

Auswirkungen von chronischem sozialem Stress als Depressionsmodell auf die strukturelle Plastizität im Motorkortex der Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Aileen Sitter

aus Bochum

2023

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Valentin Stein
2. Gutachter: PD. Dr. Christian Hoppe

Tag der Mündlichen Prüfung: 31.01.2023

Aus dem Institut für Physiologie II
Direktor: Prof. Dr. Valentin Stein

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Chronischer sozialer Stress – Definition und Auswirkung	8
1.2 Die Entwicklung des Stressmodells	9
1.3 Resilienz – Protektoren im Stressumgang	10
1.4 Der Einfluss von Stress auf die Psychomotorik	10
1.4.1 Stressassoziierte Mikrogliaveränderungen	12
1.4.2 Stressassoziierte Astrozytenveränderungen	13
1.5 Neurobiologie des motorischen Lernens	13
1.5.1 Neuroplastizität	14
1.5.1.1 Spines als Grundlage der synaptischen Signalübertragung	14
1.5.1.2 Einfluss der Mikroglia auf die Neuroplastizität	15
1.5.1.3 Einfluss der Astrozyten auf die Neuroplastizität	17
1.6 Fragestellung und Zielsetzung	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Versuchstiere	20
2.2 Darstellung und Analyse der strukturellen Plastizität mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie	21
2.2.1 Implantation eines kranialen Knochenfensters	21
2.2.2 Durchführung	22
2.2.3 Auswertung	24
2.3 Bestimmung des Stressphänotyps	24
2.3.1 Stressmodell	25
2.3.2.1 Sacharose-Präferenz Test	26
2.3.2.2 Nestbau	26
2.3.2.3 Soziale Vermeidung	27
2.4 Motorische Lerntests	28
2.4.1 Feinmotorik: Skilled-Forelimb-Reaching-Test	28
2.4.2 Grobmotorik: Accelerated-Rotarod-Test	29
2.5 Immunhistochemie	32
2.5.1 Allgemeines Prinzip	32

2.5.2	Verwendete Antikörper	32
2.5.3	Gewebe Gewinnung und Aufarbeitung	33
2.5.4	Darstellung der Mikroglia und Astrozyten im Motorkortex	34
2.5.5	Auswertung der immunhistochemischen Bilder	34
2.5.5.1	Analyse der Astrozyten	35
2.5.5.2	Analyse Kolokalisation Dendriten mit Mikroglia	35
2.5.5.3	MotiQ Analyse	36
2.6	Statistische Auswertung	36
3.	Ergebnisse	37
3.1	Verhaltensversuche	37
3.2	Motorisches Lernen	38
3.2.1	Grobmotorik: Rotarod	38
3.2.2	Feinmotorik: Reaching	38
3.3	Veränderung der strukturellen Plastizität	38
3.3.1	Spineanalyse	39
3.3.1.1	Veränderung der Spinedichte	39
3.3.1.2	Spineverlust versus Neubildung direkt nach Stressexposition	43
3.3.1.3	Spineverlust versus Spineneubildung im weiteren Verlauf	45
3.3.1.4	Stabilität ursprünglicher Spines	48
3.3.1.5	Stabilität neugebildeter Spines nach den motorischen Lerneinheiten	49
3.3.1.6	Zusammenfassung Spineanalyse	50
3.4	Immunhistochemie	51
3.4.1	Mikroglia MotiQ-Auswertung	51
3.4.1.1	Ausdehnung im Kortex	52
3.4.1.2	Umspannte Kortexfläche	53
3.4.1.3	Zellmorphologie - Analyse der Ramifikation	54
3.4.1.4	Zellmorphologie - Analyse Zellausläufer	55
3.4.2	Kolokalisation Mikroglia mit Dendriten	56
3.4.3	Zusammenfassung Mikroglia	57
3.4.4	Astrozyten	58
3.4.4.1	Quantitative Analyse	58
3.4.4.2	Qualitative Analyse	60

3.4.4.3 Zusammenfassung Astrozyten	63
4. Diskussion	64
4.1 Veränderung der strukturellen Neuroplastizität unter Stress	64
4.2 Stressinduzierte Veränderungen der Mikroglia	65
4.3 Stressinduzierte Form- und Funktionsänderung der Astrozyten	67
4.4 Schlussfolgerung	68
4.5 Einschränkungen der Interpretierbarkeit	69
4.6 Ausblick	71
5. Zusammenfassung	72
6. Abbildungsverzeichnis	74
7. Literaturverzeichnis	76
8. Danksagung	88

Abkürzungsverzeichnis

Abb.: Abbildung

ANOVA (Analysis of variance): Varianzanalyse

Aqua dest.: destilliertes Wasser

ATP: Adenosintriphosphat B6 Maus: C57BL/6 Maus

BDNF (brain-derived neurotrophic factor): neurotropher Wachstumsfaktor

BSA: Bovines Serumalbumin

CD-1 Maus: CD-1 IGS Auszuchtmäuse

CD 200 (Cluster of Differentiation 200): Membranes Glykoprotein 200

CRH: Cortikotropin-Releasing-Hormon

CSDS (chronic social defeat stress): angewandtes Paradigma zur Induktion chronisch sozialen Stresserlebens im Tiermodell

CSF1 (Macrophage colony-stimulating factor): Monozytenkolonien-stimulierender Faktor

D-Serine: Serin, dass in der D-Konfiguration vorliegt

eGFP (enhanced green fluorescent protein): grün fluoreszierendes Protein

F: Teststatistik einer Varianzanalyse

Fiji: Fiji Is Just ImageJ

GABA (*gamma*-Aminobutyric acid): γ -Aminobuttersäure

HPA-Achse (hypothalamic-pituitary-adrenal axis): Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

Iba-1: (ionized calcium binding adapter molecule)

IFN- γ : Interferon gamma

IL-1: Interleukin 1

IL-6: Interleukin 6

i. p.: intraperitoneal

KG: Kilogramm Körpergewicht

Kon.: Kontrolle(en)

Layer I: Lamina I Stratum molekulare

Layer II: Lamina II Stratum granulosum externum (äußere Körnerschicht)

Layer III: Lamina III Stratum pyramidale externum (äußere Pyramidenschicht)

Layer IV: Lamina IV Stratum granulosum internum (innere Körnerschicht)

Layer V: Lamina V Stratum pyramidale internum (innere Pyramidenzellschicht)

M1: primär-motorische Rinde

MAP (mitogen-activated protein)-Kinase: mehrstufige Signaltransduktionswege

NF κ B (nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells): spezifischer Transkriptionsfaktor

PBS (Phosphate buffered saline): Pufferlösung

res.: resilient

PFA: Paraformaldehydlösung

ROI (Region of interest): Region von Interesse

rpm (Revolutions per minute): Umdrehungen pro Minute

s. c.: subkutan

SEM (standard error of the mean): Standardfehler

sus.: suszeptibel

Thy1 (Thymocyte differentiation antigen 1): Thymozyten Antigen 1

Thy-1 Maus: Tg (Thy1-EGFP) MJrs/J Maus

TNF- α : Tumornekrosefaktor alpha

TGF- β (Transforming growth factor beta): Transformierender Wachstumsfaktor

v.: versus

ZNS: Zentrales Nervensystem

2PM: Zwei-Photonen-Mikroskop(ie)

1. Einleitung

1.1 Chronischer sozialer Stress – Definition und Auswirkung

Stress beschreibt zunächst eine gesunde Anpassungsreaktion des Organismus auf äußere Anforderungen. Gelingt diese lebensnotwendige physiologische Reaktion nicht bzw. wird die Kompensationsfähigkeit des Körpers durch eine anhaltende Belastung erschöpft, entsteht chronischer Stress. Als zweithäufigste nicht tödliche Krankheitsursache mit weltweit geschätzt 300 Millionen Betroffenen wird chronischer sozialer Stress von der WHO als eine der Gesundheitsgefahren des 21. Jahrhunderts gewertet (Fink, 2016). Neben dem Herzkreislaufsystem ist insbesondere das psychische Wohlbefinden gefährdet. Etwa 29 Prozent der Erwachsenen weltweit erkranken mindestens einmal im Leben an einer psychiatrischen Erkrankung (Steel et al., 2014). Mit geschätzt 600 Millionen Betroffenen weisen Depressionen und Angsterkrankungen die höchste Prävalenz auf (WHO, 2017), zu deren Entwicklung chronischer Stress maßgeblich beiträgt (Phillips et al., 2015). Soziale Stressoren bzw. Lebensereignisse, die mit einer hohen Stressbelastung einhergehen, finden sich 2,5 mal häufiger in Patienten mit einer depressiven Grunderkrankung (Hammen, 2005). Die hohe gesellschaftliche Relevanz zeigt sich in einer Verdopplung der Krankheitstage aufgrund psychischer Erkrankungen zwischen 2007 und 2017 auf 107 Millionen und ist mit 46,4 Milliarden Euro (Rusch, 2019) der zweithöchsten Kostenverursachen im deutschen Gesundheitssystem (Rusch, 2019). Bereits für das Jahr 2015 betragen die direkten Krankheitskosten 44,4 Milliarden Euro und lagen damit nur knapp hinter den direkten Krankheitskosten der Herzkreislaufkrankungen mit 46,4 Milliarden Euro (Statistisches Bundesamt, 2017).

