S.; Robison, Alfred J. (2017): Reward Network Immediate Early Gene Expression in Mood Disorders. In: *Frontiers in behavioral neuroscience* 11, S. 77. DOI: 10.3389/fnbeh.2017.00077.
- Matsuda, S.; Peng, H.; Yoshimura, H.; Wen, T. C.; Fukuda, T.; Sakanaka, M. (1996): Persistent c-fos expression in the brains of mice with chronic social stress. In: *Neuroscience research* 26 (2), S. 157–170.
- Mayberg, Helen S.; Lozano, Andres M.; Voon, Valerie; McNeely, Heather E.; Seminowicz, David; Hamani, Clement et al. (2005): Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. In: *Neuron* 45 (5), S. 651–660. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.02.014.
- McCabe, Matthew P.; Cullen, Erin R.; Barrows, Caitlynn M.; Shore, Amy N.; Tooke, Katherine I.; Laprade, Kathryn A. et al. (2020): Genetic inactivation of mTORC1 or mTORC2 in neurons reveals distinct functions in glutamatergic synaptic transmission. In: *eLife* 9. DOI: 10.7554/eLife.51440.
- McConnell, Heather L.; Kersch, Cyron N.; Woltjer, Randall L.; Neuwelt, Edward A. (2017): The Translational Significance of the Neurovascular Unit. In: *The Journal of biological chemistry* 292 (3), S. 762–770. DOI: 10.1074/jbc.R116.760215.
- McEwen, Bruce S.; Morrison, John H. (2013): The brain on stress. Vulnerability and plasticity of the prefrontal cortex over the life course. In: *Neuron* 79 (1), S. 16–29. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.06.028.
- MCEWEN, B. (2002): Sex, stress and the hippocampus. Allostasis, allostatic load and the aging process. In: *Neurobiology of Aging* 23 (5), S. 921–939. DOI: 10.1016/S0197-4580(02)00027-1.
- Misiewicz, Zuzanna; Iurato, Stella; Kuleskaya, Natalia; Salminen, Laura; Rodrigues, Luis; Maccarrone, Giuseppina et al. (2019): Multi-omics analysis identifies mitochondrial pathways associated with anxiety-related behavior. In: *PLoS genetics* 15 (9), e1008358. DOI: 10.1371/journal.pgen.1008358.
- Mohan Rao, L. Vijaya; Esmon, Charles T.; Pendurthi, Usha R. (2014): Endothelial cell protein C receptor. A multiliganded and multifunctional receptor. In: *Blood* 124 (10), S. 1553–1562. DOI: 10.1182/blood-2014-05-578328.
- Moschovakis, A.; Liakopoulos, D.; Armaganidis, A.; Kapsambelis, V.; Papanikolaou, G.; Petroulakis, G. (1978): Cannabis interferes with nest-building behavior in mice. In: *Psychopharmacology* 58 (2), S. 181–183. DOI: 10.1007/BF00426904.
- Mosnier, Laurent O.; Zlokovic, Berislav V.; Griffin, John H. (2007): The cytoprotective protein C pathway. In: *Blood* 109 (8), S. 3161–3172. DOI: 10.1182/blood-2006-09-003004.
- Mülhardt, Cornel (2013): *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Müller-Calleja, Nadine; Hollerbach, Anne; Royce, Jennifer; Ritter, Svenja; Pedrosa, Denise; Madhusudhan, Thati et al. (2021): Lipid presentation by the protein C receptor links coagulation with autoimmunity. In: *Science (New York, N.Y.)* 371 (6534). DOI: 10.1126/science.abc0956.
- Nakamura, Jay P.; Gillespie, Brendan; Gibbons, Andrew; Jaehne, Emily J.; Du, Xin; Chan, Aaron et al. (2021): Maternal immune activation targeted to a window of parvalbumin interneuron development improves spatial