Auch in Tieren führt chronischer Stress durch physische und psychische, meist soziale, Stressoren zu vielen Verhaltensänderungen, wie einer reduzierten Freudfähigkeit, Verminderung der lokomotorischen Aktivität und des sexuellen Verhaltens, Gewichtsverlust sowie Schlafstörungen, die den Symptomen einer menschlichen Depression ähneln (Sendtner, 2008). Insbesondere im chronischen Stressmodell für die Maus sind in Analogie zum Menschen anhaltende „depressive“ Verhaltensänderungen vielfach beschrieben (Gellner et al., 2021; Golden et al., 2011; Sendtner 2008; Sterlemann et al., 2008).

1.2 Die Entwicklung des Stressmodells

Hans Selye, der maßgeblich den Stressbegriff prägte und zu den Pionieren der humanen Stressforschung gehört, definierte Stress als eine unspezifische, stereotype Reaktion des Organismus auf jede Anforderung die zum „Allgemeinen Adaptationssyndrom“ führt und als Anpassung des Organismus auf die Stresssituation gesehen wird (Selye, 1950). Nach der Alarmreaktion und Mobilisierung der Abwehrmechanismen, folgt die Widerstandsphase mit Erreichen des Höhepunkts der Adaptionfähigkeit, die dann, bei nicht ausreichender Stressbewältigung, in das Erschöpfungsstadium übergeht. Bereits Selye beschrieb die Sympathikusaktivierung mit Hochregulierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) mit Cortisolausschüttung und immuninflammatorischer Reaktion als maßgebliche Komponente und assoziierte die Erschöpfungsphase durch Immunschwächung mit vorzeitigen Alterungsprozessen sowie Depressionen und Angsterkrankungen (Selye, 1950, 1955). In Anlehnung an dieses Modell geht das aktuelle biopsychologische Allostase-Modell nach Sterling ebenfalls von einer physiologischen Anpassungsreaktion des Organismus auf veränderte Lebens- und Umweltbedingungen aus, deren zentrale Steuerung über z. B. das Gehirn (unter anderem durch HPA-Achsenaktivierung) erfolgt (Sterling, 2012). Bei chronischer oder wiederholter Stressexposition entsteht eine allostatische Last mit einem dann hohen Krankheitsrisiko für kardiovaskuläre, muskulo-skelettale, immunologische und psychische Erkrankungen (Chrousos, 2009; Dimsdale und Jolla, 2008; McEwen und Stellar, 1993). Chronischer sozialer Stress gilt als stärkster Trigger für das Entstehen einer allostatischen Last (McEwen und Wingfield, 2003; Sapolsky, 2005; Sterling, 2012). Übersteigen soziale Anforderungen die individuellen Bewältigungsstrategien, führt dies zu vielfältigen pathologischen, kognitiven, affektiven und neuroendokrinen Reaktionen (Brown und Prudo, 1981; Kessler, 1997; Post, 1992). In Anlehnung an das beschriebene humane Stressadaptionssystem zeigen sich als Reaktion auf psychosozialen Stress im Mausmodell vergleichbare Adaptionmechanismen mit unter anderem dauerhafter Aktivierung des sympathischen Nervensystems, Gewichtszunahme der Nebennieren, Hyperaktivität der HPA-Achse, erhöhter Kortisolkonzentration und zahlreichen Veränderungen der Neurotransmittersysteme (Berger et al., 2019; Krishnan et al., 2007; Pérez-Tejada et al., 2013; Zhu et al., 2014).

1.3 Resilienz – Protektoren im Stressumgang

Trotz der hohen Prävalenz stress-assoziiierter Erkrankungen bilden sich bei einem Großteil der Betroffenen unter hoher Stressexposition wie Traumata, schweren körperlichen Erkrankungen oder anderweitigen Lebenskrisen keine anhaltenden psychischen Schäden aus (Atwoli et al., 2015), was für eine insgesamt hohe psychische Resilienz in der Allgemeinbevölkerung spricht. Resilienz, d. h. die Fähigkeit auch unter hoher psychischer Belastung einen weitgehenden Gesundheitszustand aufrechtzuerhalten bzw. zeitnah wiederherzustellen, ist insbesondere durch die Möglichkeit der Krankheitsprävention ein hoch relevantes Thema und hat durch einen großen Wissenszuwachs diverse konzeptuelle Änderungen erfahren (Kunzler et al., 2018). Das aktuelle Konzept der Resilienz geht von einem über die Lebenszeit dynamischen und veränderbaren Anpassungsprozess auf Stressoren aus, der durch eine Vielzahl von neurobiologischen, psychologischen und Umweltfaktoren bedingt wird (Kalisch et al., 2017). Aufgrund der häufigen Überlappung psychischer Symptome sowie hohem Assoziations- und Interaktionsgrad einzelner Resilienzfaktoren wird gefordert stressinduzierte Beeinträchtigungen als eigenständige Krankheitsdomänen aufzufassen und die ihnen zugrunde liegenden Pathomechanismen zu verstehen (Kalisch et al., 2017). Im Mausmodell konnten hier bereits sowohl auf der Verhaltensebene, als auch hormonell, Biomarker identifiziert werden, die in einem Teil der Tiere zu einer veränderten Stressreaktion führen und als Merkmale für Resilienz verstanden werden (Magalhães et al., 2020).

1.4 Der Einfluss von Stress auf die Psychomotorik

Die Psychomotorik bezeichnet die Gesamtheit des durch psychische Vorgänge beeinflussten willentlichen und automatisierten körperlichen Bewegungs- und Ausdrucksverhaltens (Margraf und Bengel, 2021) und impliziert eine Kausalverknüpfung zwischen Stimmung und Bewegungsablauf. Dieser gehört neben der Wahrnehmung zu den zentralen menschlichen Leistungen und wird wechselseitig beeinflusst von konstitutionellen, neurobiologischen, physiologischen, psychologischen und konditionellen Fähigkeiten (Geraedts, 2020a). Durch die Komplexität dieser Feinabstimmung zwischen Gehirn, Rückenmark, peripheren Nerven und Muskeln, welche eine zielgerichtete Bewegung ermöglicht, gilt der menschliche Gang und Stand als