Literaturverzeichnis

- working memory. Implications for autism. In: *Brain, behavior, and immunity* 91, S. 339–349. DOI: 10.1016/j.bbi.2020.10.012.
- Nayak, Ramesh C.; Sen, Prosenjit; Ghosh, Samit; Gopalakrishnan, Ramakrishnan; Esmon, Charles T.; Pendurthi, Usha R.; Rao, L. Vijaya Mohan (2009): Endothelial cell protein C receptor cellular localization and trafficking. Potential functional implications. In: *Blood* 114 (9), S. 1974–1986. DOI: 10.1182/blood-2009-03-208900.
- Nestler, Eric J.; Barrot, Michel; DiLeone, Ralph J.; Eisch, Amelia J.; Gold, Stephen J.; Monteggia, Lisa M. (2002): Neurobiology of depression. In: *Neuron* 34 (1), S. 13–25. DOI: 10.1016/s0896-6273(02)00653-0.
- Nie, Duyu; Di Nardo, Alessia; Han, Juliette M.; Baharanyi, Hasani; Kramvis, Ioannis; Huynh, Thanhthao et al. (2010): Tsc2-Rheb signaling regulates EphA-mediated axon guidance. In: *Nature neuroscience* 13 (2), S. 163–172. DOI: 10.1038/nn.2477.
- Novick, Andrew M.; Miiller, Leah C.; Forster, Gina L.; Watt, Michael J. (2013): Adolescent social defeat decreases spatial working memory performance in adulthood. In: *Behavioral and brain functions : BBF* 9, S. 39. DOI: 10.1016/j.psychres.2011.12.045.
- Oganesyan, Vaheh; Oganesyan, Natalia; Terzyan, Simon; Qu, Dongfeng; Dauter, Zbigniew; Esmon, Naomi L.; Esmon, Charles T. (2002): The crystal structure of the endothelial protein C receptor and a bound phospholipid. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (28), S. 24851–24854. DOI: 10.1074/jbc.C200163200.
- Okamura, Hibiki; Yasugaki, Shinnosuke; Suzuki-Abe, Haruka; Arai, Yoshifumi; Sakurai, Katsuyasu; Yanagisawa, Masashi et al. (2022): Long-Term Effects of Repeated Social Defeat Stress on Brain Activity during Social Interaction in BALB/c Mice. In: *eNeuro* 9 (3). DOI: 10.1523/ENEURO.0068-22.2022.
- O'Leary, O. (2014): S.23.01 GABAB1 receptor subunit isoforms differentially modulate resilience to stress. In: *European Neuropsychopharmacology* 24, S139. DOI: 10.1016/s0924-977x(14)70197-x.
- Onda, H.; Lueck, A.; Marks, P. W.; Warren, H. B.; Kwiatkowski, D. J. (1999): Tsc2(+/-) mice develop tumors in multiple sites that express gelsolin and are influenced by genetic background. In: *The Journal of clinical investigation* 104 (6), S. 687–695. DOI: 10.1172/JCI7319.
- Paladini, C. A.; Roeper, J. (2014): Generating bursts (and pauses) in the dopamine midbrain neurons. In: *Neuroscience* 282, S. 109–121. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.07.032.
- Palkovits, M. (1983): Punch sampling biopsy technique. In: *Methods in enzymology* 103, S. 368–376. DOI: 10.1016/S0076-6879(83)03025-6.
- Pan, Ying; Chen, Xu-Yang; Zhang, Qing-Yu; Kong, Ling-Dong (2014): Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 β -related inflammation in prefrontal cortex of depressive rats. In: *Brain, behavior, and immunity* 41, S. 90–100. DOI: 10.1016/j.bbi.2014.04.007.
- Park, Mikyoung (2018): AMPA Receptor Trafficking for Postsynaptic Potentiation. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 12, S. 361. DOI: 10.3389/fncel.2018.00361.
- Park, So Yeon; Lee, Hee Eun; Li, Hailun; Shipitsin, Michail; Gelman, Rebecca; Polyak, Kornelia (2010): Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16 (3), S. 876–887. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1532.
- Patterson, Zachary R.; Abizaid, Alfonso (2013): Stress induced obesity. Lessons from rodent models of stress. In: *Frontiers in neuroscience* 7, S. 130. DOI: 10.1210/en.140.7.3183.
- Peng, Xiangmin; Kim, Jeeyong; Zhou, Zhigang; Fink, David J.; Mata, Marina (2011): Neuronal Nogo-A regulates glutamate receptor subunit expression in hippocampal neurons. In: *Journal of neurochemistry* 119 (6), S. 1183–1193. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07520.x.
- Peppiatt, Claire M.; Howarth, Clare; Mobbs, Peter; Attwell, David (2006): Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. In: *Nature* 443 (7112), S. 700–704. DOI: 10.1038/nature05193.
- Perlman, George; Tanti, Arnaud; Mechawar, Naguib (2021): Parvalbumin interneuron alterations in stress-related mood disorders. A systematic review. In: *Neurobiology of stress* 15, S. 100380. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.08.005.
- Peterson, Timothy R.; Laplante, Mathieu; Thoreen, Carson C.; Sancak, Yasemin; Kang, Seong A.; Kuehl, W. Michael et al. (2009): DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. In: *Cell* 137 (5), S. 873–886. DOI: 10.1016/j.cell.2009.03.046.