„Wunder der Regulation“ (Birbaumer und Schmidt, 2010). Es wird unterschieden zwischen Stütz- (Haltung und Stellung des Körpers im Raum) und Zielmotorik (gerichtete Bewegung), wobei erlernte Willkürmotorik nicht ohne die automatisiertere, instinktive Stützmotorik auskommt (Birbaumer und Schmidt, 2010). Diese wird vorwiegend über motorische Reflexbahnen des Rückenmarks und Hirnstamms gesteuert. Zielmotorik hingegen wird in supraspinalen Zentren initiiert und moduliert. Hierzu zählen subkortikale und kortikale Motivationsareale sowie der Assoziationskortex für Bewegungsantrieb und Entwurf. Dieser erfährt eine weitere Modifizierung durch Basalganglien und Kleinhirn, die über den Thalamus als weitere Kontroll- und Regulationsinstanz zum primär-motorischen Kortex projizieren. Hier wird der zuvor vielfältig angepasste und überprüfte Bewegungsplan zusammen mit den motorischen Zentren von Hirnstamm und Rückenmark in die Handlung umgesetzt (Birbaumer und Schmidt, 2010). Im Rahmen einer Depression können Defizite der Grob- und Feinmotorik sowie des Gleichgewichts und der Koordination (Bennabi et al., 2013; Bolmont et al., 2002; Mergl et al., 2007; Sabbe et al., 1996) auftreten. Auch konnten bereits durch cMRT-Studien Veränderungen im motorischen Kortex im Sinne einer Volumenreduktion in depressiven Patientenkohorten nachgewiesen werden (Schmaal et al., 2017). Metz et al. (2005) konnten zeigen, dass sowohl akuter als auch chronischer und durch Applikation von Glucocorticoiden hormonell induzierter Stress zu deutlichen Defiziten in der grob- und feinmotorischen Leistungs- und Lernfähigkeit in Ratten führt. Auch die Mäuse von Shu und Xu (2017) zeigten nach Phasen von chronischem sozialem Stress keine Lernerfolge im feinmotorischen Training. Psychomotorische Verlangsamung und Antriebsarmut als Kernsymptome einer depressiven Episode gehen durch die eingeschränkte bis aufgehobene Alltagsfunktionalität sowie private und berufliche Partizipationsfähigkeit mit einer hohen individuellen Belastung und sozialer Stigmatisierung einher und erhöhen das Risiko für somatische Komorbiditäten wie kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs (Smit et al., 2016). Trotz der hohen gesellschaftlichen Relevanz und dem gesteigerten wissenschaftlichen Interesse lag der Forschungsschwerpunkt in den letzten Jahren überwiegend auf Hirnregionen wie dem Hippocampus, der Amygdala und dem präfrontalen Kortex, in denen weitreichende strukturelle, elektrophysiologische und inflammatorische Veränderungen unter chronischem sozialem Stress festgestellt wurden

(Buwalda et al., 2005; Radley et al., 2006; Vyas et al., 2002), die jedoch nicht die motorischen Veränderungen hinreichend begründen konnten.

1.4.1 Stressassoziierte Mikrogliaveränderungen

Die Frage, welchen pathophysiologischen Beitrag Mikroglia bei psychischen Erkrankungen leisten, war in den letzten Jahren Gegenstand diverser Forschungsansätze. Durch ihre wichtige proinflammatorische Funktion im Gehirn sowie die deutlichen morphologischen Änderungen (Hinwood et al., 2013; Walker et al., 2013) die mit typisch depressiven Verhaltensmerkmalen korrelieren (Walker et al., 2013; Yirmiya et al., 2015), entstand die These der Depression als neuroimmunologische Erkrankung. Mehrfach konnte bereits eine Hochregulation von Iba-1 markierter Mikroglia in Stressmodellen gezeigt (Hinwood et al., 2012; Kopp et al., 2013; Tynan et al., 2010) und mit der Ausbildung eines depressiven Phänotyps korreliert werden (Tynan et al., 2010). Auch die Umkehrung gelang durch Hellwig et al. (2016). Unter Ausschaltung des Fractalkin- Weges zeigten Mäuse unter Stresseinwirkung bei fehlender neuroinflammatorischer Reaktion keine stress- bzw. depressionstypischen Verhaltensmerkmale (Hellwig et al., 2016). Auch Mikrogliahemmung unter Minozyklin konnte die Ausbildung eines Stressphänotypen in Ratten verhindern (Hinwood et al., 2013), was die Bedeutung der Mikroglia in der Vermittlung von stress-responsivem Verhalten noch unterstrich. Das neuronale membranständige Glykoprotein CD200 spielt eine entscheidende Rolle dabei, den Zusammenhang zwischen stressinduzierten mikroglialen Veränderungen und Auswirkungen auf die synaptische Plastizität aufzuzeigen. Seine Reduktion führt ebenfalls über eine mikrogliale Aktivierung zu einer Beeinträchtigung der neuronalen Plastizität, was als Mechanismus insbesondere bei chronischer Depression gezeigt werden konnte (Downer et al., 2010, Lyons et al., 2007). CD200-Knockout-Mäuse zeigten zudem Einschränkungen in der Langzeitpotenzierung (Costello et al., 2011). Als möglicher Mechanismus konnte nachgewiesen werden, dass die Produktion von mikroglialem $TNF\alpha$ zu einer Hemmung der Theta-burst-Stimulation führt und so negativ Einfluss auf die Langzeitpotenzierung nimmt (Battista et al., 2006; Butler et al., 2004; Ekdahl et al., 2003).

1.4.2 Stressassoziierte Astrozytenveränderungen

Diverse Studien konnten sowohl im Tiermodell als auch in Post-mortem-Analysen im Hirngewebe von depressiven Patienten einen Verlust von Astrozyten im präfrontalen Kortex, Kleinhirn und im Hippocampus zeigen (Bernard et al., 2011; Cobb et al., 2013; Cotter et al., 2001; Öngür et al., 1998; Torres-Platas et al., 2016). Im Fokus der letzten Jahre stand jedoch die Frage, durch welche Mechanismen Astrozyten direkt typische depressive Verhaltensmerkmale vermitteln können. Im Mausmodell konnte über die Verringerung der Astrozyten im präfrontalen Kortex depressionstypisches Verhalten wie erhöhte Ängstlichkeit, Anhedonie und Hilflosigkeit beobachtet werden (Banasr und Duman, 2008; Lima et al., 2014). Ein ähnlicher Effekt konnte durch Blockung der Freisetzung von glialem ATP erreicht werden (Cao et al., 2013). Die depressiven Verhaltensmerkmale scheinen jedoch nicht mit einer quantitativen Abnahme der Astrozyten in Zusammenhang zu stehen, sondern mit einer Zellatrophie und geringerer Ausbildung von GFAP, niedrigerem Zellvolumen sowie kürzeren und weniger verzweigten Ausläufern (Tynan et al., 2013). Ein ähnlicher Effekt konnte durch Blockung der Freisetzung von glialem ATP erreicht werden (Cao et al., 2013).

1.5 Neurobiologie des motorischen Lernens

Das Neuerlernen einer motorischen Tätigkeit benötigt einen hohen Grad an Konzentration und Zeit. Die ersten Durchführungen einer neu erlernten Bewegung sind in der Regel verlangsamt und in Koordination und Ablauf noch fehlerhaft, sodass während des Erlernens permanent Korrekturen vorgenommen werden. Durch Wiederholung verbessert sich der Bewegungsablauf, wird präziser, flüssiger und schneller. Durch die zunehmende Automatisierung einer Bewegung wird im Lernprozess mit zunehmender Sicherheit weniger Konzentration für die korrekte Ausführung benötigt (Geraedts, 2020b). Grundlage hierfür ist die funktionelle Plastizität des Gehirns, also die Fähigkeit, sich auf äußere Reize durch Neu- bzw. Umstrukturierung kontinuierlich anzupassen. Sie wird als Überbegriff für diverse physiologische Veränderungsmechanismen im Gehirn gebraucht. Hierzu zählt die synaptische Neuroplastizität, die sich auf die Stärkung bzw. Schwächung synaptischer Verbindungen zwischen Neuronen bezieht. Bereits 1949 formulierte der Psychologe Donald Olding Hebb die nach ihm benannte „hebb'sche Lernregel“: Synapsen, die gleichzeitig feuern, bilden durch Langzeitpotenzierung stabile Schaltkreise (Hebb D.,

1949). Ebenso können durch Langzeitdepression, d.h. durch Reduzierung der synaptischen Übertragung, neuronale Netzwerke ab- bzw. umgebaut werden. Eine weitere wichtige Schlüsselfunktion ist die Synaptogenese. Neurone können durch Ausstülpungen kleiner dendritischer Dornen (englisch „Spines“) neue Synapsen ausbilden. Synaptische Plastizität und Synaptogenese bilden die Grundlage für Lern- und Gedächtnisprozesse (Bailey et al., 2015; Costandi, 2015). In Mäusen konnte gezeigt werden, dass Neuroplastizität die Grundlage für erfolgreiches motorisches Lernen darstellt (Xu et al., 2009).