Literaturverzeichnis

- Peterson, Timothy R.; Sengupta, Shomit S.; Harris, Thurl E.; Carmack, Anne E.; Kang, Seong A.; Balderas, Eric et al. (2011): mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. In: *Cell* 146 (3), S. 408–420. DOI: 10.1016/j.cell.2011.06.034.
- Popoli, Maurizio; Yan, Zhen; McEwen, Bruce S.; Sanacora, Gerard (2011): The stressed synapse. The impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. In: *Nature reviews. Neuroscience* 13 (1), S. 22–37. DOI: 10.1038/nrn3138.
- Provenzano, Giovanni; Zunino, Giulia; Genovesi, Sacha; Sgadó, Paola; Bozzi, Yuri (2012): Mutant mouse models of autism spectrum disorders. In: *Disease markers* 33 (5), S. 225–239. DOI: 10.3233/DMA-2012-0917.
- Qi, Guangjian; Zhang, Pei; Li, Tongxia; Li, Ming; Zhang, Qian; He, Feng et al. (2022): NAc-VTA circuit underlies emotional stress-induced anxiety-like behavior in the three-chamber vicarious social defeat stress mouse model. In: *Nature communications* 13 (1), S. 577. DOI: 10.1038/s41467-022-28190-2.
- Qian, Weijun; Yu, Chao; Wang, Shuai; Niu, Aijun; Shi, Guangyan; Cheng, Yuancui et al. (2020): Depressive-Like Behaviors Induced by Chronic Social Defeat Stress Are Associated With HDAC7 Reduction in the Nucleus Accumbens. In: *Frontiers in psychiatry* 11, S. 586904. DOI: 10.3389/fpsy.2020.586904.
- Quevedo, Celia; Salinas, Matilde; Alcázar, Alberto (2002): Regulation of cap-dependent translation by insulin-like growth factor-1 in neuronal cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 291 (3), S. 560–566. DOI: 10.1006/bbrc.2002.6479.
- Rezaie, Alireza R. (2011): The occupancy of endothelial protein C receptor by its ligand modulates the par-1 dependent signaling specificity of coagulation proteases. In: *IUBMB life* 63 (6), S. 390–396. DOI: 10.1002/iub.447.
- Rezaie, Alireza R. (2014): Protease-activated receptor signalling by coagulation proteases in endothelial cells. In: *Thrombosis and haemostasis* 112 (5), S. 876–882. DOI: 10.1160/TH14-02-0167.
- Ridler, K.; Suckling, J.; Higgins, N. J.; Vries, P. J. de; Stephenson, C. M. E.; Bolton, P. F.; Bullmore, E. T. (2007): Neuroanatomical correlates of memory deficits in tuberous sclerosis complex. In: *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 17 (2), S. 261–271. DOI: 10.1093/cercor/bhj144.
- Riewald, Matthias; Petrovan, Ramona J.; Donner, Aaron; Mueller, Barbara M.; Ruf, Wolfram (2002): Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. In: *Science (New York, N.Y.)* 296 (5574), S. 1880–1882. DOI: 10.1126/science.1071699.
- Ritsner, Michael S. (Hg.) (2010): Brain Protection in Schizophrenia, Mood and Cognitive Disorders. Dordrecht: Springer Science+Business Media B.V. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10396719>.
- Robison, A. J.; Vialou, Vincent; Sun, Hao-Sheng; Labonte, Benoit; Golden, Sam A.; Dias, Caroline et al. (2014): Fluoxetine epigenetically alters the CaMKII α promoter in nucleus accumbens to regulate Δ FosB binding and antidepressant effects. In: *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 39 (5), S. 1178–1186. DOI: 10.1038/npp.2013.319.
- Roy, Ram Vinod; Ardeshiryajimi, Abdolreza; Dinarvand, Peyman; Yang, Likui; Rezaie, Alireza R. (2016): Occupancy of human EPCR by protein C induces β -arrestin-2 biased PAR1 signaling by both APC and thrombin. In: *Blood* 128 (14), S. 1884–1893. DOI: 10.1182/blood-2016-06-720581.
- Rusconi, Francesco; Grillo, Barbara; Ponzoni, Luisa; Bassani, Silvia; Toffolo, Emanuela; Paganini, Leda et al. (2016): LSD1 modulates stress-evoked transcription of immediate early genes and emotional behavior. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (13), S. 3651–3656. DOI: 10.1073/pnas.1511974113.
- Russo, Angela; Soh, Unice J. K.; Paing, May M.; Arora, Puneeta; Trejo, Joann (2009): Caveolae are required for protease-selective signaling by protease-activated receptor-1. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (15), S. 6393–6397. DOI: 10.1073/pnas.0810687106.
- Russo, Scott J.; Murrough, James W.; Han, Ming-Hu; Charney, Dennis S.; Nestler, Eric J. (2012): Neurobiology of resilience. In: *Nature neuroscience* 15 (11), S. 1475–1484. DOI: 10.1038/nn.3234.
- Russo, Scott J.; Nestler, Eric J. (2013): The brain reward circuitry in mood disorders. In: *Nature reviews. Neuroscience* 14 (9), S. 609–625. DOI: 10.1038/nrn3381.
- Sabatini, David M.; Erdjument-Bromage, Hediye; Lui, Mary; Tempst, Paul; Snyder, Solomon H. (1994): RAFT1. A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. In: *Cell* 78 (1), S. 35–43. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90570-3.

Literaturverzeichnis

- Sancak, Yasemin; Thoreen, Carson C.; Peterson, Timothy R.; Lindquist, Robert A.; Kang, Seong A.; Spooner, Eric et al. (2007): PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. In: *Molecular Cell* 25 (6), S. 903–915. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.03.003.
- Sanchez-Covarrubias, Lucy; Slosky, Lauren M.; Thompson, Brandon J.; Davis, Thomas P.; Ronaldson, Patrick T. (2014): Transporters at CNS barrier sites. Obstacles or opportunities for drug delivery? In: *Current pharmaceutical design* 20 (10), S. 1422–1449. DOI: 10.2174/13816128113199990463.
- Sangüesa, Gemma; Roglans, Núria; Baena, Miguel; Velázquez, Ana Magdalena; Laguna, Juan Carlos; Alegret, Marta (2019): mTOR is a Key Protein Involved in the Metabolic Effects of Simple Sugars. In: *International journal of molecular sciences* 20 (5). DOI: 10.1007/s11010-016-2828-5.
- Sarbassov, D. D.; Ali, Siraj M.; Kim, Do-Hyung; Guertin, David A.; Latek, Robert R.; Erdjument-Bromage, Hediye et al. (2004): Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. In: *Current biology : CB* 14 (14), S. 1296–1302. DOI: 10.1016/j.cub.2004.06.054.
- Schmidt, Mathias V.; Trümbach, Dietrich; Weber, Peter; Wagner, Klaus; Scharf, Sebastian H.; Liebl, Claudia et al. (2010): Individual stress vulnerability is predicted by short-term memory and AMPA receptor subunit ratio in the hippocampus. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (50), S. 16949–16958. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4668-10.2010.
- Schneider, C. W.; Chenoweth, M. B. (1970): Effects of hallucinogenic and other drugs on the nest-building behaviour of mice. In: *Nature* 225 (5239), S. 1262–1263. DOI: 10.1038/2251262a0.
- Segarra, Marta; Aburto, Maria R.; Cop, Florian; Llaó-Cid, Cecília; Härtl, Ricarda; Damm, Miriam et al. (2018): Endothelial Dab1 signaling orchestrates neuro-glia-vessel communication in the central nervous system. In: *Science* 361 (6404). DOI: 10.1126/science.aao2861.
- Sen, Prosenjit; Gopalakrishnan, Ramakrishnan; Kothari, Hema; Keshava, Shiva; Clark, Curtis A.; Esmon, Charles T. et al. (2011): Factor VIIa bound to endothelial cell protein C receptor activates protease activated receptor-1 and mediates cell signaling and barrier protection. In: *Blood* 117 (11), S. 3199–3208. DOI: 10.1182/blood-2010-09-310706.
- Shalev, A. Y.; Freedman, S.; Peri, T.; Brandes, D.; Sahar, T.; Orr, S. P.; Pitman, R. K. (1998): Prospective study of posttraumatic stress disorder and depression following trauma. In: *The American journal of psychiatry* 155 (5), S. 630–637. DOI: 10.1176/ajp.155.5.630.
- Shepro, D.; Morel, N. M. (1993): Pericyte physiology. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 7 (11), S. 1031–1038. DOI: 10.1096/fasebj.7.11.8370472.
- Sims, D. E. (1986): The pericyte--a review. In: *Tissue & cell* 18 (2), S. 153–174. DOI: 10.1016/0040-8166(86)90026-1.
- Soh, Unice J. K.; Trejo, Joann (2011): Activated protein C promotes protease-activated receptor-1 cytoprotective signaling through β -arrestin and dishevelled-2 scaffolds. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (50), E1372–80. DOI: 10.1073/pnas.1112482108.
- Sorokin, Lydia (2010): The impact of the extracellular matrix on inflammation. In: *Nature reviews. Immunology* 10 (10), S. 712–723. DOI: 10.1038/nri2852.
- Stack, Ashley; Carrier, Nicole; Dietz, David; Hollis, Fiona; Sorenson, Jamie; Kabbaj, Mohamed (2010): Sex differences in social interaction in rats. Role of the immediate-early gene zif268. In: *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35 (2), S. 570–580. DOI: 10.1038/npp.2009.163.
- Stearns-Kurosawa, D. J.; Kurosawa, S.; Mollica, J. S.; Ferrell, G. L.; Esmon, C. T. (1996): The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (19), S. 10212–10216. DOI: 10.1073/pnas.93.19.10212.
- Takei, Nobuyuki; Inamura, Naoko; Kawamura, Mihoko; Namba, Hisaaki; Hara, Kenta; Yonezawa, Kazuyoshi; Nawa, Hiroyuki (2004): Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24 (44), S. 9760–9769. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1427-04.2004.
- Taliaz, Dekel; Loya, Assaf; Gersner, Roman; Haramati, Sharon; Chen, Alon; Zangen, Abraham (2011): Resilience to chronic stress is mediated by hippocampal brain-derived neurotrophic factor. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31 (12), S. 4475–4483. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5725-10.2011.