1.5.1 Neuroplastizität

1.5.1.1 Spines als Grundlage der synaptischen Signalübertragung

Unter Spines versteht man kleine Vorwölbungen der Postsynapse, auf die durch die präsynaptische Axonterminale Erregung übertragen werden kann. Ein Großteil dieser Erregung ist exzitatorisch. Es können jedoch auch exzitatorische und inhibitorische synaptische Kontaktstellen auf demselben Spine vorkommen. Über 90 Prozent aller vorkommenden exzitatorischen Synapsen im Zentralnervensystem befinden sich auf dendritischen Spines (Harris und Kater, 1994; Qiao et al., 2016). Sie stellen das wichtigste Element in der Informationsweitergabe und -verarbeitung im Zentralnervensystem dar. Dendritische Spines sind hochdynamische Strukturen und tragen durch Änderung ihrer Anzahl und Morphologie wesentlich zur neuronalen Plastizität bei. Hierdurch bilden sie die Grundlage für Lern- und Gedächtnisvorgänge (Bailey et al., 2015). Entsprechend ihrer Morphologie werden Spines in verschiedene Gruppen eingeteilt. Kleinere schmalere und plastischere Spines werden in Lernvorgängen temporär neu gebildet, wohingegen reifere, weniger dynamische pilzförmige Spines stabilere Synapsen bilden und zur Lern- und Gedächtniskonsolidierung dienen (Bourne und Harris, 2008). Bildung, Wachstum, Formationsänderung und Elimination dendritischer Spines ergeben ein hochdynamisches und feinreguliertes System, das innerhalb kurzer Zeit auf Reize reagiert. Xu et al. (2009) konnten erstmalig in vivo im Mausmodell zeigen, dass erfolgreiches motorisches Lernen ein hohes Maß an Neuroplastizität erfordert und mit einer komplexen synaptischen Reorganisation im kontralateralen Motorkortex einhergeht. Pathologische Veränderungen können zu schwerwiegenden kognitiven Funktionseinschränkungen führen und sind mit diversen psychiatrischen Krankheitsbildern assoziiert (Penzes et al., 2011). Beispielhaft

zu nennen sind das Rett-Syndrom, die Schizophrenie oder Autismus-Spektrum-Störungen (Fénelon et al., 2013; Fortin et al., 2012). Vielfach konnte bereits gezeigt werden, dass eine Depression zu deutlichen Änderungen der Spinedichte und -formation in den für Kognition und Verhalten relevanten Hirnregionen wie dem Präfrontalen Kortex, der Amygdala, dem Nucleus accumbens und dem Hippocampus führt (Duman und Duman, 2014; Marsden, 2013; Sousa et al., 2000). Nach aktuellem wissenschaftlichem Stand scheint es keinen allgemeinen Effekt von Stress auf die Spinedynamik zu geben. Vielmehr scheint jede Hirnregion individuell entweder mit einer Dichteabnahme (Hippocampus und Präfrontaler Kortex) oder einer Dichtezunahme (Amygdala und Nucleus accumbens) zu reagieren (Penzes et al., 2011; Shu und Xu, 2017).

1.5.1.2 Einfluss der Mikroglia auf die Neuroplastizität

Neben der geschilderten reinen Synaptogenese durch das hochmobile System der Dornfortsätze nehmen Mikroglia als ein weiteres wesentliches Element entscheidenden Einfluss auf die Neuroplastizität. Sie interagieren nicht nur mit den neuronalen Synapsen (Nimmerjahn et al., 2005; Wake et al., 2009) sondern sind aktiv an Auf-, Ab-, und Umbauprozessen der Synapsen durch Modifikation der Spines beteiligt (Miyamoto et al., 2016; Tremblay et al., 2010a) und nehmen so nachhaltig Einfluss auf die synaptische Architektur und Funktion (Davalos et al., 2005). Mikroglia übernehmen als Bindeglied zwischen ZNS und Immunsystem eine Vielzahl an Funktionen. Im gesunden ZNS zeigen Mikrogliazellen eine spezifische Form mit einem kleinen runden Zellkern von dem zahlreiche, teilweise weit verzweigte Ausläufer ausgehen (Davalos et al., 2005). Sie bilden ein hochspezialisiertes Netzwerk mit ausgeprägtem territorialem Verhalten (Iida et al., 2019). Obwohl Mikroglia nur unter 10 Prozent aller Zellen des Zentralnervensystem ausmachen (Lawson et al., 1990), stehen sie mittels vielfältiger Botenstoffsysteme und direktem Zell-Zell-Kontakt im permanenten Austausch mit dem sie umgebenden ZNS (Hanisch und Kettenmann, 2007). Hierdurch können sie innerhalb kürzester Zeit auf kleinste Gewebeveränderungen durch Schädigung oder Störung reagieren und durch Produktion von freien Radikalen und inflammatorischen Zytokinen weitere neuroinflammatorische Prozesse induzieren (Mildner et al., 2011; Prinz et al., 2011). Einen hierfür wichtigen Kommunikationsweg stellen Chemokine dar (Cardona et al., 2006; Hanisch und Kettenmann, 2007; Lyons et al., 2007). Ein wichtiger Vertreter ist

Fractalkin (CX3CL1). Es wird von gesunden Neuronen produziert und führt durch seinen Rezeptor (8CX3CR), der nur auf Mikrogliazellen des Gehirns zu finden ist, zu einer Hemmung der Zelle (Harrison et al., 1998). Bei einer neuronalen Störung wird weniger Fractalkin sezerniert, was eine mikrogliale Aktivierung bedingt. Während der Hirnentwicklung tragen Mikroglia durch den Abbau weniger genutzter, redundanter oder nicht mehr funktionaler Synapsen maßgeblich zur Feinabstimmung bei. Diese Form der Synapseneliminierung, Pruning genannt, unterstützt die Stabilisierung der Signalweitergabe über die verbliebenen Synapsen. Dieser Effekt wird unter anderem über den Liganden C3 vermittelt, der von unreifen bzw. nichtfunktionalen Synapsen produziert wird und mittels Rezeptorbindung die Mikroglia aktiviert (Schafer und Stevens, 2010). Neben dem gut untersuchten Hippocampus konnte dies in diversen weiteren Hirnregionen (Thalamus, Kleinhirn und Bulbus olfactorius) nachgewiesen werden (Dalmau et al., 1998; Fiske und Brunjes, 2000; Perry et al., 1985). Auch im adulten Gehirn spielt die Mikroglia eine maßgebliche Rolle in der Modulation der neuronalen Plastizität. Mikroglia sind auch im ruhenden Zustand aktiv (Nimmerjahn et al., 2005). Sie tasten mit ihren zahlreichen Verästelungen kontinuierlich in einer bestimmten Frequenz die Synapsen ab. Hierbei ist die Frequenz umso höher je stimulierter und somit aktiver eine Synapse ist (Wake et al., 2009, Tremblay et al., 2010a). Daher wurde geschlossen, dass Mikroglia eine Art Überwachungsfunktion während synaptischer Aktivität übernehmen, um bei Störungen durch Beteiligung an synaptischen Auf-, Umbau oder Abbauprozessen schnell reagieren zu können. Mittels Endo- und Exozytose leisten Mikroglia einen wichtigen Beitrag zur Beseitigung von neuronalen Abfallstoffen sowie Zellresten und tragen dadurch zum Erhalt der Homöostase im ZNS bei (Tremblay et al., 2010a). In Versuchen, die einen Abbau von neuronalen Synapsen induzieren, konnte synaptisches Material in Mikroglia nachgewiesen werden, was als Hinweis für Phagozytoseprozesse gewertet wurde (Miyamoto et al., 2013; Paolicelli et al., 2011; Schafer et al., 2013; Tremblay et al., 2010b). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Einschränkungen in dieser Funktion zu einer Störung der synaptischen Konnektivität und generellen Funktionalität führen, bedingt durch einen Anstieg immaturer excitatorischer Synapsen (Paolicelli et al., 2011). Ein weiterer Weg der Einflussnahme auf die synaptische Konnektivität bzw. Informationsweitergabe erfolgt über die Regulation der Neurotransmitterkonzentration im synaptischen Spalt (Pocock und Kettenmann, 2007). Zusätzlich besteht eine direkte

Einflussnahme auf die neuronale Plastizität durch mikrogliale Botenstoffe. Parkhurst et al. (2013) konnten durch Eliminierung des mikroglialen Wachstumsfaktors BDNF Effekte auf die Spinedynamik und das motorische Lernen zeigen. Neben diesen direkten Modulationsmöglichkeiten der synaptischen Plastizität bestehen noch eine Reihe indirekter Signaltransduktionswege, z.B. über mikrogliales $\text{TNF}\alpha$. Durch Aktivierung von MAP-Kinase und NF- κ B-Signalwege kann über die Erhöhung von Chemokinliganden (CCL2) die Kurzzeitpotenzierung (Nelson et al., 2011) im Hippocampus gesteigert werden. Zusätzlich werden über vermehrte Ausschüttung von ATP Astrozyten angezogen, die dann ihrerseits über ATP und Glutamatfreisetzung Einfluss auf die neuronale Exzitation nehmen (Pascual et al., 2012).