Literaturverzeichnis

- Tietz, Silvia; Engelhardt, Britta (2015): Brain barriers. Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. In: *The Journal of cell biology* 209 (4), S. 493–506. DOI: 10.1083/jcb.201412147.
- Tsai, Hsing-Chen; Zhang, Feng; Adamantidis, Antoine; Stuber, Garret D.; Bonci, Antonello; Lecea, Luis de; Deisseroth, Karl (2009): Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. In: *Science* (New York, N.Y.) 324 (5930), S. 1080–1084. DOI: 10.1126/science.1168878.
- Tsankova, Nadia M.; Berton, Olivier; Renthal, William; Kumar, Arvind; Neve, Rachel L.; Nestler, Eric J. (2006): Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. In: *Nature neuroscience* 9 (4), S. 519–525. DOI: 10.1038/nn1659.
- Ulrich-Lai, Yvonne M.; Herman, James P. (2009): Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. In: *Nature reviews. Neuroscience* 10 (6), S. 397–409. DOI: 10.1038/nrn2647.
- van Heijst, Barbara Fc; Deserno, Marie K.; Rhebergen, Didi; Geurts, Hilde M. (2020): Autism and depression are connected. A report of two complimentary network studies. In: *Autism : the international journal of research and practice* 24 (3), S. 680–692. DOI: 10.1177/1362361319872373.
- Vander Haar, Emilie; Lee, Seong-Il; Bandhakavi, Sricharan; Griffin, Timothy J.; Kim, Do-Hyung (2007): Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. In: *Nature cell biology* 9 (3), S. 316–323. DOI: 10.1038/ncb1547.
- Vézina, C.; Kudelski, A.; Sehgal, S. N. (1975): Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. In: *The Journal of antibiotics* 28 (10), S. 721–726. DOI: 10.7164/antibiotics.28.721.
- Võikar, V.; Vasar, E.; Rauvala, H. (2004): Behavioral alterations induced by repeated testing in C57BL/6J and 129S2/Sv mice. Implications for phenotyping screens. In: *Genes, brain, and behavior* 3 (1), S. 27–38. DOI: 10.1046/j.1601-183x.2003.0044.x.
- Volman, Susan F.; Lammel, Stephan; Margolis, Elyssa B.; Kim, Yunbok; Richard, Jocelyn M.; Roitman, Mitchell F.; Lobo, Mary Kay (2013): New insights into the specificity and plasticity of reward and aversion encoding in the mesolimbic system. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33 (45), S. 17569–17576. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3250-13.2013.
- Wang, Chang-Ying; Huang, An-Qi; Zhou, Meng-Hua; Mei, Yan-Ai (2014): GDF15 regulates Kv2.1-mediated outward K⁺ current through the Akt/mTOR signalling pathway in rat cerebellar granule cells. In: *The Biochemical journal* 460 (1), S. 35–47. DOI: 10.1042/BJ20140155.
- Wang, Lifu; Harris, Thurl E.; Roth, Richard A.; Lawrence, John C. (2007): PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (27), S. 20036–20044. DOI: 10.1074/jbc.M702376200.
- Wang, Minghui; Perova, Zinaida; Arenkiel, Benjamin R.; Li, Bo (2014): Synaptic modifications in the medial prefrontal cortex in Anfalligkeit and resilience to stress. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34 (22), S. 7485–7492. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5294-13.2014.
- Watkins, Laura E.; Sprang, Kelsey R.; Rothbaum, Barbara O. (2018): Treating PTSD. A Review of Evidence-Based Psychotherapy Interventions. In: *Frontiers in behavioral neuroscience* 12, S. 258. DOI: 10.1016/j.jbtep.2009.06.001.
- Welcome, Menzibeya O.; Mastorakis, Nikos E. (2020): Stress-induced blood brain barrier disruption. Molecular mechanisms and signaling pathways. In: *Pharmacological research* 157, S. 104769. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104769.
- Winden, Kellen D.; Sundberg, Maria; Yang, Cindy; Wafa, Syed M. A.; Dwyer, Sean; Chen, Pin-Fang et al. (2019): Biallelic Mutations in TSC2 Lead to Abnormalities Associated with Cortical Tubers in Human iPSC-Derived Neurons. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 39 (47), S. 9294–9305. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0642-19.2019.
- Wolburg, Hartwig; Wolburg-Buchholz, Karen; Fallier-Becker, Petra; Noell, Susan; Mack, Andreas F. (2011): Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles. In: *International review of cell and molecular biology* 287, S. 1–41. DOI: 10.1016/B978-0-12-386043-9.00001-3.
- Wu, Chuan; Ivars, Fredrik; Anderson, Per; Hallmann, Rupert; Vestweber, Dietmar; Nilsson, Per et al. (2009): Endothelial basement membrane laminin alpha5 selectively inhibits T lymphocyte extravasation into the brain. In: *Nature medicine* 15 (5), S. 519–527. DOI: 10.1038/nm.1957.