1.5.1.3 Einfluss der Astrozyten auf die Neuroplastizität

Neben der Mikroglia sind Astrozyten die zweite wichtige Zellgruppe, die – wie bereits erwähnt – unter anderem durch mikrogliale Koaktivierung entscheidenden Einfluss auf die neuronale Plastizität nimmt. Astrozyten stellen eine sehr heterogene Gruppe von Zellen des ZNS dar. Durch ihren Erstbeschreiber Rudolph Virchow (1856) wurde ihnen lange eine untergeordnete Rolle als inaktive Helferzellen der Neuronen zugewiesen, die lediglich als „Nervenkitt“ (griechisch Glia = Klebstoff) fungierten (Parpura und Verkhratsky, 2012). In den letzten Jahren konnte jedoch mehr und mehr ihre wichtige Funktion für das ZNS und seine Stoffwechselfvorgänge gezeigt werden. Ihr Vorkommen und ihre Morphologie unterscheidet sich stark von der Lokalisation und der Beziehung zu den benachbarten Strukturen (Emsley und Macklis, 2006; Sherwood et al., 2006). Bereits die Erkenntnis, dass Astrozyten und Neuronen aus derselben Vorläuferzelle der Radialglia stammen und sich in funktionelle Neuronen umwandeln können (Götz und Huttner, 2005), gab einen ersten Hinweis auf ihre deutlich wichtigere Rolle im ZNS weit über ein bloßes „Nervenkitt“ hinaus. Mit ihren stern- bis spindelförmigen Ausläufern nehmen sie Kontakt zu den umliegenden neuronalen Oberflächen wie Synapsen, Axonen, Ranvier-Schnürringen, Blutgefäßen sowie der Hirnhaut auf und bilden eine Grenzschicht. Durch die Verbindung mittels Gap Junctions aus Connexin 43 bilden sie ein engmaschiges Netzwerk und sind hierdurch sowohl mechanisch als auch elektronisch untereinander verbunden. Neben ihrer Funktion als Ernährer der Neurone durch Kontaktaufnahme mit Blutgefäßen übernehmen sie eine Vielzahl an anderen Funktionen wie Beteiligung an der

Bluthirnschranke durch Ausbildung der Membrana limitans glialis perivascularis, Bildung einer Glianarbe nach Axondurchtrennung und Bildung des glymphatischen Virchow-Robin-Raumes. Dieser stellt als Pendant zum fehlenden Lymphsystem ein wichtiges Element zur Regulation des Flüssigkeitshaushalts und des Abtransportsystems dar (Kettenmann und Verkhratsky, 2011). In Bezug auf die Fragestellung, ob und inwiefern eine Interaktion bzw. Einflussnahme auf die neuronale Plastizität besteht, ist jedoch insbesondere ihre Fähigkeit der Aufnahme und Modifizierung von Neurotransmittern entscheidend. Neben der Aufrechterhaltung des extrazellulären Kaliumhaushaltes können auch weitere Ionen durch Gliazellen aufgenommen werden und durch ihre netzartige Kopplung auf benachbarte Gliazellen verteilt werden, was ein engmaschiges Puffersystem ermöglicht. Durch Rezeptoren für Glycin, GABA, Glutamat, endoplasmatische Spaltproduktbildung mit präsynaptischer Wiederaufnahme inklusive Vesikelverpackung stehen sie in direktem Austausch mit Neuronen, was insbesondere für das neurotoxische Glutamat eine fundamentale Funktion in der Aufrechterhaltung der interneuralen Homöostase darstellt und durch seine präsynaptische Wiederaufnahme auch als Glutamat-Glutamin-Zyklus bekannt ist (Volterra und Meldolesi, 2005). Insbesondere die Generierung von langsamen Calcium-Oszillationen über das astrogliale Synzidium gilt als Schlüsselfunktion (Charles et al., 1991). Des Weiteren nehmen sie Einfluss auf die Bildung, Formation und Stabilität von neuronalen Synapsen. Die enge räumliche Nähe zu Synapsen mit zum Teil Umhüllung der präsynaptischen Terminale und postsynaptischen Membran prägte den Begriff der „tripartite synapse“, um die enge Interaktion zu unterstreichen. Durch zum Teil gleiche Rezeptoren kann durch präsynaptische Neurotransmitterausschüttung sowohl die postsynaptische Membran als auch der Astrozyt erregt werden, was durch das bereits erwähnte vielverzweigte astrogliale Synzidium eine weite Fortleitung des Signals ermöglicht. Hierdurch kann der Astrozyt selbst direkt synaptische Aktivität detektieren und durch eigene Freisetzung von Neurotransmittern, auch Gliotransmitter genannt, darauf reagieren. Hierzu zählen Glutamat, ATP, Acetylcholin, Stickstoffmonoxide, GABA, BDNF und D-Serine (Kettenmann und Verkhratsky, 2011). Letztere haben eine wichtige Funktion in der Modulation von synaptischer Plastizität und Langzeitpotenzierung (Bains und Oliet, 2007; Di Castro et al., 2011).

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Nicht zuletzt durch die weitreichenden individuellen und gesellschaftlichen Auswirkungen von chronisch sozialem Stress – eine der Gesundheitsgefahren des 21. Jahrhunderts – besteht ein anhaltend hohes Forschungsinteresse, die genauen Mechanismen besser zu verstehen, neue Therapieoptionen zu schaffen bzw. das generelle Auftreten stressassoziierter Erkrankungen zu reduzieren. Wie bereits dargestellt, konnten in zahlreichen Studien stressassoziierte Effekte auf die Neuroplastizität und damit einhergehende Lerneinschränkungen sowie histologische Veränderungen gezeigt werden. Hier nehmen Mikroglia und Astrozyten mit ihren mannigfaltigen Möglichkeiten der Modulierung und Einflussnahme auf neuronale Prozesse und synaptische Signaltransduktion eine wichtige Schlüsselfunktion ein. Unklar ist, ob die stressassoziierten Veränderungen der untersuchten Hirnregionen wie der Präfrontale Kortex, der Hippocampus und das Kleinhirn ursächlich zu Defiziten im motorischen Lernen führen oder diese durch Beeinträchtigungen der allgemeinen Psychomotorik lediglich mitbedingen. Trotz seiner Funktion als übergeordnete Steuereinheit für Willkür und Feinmotorik gibt es aktuell keine Untersuchungen im primären Motorkortex. Ziel dieser Arbeit war, erstmalig stressassoziierte Effekte auf die motorkortikale Neuroplastizität durch longitudinale In-vivo-Mikroskopie dendritischer Spines im Mausmodell nachzuweisen und sowohl mit mikroglialen als auch astrozytären morphologischen Veränderungen durch Immunhistochemie zu korrelieren. Im Weiteren sollte versucht werden, durch Korrelation mit erhobenen Lern- und Verhaltensdaten und hierdurch erfolgter phänotypischer Einteilung in eine stress-resiliente und eine stress-suszeptible Kohorte Unterscheidungsmerkmale bzw. dysfunktionsspezifische Mechanismen zu identifizieren, die eine mögliche stressinduzierte Beeinträchtigung der motorischen Leistungsfähigkeit bedingen und so Hinweise auf neurobiologische Resilienzfaktoren geben.

2. Material und Methoden

Diese Arbeit mit Schwerpunkt auf der Spineanalyse und Immunhistochemie war Teil eines Gesamtprojekts mit der Fragestellung der neurobiologischen Grundlagen und Zusammenhänge von Stressphänotyp, Resilienz und motorischem Lernen. Die Ergebnisse der eigenständig durchgeführten Spineanalyse sowie der Immunhistochemie mit Konfokalmikroskopie und Bildauswertung wurden in dieser Arbeit mit den bereits vorhandenen Ergebnissen der Verhaltensversuche zur Bestimmung des Stressphänotyps sowie denen aus den motorischen Lerneinheiten korreliert. Im Folgenden werden daher auch die Operation und Zwei-Photonen-Mikroskopie (2PM) zur Generierung der Bilder für die Spineanalyse, die Perfusion der Versuchstiere, das verwendete Stressmodell sowie die Verhaltensversuche und motorischen Lerneinheiten erläutert, auch wenn diese nicht eigenständiger Teil dieser Arbeit waren, sondern als Daten zur Verfügung gestellt wurden.