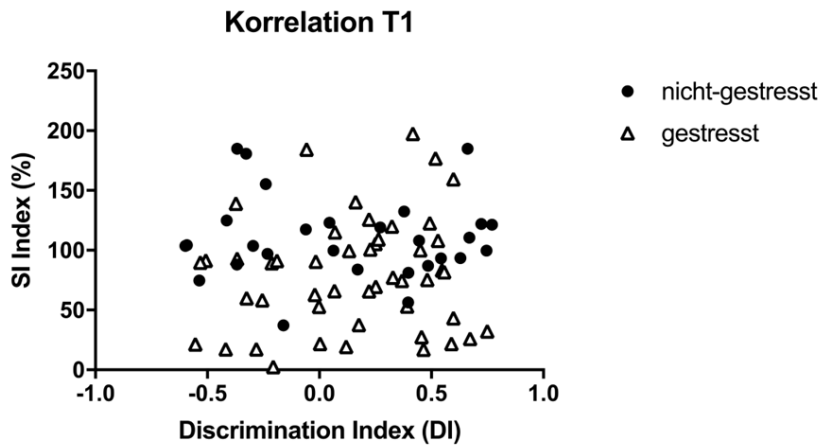
Literaturverzeichnis

- Yang, Changjun; Hawkins, Kimberly E.; Doré, Sylvain; Candelario-Jalil, Eduardo (2019): Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 316 (2), C135-C153. DOI: 10.1152/ajpcell.00136.2018.
- Yang, Haijuan; Rudge, Derek G.; Koos, Joseph D.; Vaidialingam, Bhamini; Yang, Hyo J.; Pavletich, Nikola P. (2013): mTOR kinase structure, mechanism and regulation. In: *Nature* 497 (7448), S. 217–223. DOI: 10.1038/nature12122.
- Yao, Jin-Jing; Sun, Ji; Zhao, Qian-Ru; Wang, Chang-Ying; Mei, Yan-Ai (2013): Neuregulin-1/ErbB4 signaling regulates Kv4.2-mediated transient outward K⁺ current through the Akt/mTOR pathway. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 305 (2), C197-206. DOI: 10.1152/ajpcell.00041.2013.
- Yonezawa, Kazuyoshi; Tokunaga, Chiharu; Oshiro, Noriko; Yoshino, Ken-ichi (2004): Raptor, a binding partner of target of rapamycin. In: *Biochemical and biophysical research communications* 313 (2), S. 437–441. DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.07.018.
- Yu, Tao; Guo, Ming; Garza, Jacob; Rendon, Samantha; Sun, Xue-Li; Zhang, Wei; Lu, Xin-Yun (2011): Cognitive and neural correlates of depression-like behaviour in socially defeated mice. An animal model of depression with cognitive dysfunction. In: *The international journal of neuropsychopharmacology* 14 (3), S. 303–317. DOI: 10.1017/S1461145710000945.
- Yuan, Qiang; Zhang, Dalong; Wu, Sirong; Yu, Jian; Yu, Lei; Sun, Yirui et al. (2017): FVIIa prevents the progressive hemorrhaging of a brain contusion by protecting microvessels via formation of the TF-FVIIa-FXa complex. In: *Neuroscience* 348, S. 114–125. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2017.02.020.
- Zhu, Zhaoming; Wang, Guangyan; Ma, Ke; Cui, Shan; Wang, Jin-Hui (2017): GABAergic neurons in nucleus accumbens are correlated to resilience and vulnerability to chronic stress for major depression. In: *Oncotarget* 8 (22), S. 35933–35945. DOI: 10.1371/journal.pone.0166535.
- Zukin, Suzanne R.; Jover, Teresa; Yokota, Hidenori; Calderone, Agata; Simionescu, Monica; Lau, Geoff C. (2004): Chapter 42 - Molecular and Cellular Mechanisms of Ischemia-Induced Neuronal Death. In: *Stroke (Fourth Edition)*, S. 829–854. DOI: 10.1016/B0-44-306600-0/50049-3.

6 Anhang

6.1 weitere Informationen

a



b

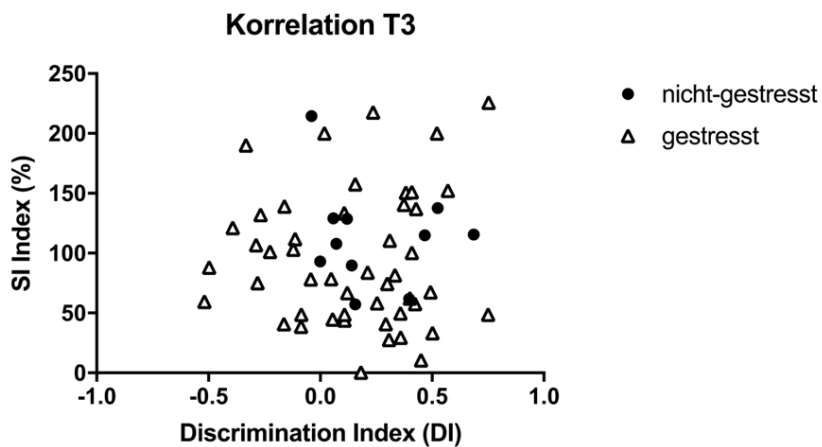


Abbildung 6.1.1: a Korrelationsanalyse der Verhaltensdomänen Sozialverhalten und Gedächtnisleistung zum Zeitpunkt T1 nicht-gestresst $r = -0.03813$ $p = 0.8473$, gestresst $r = 0.1133$ $p = 0.4431$, Pearson r , b Korrelationsanalyse der Verhaltensdomänen Sozialverhalten und Gedächtnisleistung zum Zeitpunkt T3 nicht-gestresst $r = -0.1934$ $p = 0.5688$, gestresst $r = 0.02714$ $p = 0.8547$, Pearson r

6.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
4E-BP	eIF4E Binding Protein
A	Ampere
ACTH	adrenocorticotrope Hormon
AMPK	Adenosine monophosphate-activated protein kinase
APC	Activated protein C
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AVP	Arg(inin)-vasopressin (antidiuretisches Hormon)
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	Complementary DNA
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
CRF	Corticotropin Releasing Factor
CSD	Chronic Social Defeat
CSDS	Chronic Social Defeat Stress
CUS	Chronic Unpredictable Stress
DEPTOR	DEP domain-containing mTOR-interacting protein
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
Dvl2	Disheveled 2
EC	endothelial cells, Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eEF2K	Eukaryotic elongation factor-2 kinase, eukaryotische Elongationsfaktor-2-Kinase
eIF4B	Eukaryotic translation initiation factor 4B
EPCR	Endothelial Protein C Receptor

Anhang

ERK	extracellular signal-regulated kinase
et al.	et alii
EtOH	Ethanol
etc.	et cetera
FKBP12	FK506 binding protein 12
FST	Forced Swim Test
GABA	gamma-Aminobutyric acid
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATOR1	Gap Activity TOward Rags 1
GATOR2	GAP activity towards Rags 2
GFP	green fluorescent protein
GluA1	ionotrope Glutamat-Rezeptor, AMPA 1
GluA2	ionotrope Glutamat-Rezeptor, AMPA 2
GRK5	G-Protein-gekoppelte Kinase 5
h	Stunde
HCN	hyperpolarization activated and cyclic nucleotide gated
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor alpha
HPA	hypothalamic-pituitary-adrenal axis
IEG	immediate early gene
IL-6	Interleukin 6
JAM	Junctional Adhesion Molecule, junktionales Adhäsionsmolekül
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
MAPK	Mitogen-activated protein
MDD	Major depressive disorder, klinische Depression
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mLST8	mammalian lethal with Sec13 protein 8
mPFC	medialer präfrontaler Cortex
mRNA	Messenger RNA
MSN	Medium spiny neurons
mTOR	mechanistic target of Rapamycin
mTORC1	mechanistic target of rapamycin complex 1

Anhang

mTORC2	mechanistic target of rapamycin complex 2
NAc	Nucleus accumbens
NAPc2	Nematode anticoagulant protein c2
ng	Nanogramm
NVU	Neurovascular unit, neurovaskuläre Einheit
PAR1	Protease-aktivierter Rezeptor 1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	Phosphate Buffered Saline-Tween
PCR	polymerase chain reaction
PFC	Präfrontaler Cortex
PI-3K	phosphoinositide 3-kinase
PRAS40	proline-rich Akt substrate of 40 kDa
PSD95	Postsynaptic density protein 95
PV	Parvalbumin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
Raptor	regulatory-associated protein of mTOR
Rheb	Ras homolog enriched in brain
Rictor	rapamycin-insensitive companion of mTOR
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
S1P1	Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor
S6K1	p70S6 Kinase 1
SDS	sodium dodecyl sulfate
S, sec	Sekunde
sog.	sogenannt
SPT	Sucrose Preference Test, Sucrose Präferenz Test
SREBP	sterol regulatory element-binding protein
TAFI	Thrombin-aktivierter Fibrinolyse-Inhibitor
TBC1D7	Tre2-Bub2-Cdc16 Domain Family Member 7
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Tissue factor, Gewebefaktor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TJ	Tight Junction
TM	Thrombin-Thrombomodulin
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha

Anhang

TS	Tuberose Sklerose
TSC	Tuberöse Sklerose Komplex
TST	Tail Suspension Test
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vHIP	Ventraler Hippocampus
VTA	Ventrales tegmentales Areal
vWF	Von Willebrand Faktor
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	Zona occludens