2.1 Versuchstiere

Die artgerechte Haltung der verwendeten Versuchstiere entsprach dem deutschen Tierschutzgesetz sowie der Tierschutz-Versuchstierverordnung und dem Tierversuchsantrag (Az. 81-0.2.04.2018.A124). Vor Versuchsbeginn erfolgte eine Gruppenhaltung von zwei bis fünf Tieren pro Käfig. Während des Versuchsablaufs wurden die Tiere einzeln in üblichen Maushaltungskäfigen gehalten. Futter und Wasser standen jederzeit zur freien Verfügung. Lediglich für den Forelimb-Reaching-Test erfolgte eine restriktive Fütterung (siehe Kapitel 2.4.1), um die Motivation zum Erlernen des Greifens nach einem Futterpellet zu erhöhen. Es wurde ein 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus eingehalten. Die Temperatur betrug konstant 22-23°C. Es wurden insgesamt 54 männliche transgenetische Mäuse (Alter 9.77 ± 0.75 Wochen bei Experimentbeginn) des Stammes Tg (Thy1-EGFP) MJrs/J, die im Folgenden kurz als Thy1-Mäuse bezeichnet werden, sowie männliche CD-1 IGS Auszuchtmäuse (kurz CD-1) für den Social Defeat Test verwendet. Durch eine veränderte Promotorregion des GPI-Ankerproteins Thy1 exprimiert die M-Linie des Thy1-Stammes das fluoreszierende Protein eGFP in unter 10 Prozent aller retinalen und lumbalen Ganglionzellen sowie kortikalen Neuronen mit ihren Axonen und Dendriten (Feng et al., 2000). Insbesondere betrifft dies die pyramidalen Neuronen aus Layer V sowie in deutlich geringerem Anteil aus Layer II/III. Dies ermöglicht die mikroskopische Untersuchung dieser eGFP exprimierenden neuronalen Strukturen

durch Photostimulation. Es wird davon ausgegangen, dass es sich hierbei um eine kleine, aber repräsentative Subgruppe von neuronalen Zellen handelt, da sie in Bezug auf den synaptischen Input die gleiche räumliche Verteilung zeigen wie eGFP negative neuronale Zellen (Holtmaat et al., 2005). In der Folge wurden alle Tiere mit postoperativen Blutungen, Bruch oder Trübung des Knochenfensters und somit qualitätsbedingter Nichtauswertbarkeit der 2PM-Spineaufnahmen zu Experimentbeginn ausgeschlossen (n = 5). Der Versuch begann mit insgesamt 49 Tieren. Von der immunhistochemischen Auswertung wurden alle Versuchstiere ausgeschlossen, die nach kardialer Perfusion und Hirnentnahme einen ausgeprägten Restblutanteil im Gewebe enthielten oder deren Motorkortex eine mechanische Schädigung durch die Postprozessierung aufwies (n = 17). Innerhalb der Kontrollgruppe erfolgte ein Ausschluss von Tieren, die in den Verhaltensversuchen in zwei oder mehr Parametern den Grenzwert für Stresssuszeptibilität überschritten (n = 3). Des Weiteren erfolgte ein Ausschluss von Mäusen, die im Forelimb-Reaching-Test entweder keinerlei Greifversuche zeigten (n = 6) oder bei denen ein Wechsel in der Pfotenpräferenz zur ipsilateralen Seite des Knochenfensters vorlag (n = 9).

2.2 Darstellung und Analyse der strukturellen Plastizität mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie

2.2.1 Implantation eines kranialen Knochenfensters

Zur Implantation des kranialen Knochenfensters erfolgte die Orientierung nach Franklin und Paxinos (2007), wonach sich in der Kraniotomie der primär-motorische Kortex im Bereich Bregma + 0,62 mm bis Bregma + 1,98 mm befindet. Nach medial und rostral schließt sich der sekundär-motorische Kortex an. Anhand der Koordinaten bzw. makroskopisch kann keine genaue Abgrenzung vorgenommen werden, sodass die Möglichkeit besteht, dass zusätzlich Anteile des sekundär-motorischen Kortex mit erfasst werden (Franklin und Paxinos, 2007). Nach Bestimmung der Händigkeit bzw. der Pfotenpräferenz (siehe Kapitel 2.2.2) wurde durch Kraniotomie ein Knochenfenster über dem linken bzw. rechten motorischen Kortex implantiert. Hierfür erfolgte eine tiefe Narkose durch intraperitoneale Gabe von Medetomidin 0.5 mg/kg, Midazolam 5 mg/kg, und Fentanyl 0.05 mg/kg i. p. (MMF). Eine ausreichende Narkosetiefe wurde mittels Überprüfung des Zehenkneifreflex gewährleistet. Perioperativ erfolgte die Applikation von

Caprofen 5 mg/kg s. c. als Antiphlogistikum sowie Bepanthen Augensalbe zur Verhinderung trockener Augen. Der Operationsbereich wurde enthaart und die Maus in einer speziellen stereotaktischen Vorrichtung eingespannt. Nach Entfernung eines Stücks der Schädelhaut wurde das darunter liegende Periost mit Wasserstoffperoxid desinfiziert. Je nach Händigkeit und entsprechend der stereotaktischen Koordinaten nach Franklin und Paxinos (2007) wurde die Schädeldecke mit einem Durchmesser von 3 bis 4 mm kreisrund aufgebohrt, sodass das noch mit intakter Dura Mater überzogene Gehirn frei lag. Hierauf wurde mittels Acrykleber und Zahnzement ein rundes und zuvor desinfiziertes Deckglas mit 5 mm Durchmesser befestigt. Zusätzlich wurde eine spezielle Plastikhalterung kontralateral und parietookzipital des Knochenfensters mit Zahnzement angebracht. Hierdurch wurden eine Fixierung und Positionierung des Mäuseschädels für die folgenden 2PM-Einheiten ermöglicht. Während der Operation erfolgte durchgehend die Überwachung der Narkosetiefe (Zehenkneifreflex, Atemfrequenz). Nach Beendigung der Operation erfolgte eine Antagonisierung der Anästhesie durch intraperitoneale Gabe von Atipamezol 2,5 mg/kg KG, Flumazenil 0,5 mg/kg KG und Naloxone 1,2 mg/kg KG. Die Tiere wurden unter einer Wärmelampe bis zum vollständigen Erwachen und Normalisierung der Motorik beobachtet. In der anschließenden postoperativen Erholungsphase wurde zunächst zur Entzündungshemmung zweimal täglich für insgesamt drei Tage Buprenorphin 0,1 mg/kg Körpergewicht s. c. verabreicht. Die erste Gabe erfolgte 12 Stunde postoperativ. Es erfolgte via Gewichts- und Wundkontrolle eine genaue Beobachtung des Heilungs- und Erholungsprozesses.

2.2.2 Durchführung

Untersucht wurde, wie sich die eGFP-Dendriten bzw. ihre Spines von Layer II und III des primären motorischen Kortex während des Versuchsablaufs durch die unterschiedlichen Interventionen (Stress, Erholung, motorische Lerneinheiten) veränderten. In den ausgewählten Kortexschichten finden sich überwiegend Dendriten von Pyramidenzellen, deren Zellkörper in der Kortexschicht IV liegen. Durch ihre Axone erfolgte die Übertragung der Bewegungsinisierung auf periphere Motoneurone. Die direkte In-vivo-Mikroskopie wird durch das Knochenfenster direkt über dem Motorkortex möglich gemacht. Die zwischen dem Kortexgewebe liegenden Schichten aus Dura mater, Pia mater und dem Glas des Knochenfensters können vom Laser leicht durchdrungen werden und