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1.1: Chemikalien

Tabelle 2.1.2: Zellkultur

Tabelle 2.1.3: weitere Enzyme

Tabelle 2.1.4.1: Zelllinien

Tabelle 2.1.4.2: Mausstämme

Tabelle 2.1.5: Bakterienkultivierung

Tabelle 2.1.6: Kits

Tabelle 2.1.7.1.1: Primer Referenzgen

Tabelle 2.1.7.1.2: Primer Kandidatengene

Tabelle 2.1.7.2.1: Primer Tsc2 Genotypisierung

Tabelle 2.1.8.1: Primäre Antikörper

Tabelle 2.1.8.2: Sekundäre Antikörper

Tabelle 2.1.9.1: PCR-Geräte

Tabelle 2.1.9.2: Gelkammern für Gelelektrophorese

Tabelle 2.1.9.3: Gel-Dokumentationssystem

Tabelle 2.1.9.4: Pipetten

Tabelle 2.1.9.5: Zentrifugen

Tabelle 2.1.9.6: Binokulare und Mikroskope

Tabelle 2.1.9.7: Geräte für die Zellkultur

Tabelle 2.1.9.8: Geräte zur DNA-, RNA- und Proteinquantifizierung

Anhang

Tabelle 2.1.9.9: Geräte für SDS-PAGE und Western Blot

Tabelle 2.1.9.10: Geräte für histologische Arbeiten

Tabelle 2.1.10.1: Computerprogramme und Onlinetools

Tabelle 2.1.10.2: Datenbanken

Tabelle 2.2.1.1: Medium zur Kultivierung neuraler Vorläuferzellen

Tabelle 2.2.1.2: Einfriermedium für HEK-T293 Zellen

Tabelle 2.2.2.1: Programm qPCR

Tabelle 2.2.2.2: Zusammensetzung Verdaupuffer

Tabelle 2.2.2.2.2: Zusammensetzung Ansatz der PCR zur Tsc2-Genotypisierung

Tabelle 2.2.2.2.3: Programm der PCR zur Genotypisierung von Tsc2

Tabelle 2.2.2.2.4: Rezept 50x TAE-Puffer

Tabelle 2.2.2.2.5: Rezept 1x TAE-Puffer

Tabelle 2.2.5.1: Rezept Lysepuffer

Tabelle 2.2.5.2.1: Rezept APS

Tabelle 2.2.5.2.2: Rezept 0,5 M Tris pH 6,8

Tabelle 2.2.5.2.3: Rezept 1,5 M Tris pH 8,8

Tabelle 2.2.5.2.4: Rezept Laufpuffer

6.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Ein vereinfachtes Schema der wichtigsten dopaminergen, glutamatergen und GABAergen Verbindungen zum und vom ventralen tegmentalen Areal (VTA) und Nucleus accumbens (NAc) im Nagetiergehirn

Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der neurovaskulären Einheit

Abbildung 1.3: Extrinsisches und intrinsisches Gerinnungssystem mit Zusammenführung bei der Umwandlung von Faktor X zu Xa

Abbildung 1.4: Die zytoprotektive Signalwirkung von EPCR-APC

Abbildung 1.5: Hypothetisches Modell der EPCR-abhängigen PAR1-Signalisierung durch APC und Thrombin in Endothelzellen

Abbildung 1.6: Schematische Darstellung eines vorgeschlagenen Mechanismus für die substratvermittelte Freisetzung des rekombinanten Fadenwurm-Antikoagulans-Protein c2 (rNAPc2) an aktivierten Faktor VII/Gewebefaktor (FVIIa/TF) und den Aufbau des quaternären Hemmkomplexes

Abbildung 2.2.1: Ablauf Qubit®-Messung

Abbildung 2.2.2: Beispielhafte Darstellung des Ergebnisses einer Gelelektrophorese einer Tsc2-Genotypisierung

Anhang

Abbildung 2.2.3: Schema des Social Interaction (SI) (2-chamber) Tests

Abbildung 2.2.4: Schema des Elevated Plus Maze Tests

Abbildung 2.2.5: Schema des 24h NORT

Abbildung 3.1.1.1:

a Ergebnis der Untersuchung der sozialen Interaktion 24 Stunden nach Beendigung des Stressparadigmas

b Ergebnis der Untersuchung der Gedächtniskonsolidierung 2-4 Tage nach Beendigung des Stressparadigmas

c Objektexplorationszeit T1

Abbildung 3.1.1.2:

a Ergebnis der Untersuchung der sozialen Interaktion 7 Tage nach Beendigung des Stressparadigmas

b Ergebnis der Untersuchung der Gedächtniskonsolidierung 8 -10 Tage nach Beendigung des Stressparadigmas

c Objektexplorationszeit T2

Abbildung 3.1.1.3.1:

a Ergebnis der Untersuchung der sozialen Interaktion 21 Tage nach Beendigung des Stressparadigmas

b Ergebnis der Untersuchung der Gedächtniskonsolidierung 22-24 Tage nach Beendigung des Stressparadigmas

c Objektexplorationszeit T3

Abbildung 3.1.1.3.2:

a Direkter Vergleich der SI Ergebnisse der gestressten Mäuse zu allen drei Zeitpunkten

b Direkter Vergleich der NORT Ergebnisse der gestressten Mäuse zu allen drei Zeitpunkten

Abbildung 3.1.1.3.3: Relative Verteilung der Resilienten und der stressAnfälligeen Tiere innerhalb der Stressgruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten T1 (a), T2 (b) und T3 (c).

Abbildung 3.1.2.1.1:

a Wiederholte Testung des Sozialverhaltens zu den Zeitpunkten T2-T4 von nicht-gestressten und gestressten Tieren

b Gruppendynamik des Sozialverhaltens in gestressten Tieren zu den drei Zeitpunkten T2 bis T4

Abbildung 3.1.2.1.2:

a Longitudinale Verlaufskurven von 5 gestressten Tieren, mit dem besten Abschneiden

b Longitudinale Verlaufskurven von 5 gestressten Tieren, mit dem schlechtesten Abschneiden

Abbildung 3.1.2.2.1: Longitudinale Entwicklung der Objektkognition nach chronisch sozialem Stress

Abbildung 3.1.2.2.2: Explorationszeit für die Zeitpunkte bei wiederholter Testung der Tiere

Abbildung 3.1.2.2.3: Longitudinale Entwicklung des Objekterkennungsverhaltens nach Stressexposition.

a Longitudinale Verlaufsbahnen von gestressten Tieren zu den Zeitpunkten T2-T4 der 5 Tiere welche zum Zeitpunkt T2 am schlechtesten abschnitten.

b Longitudinale Verlaufsbahnen von gestressten Tieren zu den Zeitpunkten T2-T4 der 5 Tiere welche zum Zeitpunkt T2 am besten abschnitten

Abbildung 3.1.3.1: Analyse der Gewichtsentwicklung von ungestressten und gestressten Mäusen während des Stressparadigmas für die spätere IEG Analyse.

a absolutes Gewicht

b relatives Gewicht

c Änderung des Gewichtes

Abbildung 3.1.3.2: Ergebnis der sozialen Interaktion der für das IEG Experiment verwendeten Mäuse

Abbildung 3.1.3.3: Ergebnisse der qPCR der IEG Analyse für

a cFos

Anhang

b Zif268
c Arc

Abbildung 3.1.4.1: Westernblotergebnisse für den ersten Zeitpunkt

a PFC
b Hippocampus N. accumbens
d VTA

Abbildung 3.1.4.2: Westernblotergebnisse für den zweiten Zeitpunkt a PFC

a PFC
b Hippocampus
c N. accumbens
d VTA

Abbildung 3.1.4.3: Westernblotergebnisse für den dritten Zeitpunkt

a PFC
b Hippocampus
c N. accumbens
d VTA

Abbildung 3.2: Test der Rapamycineffektivität in HEK293T Zellen

Abbildung 3.2.1: Ergebnis der Untersuchung der sozialen Interaktion nach Rapamycinbehandlung

Abbildung 3.2.2: Ergebnis der Untersuchung der Gedächtniskonsolidierung nach Rapamycinbehandlung

Abbildung 3.2.3: Ergebnis der Untersuchung des Nestbauverhaltens nach Rapamycinbehandlung

a Bewertungsskala
b Nestlet Gewichtsverlust

Abbildung 3.2.4: Ergebnisse des Western Blot nach Rapamycinbehandlung

a Präfrontaler Cortex
b Hippocampus
c Nucleus accumbens

Abbildung 3.2.5: Ergebnis der Untersuchung der Gewichtsentwicklung bei ungestressten und gestressten Tsc2 Mäusen über den Zeitraum des Stressparadigmas

Abbildung 3.2.6.1: Ergebnis der Untersuchung der sozialen Interaktion bei ungestressten und gestressten Tsc2 Mäusen.

Abbildung 3.2.6.2: Ergebnis des Social Novelty Tests.

a Kontaktfreudigkeit
b unbekannte Maus

Abbildung 3.2.7.1: Ergebnis der Untersuchung des Angstverhaltens bei ungestressten und gestressten Tsc2 Mäusen mittels EPM.

Abbildung 3.2.7.2:

a Ergebnis der Untersuchung des Angstverhaltens im Open Field Tests bei ungestressten und gestressten Tsc2 Mäusen
b Ergebnis der Untersuchung der zurückgelegten Strecke im Open Field Tests bei ungestressten und gestressten Tsc2 Mäusen

Abbildung 3.2.8.1: Ergebnis der Untersuchung der spatialen Gedächtniskonsolidierung bei ungestressten und gestressten Tsc2 Mäusen

Abbildung 3.2.9.1: Ergebnis der Untersuchung des Groomingverhaltens bei ungestressten und gestressten Tsc2 Mäusen

Anhang

Abbildung 3.2.10.1: Ergebnis der Untersuchung der Zuckerpräferenz bei ungestressten und gestressten Tsc2 Mäusen

Abbildung 3.2.10.2

a Ergebnis der Untersuchung der Inaktivität beim Tail Suspension Test bei ungestressten und gestressten Tsc2 Mäusen

b Ergebnis der Untersuchung der Latenz beim Tail Suspension Test bei ungestressten und gestressten Tsc2 Mäusen

Abbildung 3.3.1.1:

a Ergebnis der Untersuchung der sozialen Interaktion von Tieren mit EPCR Defizienz

b Ergebnis der Untersuchung der sozialen Interaktion von Tieren mit veränderter EPCR Lokalisation

Abbildung 3.3.1.2: Relative Verteilung der Resilienten und der stressAnfälligen Tiere innerhalb der Stressgruppe

Abbildung 3.3.2.1: a Ergebnis der Untersuchung der sozialen Interaktion bei ungestressten und gestressten von Tieren mit EPCR Defizienz.

Abbildung 3.3.3.1 :

a Ergebnis der Untersuchung der kognitiven Leistung bei ungestressten und gestressten von Tieren mit EPCR Defizienz.

b Ergebnis der Untersuchung der kognitiven Leistung bei ungestressten und gestressten von Tieren mit veränderter EPCR Lokalisation

Abbildung 3.3.4.1.1:

a Ergebnis der Untersuchung des Nestbauverhaltens bei ungestressten und gestressten von Tieren mit EPCR Defizienz

b Ergebnis der Untersuchung des Nestbauverhaltens bei ungestressten und gestressten von Tieren mit veränderter EPCR Lokalisation

Abbildung 3.3.4.1.2:

a Ergebnis der Untersuchung des Nestbauverhaltens bei ungestressten und gestressten von Tieren mit EPCR Lokalisation

b Ergebnis der Untersuchung des Nestbauverhaltens bei ungestressten und gestressten von Tieren mit EPCR Lokalisation

Abbildung 3.3.5: Ergebnis der Untersuchung der sozialen Interaktion bei ungestressten und gestressten von Tieren mit veränderter EPCR Lokalisation

a Balkendiagramm mit SEM

b Tortendiagramm der Anteile an Resilienten und Anfälligen bei den mit Vehikel (links) und den mit dem Inhibitor behandelten gestressten Tieren

Abbildung 6.1.1: a Korrelationsanalyse der Verhaltensdomänen Sozialverhalten und Gedächtnisleistung zum Zeitpunkt T1, b Korrelationsanalyse der Verhaltensdomänen Sozialverhalten und Gedächtnisleistung zum Zeitpunkt T3

6.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Marlon Wendelmuth, die vorgelegte Dissertation mit dem Titel: „Erforschung von Stressresilienz: Longitudinale Verhaltensstudien und molekulare Analyse des mTOR-Signalwegs mit Interventionsstrategien nach chronisch-sozialem Stress bei Mäusen“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen der Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken entnommen wurden, sind in jedem Fall unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Diese Arbeit ist noch nicht in gleicher oder ähnlicher Form veröffentlicht oder einer Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Mainz, den

Marlon Wendelmuth

6.6 Danksagung