ermöglichen qualitativ hochwertige In-vivo-Aufnahmen des Kortexgewebes. Begonnen wurde mit der Zwei-Photonen-Mikroskopie drei Wochen postoperativ (3,29±0,13 Wochen). Zur Verhinderung von Bewegungsartefakten und Reduktion des Stresserlebens wurden die Versuchstiere für die Dauer der 2PM-Einheit narkotisiert. Da die Mäuse während der Mikroskopie keinen Schmerzreizen ausgesetzt sind und somit keine Analgesie, sondern lediglich eine Sedierung gewünscht war, wurde auf Fentanyl verzichtet (Gabe von Medetomidin 0,5 mg/kg KG und Midazolam 5 mg/kg KG i. p.). Um den Einfluss der Narkose auf die strukturelle Plastizität möglichst gering zu halten, wurde die Narkosetiefe über den Zehenkneifreflex überprüft und ggf. angepasst. Im Weiteren wurde vorgegangen, wie bereits in der Methodik und Durchführung zum Knochenfenster beschrieben. Zur Verhinderung einer Auskühlung der Versuchstiere wurde die Körpertemperatur mit einer Wärmematte auf 37°C stabil gehalten. Zur Reduktion von Atemartefakten während der Bildaufnahme erfolgte eine Fixierung des Maushinterkopfes durch ein zuvor speziell hierfür angebrachtes Plastikelement mit dem Objektisch. Hierdurch wurde auch eine Korrektur der Kopfausrichtung während der Aufnahme ermöglicht. Die Augen wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Bepanthen Augensalbe behandelt. Nach Beendigung der Aufnahme wurde die Anästhesie mittels Gabe von Atipamezol 2,5 mg/kg KG i. p. und Flumazenil 0,5 mg/kg KG i. p. antagonisiert und die Tiere unter einer Wärmelampe in ihrem Käfig bis zur Wiederherstellung des normalen Aktivitätsniveaus beobachtet. Um eine Orientierung zu ermöglichen und im Laufe des Versuchs dieselbe Kortexregion, welche im Weiteren unter Region of Interest (ROI) aufgeführt wird, bei einem Versuchstier mehrfach wieder aufnehmen zu können, erfolgte zunächst die Darstellung und anschließende Dokumentation oberflächlicher Gefäße mittels Epifluoreszenz (450 nm) unter vierfacher Vergrößerung. Diese dienen dann in weiteren Mikroskopiereinheiten als Leitstrukturen. Für die 2-Photonen-Mikroskopie wurde ein Chameleon Vision S Laser verwendet. Die Bildaufnahme erfolgte mit der Software ScanImage (Vidrio Technologies). Regionen mit in der xy-Ebene verlaufenden und gut abgrenzbaren Dendriten wurden mittels eines Wasserimmersions-Objektivs (40x / NA 0,8, Olympus) aufgenommen. Nach Auswahl der gewünschten Region erfolgte die Bildaufnahme durch eine Anregungswellenlänge von 910 nm. Im Verlauf erfolgten bedarfsadaptierte Anpassungen der Laserintensität. Pro Tier wurden jeweils zwei bis drei Regionen mit repräsentativen Dendriten ausgewählt und Z-Stapel hiervon erstellt. Die

Bildgröße lag bei 512x512 Pixel (X-Y-Dimension) mit einer Auflösung von $\sim 0,08 \mu\text{m}/\text{Pixel}$ (x, y), sowie $0,8 \mu\text{m}$ Bildschritte in der Z-Ebene, die Pixelverweilzeit lag bei 2000 ns. Über den gesamten Versuch wurde dieselbe Region bis zu siebenmal wieder aufgenommen. Die Zeitabständen zwischen zwei 2PM-Einheiten lagen zwischen minimal drei und maximal zwölf Tagen (siehe Abbildung 1, Seite 31).

2.2.3 Auswertung

Es wurden alle Bilder in die Analyse aufgenommen, deren Qualität eine Auswertung zu Zeitpunkt 1 (vor Stress) und 2 (direkt nach Stress) erlaubte. Die auswertbaren Gruppengrößen können Tabelle 1 des Ergebnisteils entnommen werden (siehe Tabelle 1, Kapitel 3.3, Seite 39). Die Auswertung der Bilder erfolgte mit Hilfe des MATLAB-basierten Skripts „SpineAnalysis“ nach Holtmaat (2005) und Polugrutto (2003). Als Spine wurde eine seitliche Ausstülpung eines Dendriten definiert, die mindestens eine Länge von $0,4 \mu\text{m}$ hatte. Pro Region wurden zwischen drei bis fünf Dendriten ausgewählt. Die Mindestlänge lag bei $30 \mu\text{m}$. Neben der Länge wurde darauf geachtet, dass alle Dendriten über eine ausreichende Bildqualität verfügten und wenige Kreuzungen mit anderen Dendriten aufwiesen. Mit Hilfe eines in unserer Gruppe entwickelten Python-Codes (abrufbar unter: <https://github.com/danielmk/spinestats>) wurde die Spinedichte (Anzahl aller Spines/ μm zu einem der gemessenen Zeitpunkte im Verhältnis zur Baseline prästress), das Überleben ursprünglicher Spines (welche in der ersten 2-PM-Einheit als Baseline vorhanden waren), der Spineverlust, die Spineneubildung und die Relation Spineneubildung zu Spineverlust jeweils zwischen zwei aufeinanderfolgenden 2-PM-Einheiten bestimmt.

2.3 Bestimmung des Stressphänotyps

Gemäß dem Verhalten der Versuchstiere nach der im Folgenden beschriebenen Stressexposition und den Verhaltensversuchen erfolgte die Einteilung in stress-resiliente und stress-suszeptible Tiere, welche in mindestens zwei der drei Verhaltenstest die Toleranzgrenze überschritten hatten. Mäuse aus der Kontrollgruppe, die in mehr als einem Verhaltenstest den Cut-off-Wert überschritten, wurden aus dem Experiment ausgeschlossen.

2.3.1 Stressmodell

Als Stressmodell wurde „chronic social defeat stress“ (CSDS) verwendet. Dieser beruht auf einem „Resident-Intruder“ Paradigma, indem ein Tier in den Käfig eines anderen artgleichen Tieres gesetzt wird, um eine nicht tödliche Auseinandersetzung durch körperliches Attackieren zu provozieren. Es handelt sich um ein gut untersuchtes Paradigma für die Untersuchung von aggressivem und defensivem Verhalten und führt bei dem attackierten Tier zu hohem Stresserleben mit Ausbildung anhaltender Verhaltensänderungen, die mit typischen depressiven Merkmalen wie Anhedonie, sozialem Rückzug, reduziertem Aktivitätsniveau und Vernachlässigung bis Einstellung der Selbstfürsorge (Fellpflege, Nestbau) einhergehen (Buwalda et al., 2005; Golden et al., 2011). Für den Versuch erfolgte eine zufällige Zuordnung der Tiere in die Gruppen Stress und Kontrolle in dem Verhältnis 1,5:1. Ein Versuchstier der Stressgruppe wurde als „Intruder“ für fünf Minuten an zehn aufeinanderfolgenden Tagen in den Käfig zu dem „Resident“, einer CD-1, Maus gesetzt. Zuvor erfolgte die Testung auf ein ausreichend hohes Aggressivitätspotenzial nach Golden et al. (Golden et al., 2011). Die CD-1 Maus nimmt die hinzugesetzte Maus als Eindringling wahr und beginnt zu attackieren. Im Anschluss verblieben die Tiere im selben Käfig. Eine durchsichtige, löchrige Trennwand sorgte dafür, dass weiterhin Sicht- und Geruchskontakt zwischen Aggressor und Defensor für 24 Stunden bestand. An jedem der folgenden neun weiteren Tage erfolgte die Wiederholung der fünfminütigen direkten Auseinandersetzung. Einer möglichen Verzerrung durch unterschiedliche Intensitäten der Attacken wurde durch tägliche Rotation der CD-1 Maus entgegengewirkt. Die schutzlose und wiederholte Exposition gegenüber einem starken Stressor, hier die attackierende CD-1 Maus, sowie weiterhin bestehendem visuellen und olfaktorischen Kontakt in den Ruhephasen während der Attacken führt zu einer anhaltend hohen Stressexposition für die Versuchstiere. Um Stresssymptome besser objektivieren zu können, erfolgten während der zehn Tage regelmäßige Gewichtsmessungen und nach den 10 Tagen der Saccharose-Präferenz Test, Analysen des Nestbaus und des sozialen Vermeidungsverhaltens. Auch die Käfige der Kontrollgruppe wurde für diesen Zeitraum mit der beschriebenen Trennwand, die weiterhin visuellen und olfaktorischen sowie akustischen Kontakt zulässt, halbiert, jedoch wurde in die andere Hälfte eine stammgleiche Maus gesetzt. Käfige und Paarhaltung der

Kontrollgruppe wurden über die Dauer des Stresstestes nicht verändert
 2.3.2 Verhaltensversuche

2.3.2.1 Sacharose-Präferenz Test

Ein typisches depressives Verhaltensmerkmal ist Anhedonie, worunter die Verringerung bzw. Unfähigkeit, Freude und Lust zu empfinden sowie eine allgemein eingeschränkte Genussfähigkeit verstanden wird (Margraf, 2016). Im Mausversuch dient hierfür der Sacharose-Präferenz Test. Die bei Mäusen natürlich vorhandene Vorliebe für Süßes nimmt in Stress- und Depressionsmodellen deutlich ab und wird in Analogie zur Anhedonie gewertet (Willner et al., 1987). Vor Beginn des CSDS-Tests erfolgte für zwei Tage eine Habitierungsphase an kleinere Trinkflaschen sowie an die einprozentige Saccharose Lösung. Nach dem CSDS-Test wurde den Versuchstieren über 48 Stunden, zusätzlich zu ihrer normalen mit Leitungswasser gefüllten Trinkflasche, erneut eine zweite Trinkflasche mit einprozentiger Saccharose Lösung angeboten. Es erfolgte ein täglicher Positionswechsel der Trinkflaschen, um eine mögliche Ergebnisverzerrung durch eine Lagepräferenz zu verhindern. Durch tägliche Markierung des Wasserpegels (drei Farben für Start, Tag 1 und Tag 2) wurde die verbrauchte Trinkmenge festgehalten. Zu Beginn, nach 24 und nach 48 Stunden erfolgte die Analyse der verbrauchten Trinkmenge durch Messung des Gewichts der Trinkflasche. Zur Auswertung wurde die verbrauchte Saccharose-Lösung in Relation zur insgesamt verbrauchten Trinkwassermenge gesetzt (Willner et al., 1987). Der Cut-off-Wert für Anhedonie lag bei einer reduzierten Sachcharoseaufnahme von ≤ 60 Prozent.

2.3.2.2 Nestbau

Nestbau ist ein wichtiger Indikator für das allgemeine Wohlbefinden von Mäusen. Nester dienen den Tieren als Rückzugsort und Wärmeisolation während der Ruhephase und sind wichtig für die Reproduktion. Im Tierversuch dient die Analyse der Nestbaus als Analogie zur Fähigkeit der Selbstfürsorge und ermöglicht so Rückschlüsse auf das psychische Wohlbefinden des Tieres (Deacon, 2006), das unter Stressbelastung eingeschränkt bis aufgehoben ist. Dies zeigt sich in deutlichen Defiziten im Nestbau, was unter anderem mit reduzierter Fähigkeit zur gerichteten Aufmerksamkeit, erniedrigter Motivation und erhöhtem Angstlevel in Bezug gesetzt wird (Otabi et al., 2016). Zusätzlich fordert der Nestlet-Shredding Test die Fähigkeit, mit den Vorderpfoten zu greifen und ermöglicht

zusätzliche Rückschlüsse auf Veränderungen der Sensomotorik (Otabi et al., 2017). Vor Nestbeginn wurde bereits vorhandenes Nestmaterial aus den Käfigen entfernt. Jeder Maus wurde ein abgewogenes Stück (8-10 g) Baumwoll-Nestlet zum Nestbau zur Verfügung gestellt. Nach drei Stunden wurde das neu errichtete Nest fotografiert und das verbliebene, noch nicht zum Nestbau benutzte Nestlet, abgewogen. Aus der Gewichts Differenz prä/post wurde die Menge des verbauten Nestmaterials ermittelt. Anhand der Fotos des Nestes erfolgte nach Deacon et al. (2006) die Einteilung in fünf Stadien. Der Cut-off-Wert für stressbedingt veränderten Nestbau lag bei einem Stadium von ≤ 3 .

2.3.2.3 Soziale Vermeidung

Zur Einschätzung der Stressvulnerabilität und Einteilung in die phänotypischen Gruppen der stress-suszeptiblen Tieren und der stress-resilienten Tiere wurde der Social-Avoidance-Test eingesetzt. Im ersten Durchlauf während der aktiven Phasen der Mäuse (nach 18 Uhr) wurde das Testtier zunächst in die rechte untere Ecke eines Käfigs (40 x 40 cm) gesetzt, indem sich an einer Seite ein weiterer kleiner leerer Käfig befand. Für 2,5 Minuten wurde beobachtet und per Videokamera von oben aufgenommen, wie sich die Maus in der neuen Umgebung verhielt. Im Anschluss wurde die Maus zunächst zurück in ihren eigenen Käfig gesetzt. Für den zweiten Durchlauf wurde in den zuvor noch leeren, kleinen Käfig eine fremde, aggressive CD-1 Maus gesetzt. Die Testmaus wurde erneut in der rechten unteren Ecke platziert. Für weitere 2,5 Minuten erfolgte die Aufnahme mittels Videokamera, wie sich das Testtier verhält, insbesondere ob und wie lange es Kontakt zu der CD-1 Maus sucht. Zur Analyse wurde die Software Ethovision XT (Noldus) verwendet. Gemessen wurde die Zeit, in welcher sich das Versuchstier in unmittelbarer Umgebung zu dem kleinen Käfig mit und ohne CD-1 Maus aufhält. Als Bezugspunkt diente die Nase der Testmaus sowie ein kreisförmiges Areal mit einem Radius von 2 cm Abstand zu dem Käfig, in dem sich die CD-1 Maus befand. Im Anschluss wurden die Zeiten 1. Interaktion mit CD-1 Maus und 2. Interaktion mit leerem Käfig in Bezug gesetzt. Je kleiner die Relation, desto stärker ausgeprägt war die soziale Vermeidung. Es ist bekannt, dass ca. 30 Prozent der Tiere keine soziale Vermeidung zeigen und demnach als stress-resilient eingestuft (Golden et al., 2011; Vasconcelos et al., 2015) werden. Als Cut-off-Wert galt

hier eine Zeit von ≤ 50 Sekunden innerhalb des definierten Radius bzw. von ≤ 33 Prozent in Relation zur Gesamtzeit.

2.4 Motorische Lerntests

2.4.1 Feinmotorik: Skilled-Forelimb-Reaching-Test

Zur Testung der Feinmotorik und der Bestimmung der Händigkeit bzw. der Vorderpfotenpräferenz wurde der Skilled-Forelimb-Reaching-Test verwendet. Dieser Test ist der Goldstandard zur Erhebung der feinmotorischen Fertigkeiten in Nagern und wird bei hoher Sensitivität eingesetzt, um akute Änderung durch z.B. eine Hirnverletzung oder temporäre Inaktivierung von motorischen Arealen zu erkennen. Der Test detektiert jedoch auch beginnende motorische Rehabilitation nach Verletzungen oder medikamentös induzierte motorische Änderungen (Salameh et al., 2020). Hierbei ist es das Ziel, dass die Maus lernt, mit ihrer Vorderpfote nach einem Futterpellet zu greifen, diesen anzuheben und zwischen Plexiglasstäben in den Mund zu führen. Es wurde ein extra für diesen Versuch hergestellter Käfig mit dem Maß 20 x 8,5 x 15 cm verwendet. Dieser verfügt über eine Front, die mit Plexiglasstäben (1 cm Breite und 3 cm Höhe) versehen ist, sodass die Maus durch sie hindurchgreifen kann. Als zusätzliche Schwierigkeit gab es ein Millimeter hohes Holzstäbchen, über das das Futterpellet gehoben werden musste. Der Versuch wurde mithilfe einer Videokamera (GoPro Hero 5 Black) aufgenommen. Es wurden 14 mg Pellets von TSE-Systems GmbH verwendet. Präoperativ wurde der Maus zur Bestimmung der Händigkeit ein mittig vor den Plexiglasstäben platziertes Pellet präsentiert, sodass das Versuchstier frei wählen konnten, ob es mit der linken oder der rechten Vorderpfote versucht das Pellet zu greifen. Es erfolgte eine Wiederholung über drei Tage. Um eine frühe Habituation zu verhindern, wurden die Greifversuche auf die maximale Anzahl von fünf limitiert. Die häufiger verwendete Pfote wurde als die dominante Seite definiert. Postoperativ zur Testung der Feinmotorik erfolgte zunächst über fünf Tage eine Habituation. Hierfür hatte jedes Tier 20 Minuten Zeit, den Testkäfig kennenzulernen. Ab dem dritten Habituationstag erfolgte eine nächtliche Futterreduktion, um einen Gewichtsverlust von ca. 10 Prozent zu erreichen und so eine höhere Greifmotivation zu erzielen. Für die Trainingsphase wurden die Pellets je nach Händigkeit rechts- bzw. linksseitig vom Greifschlitz platziert. Nach dem ersten erfolgreichen Greifen des Futterpellets erfolgte die Erhöhung der Schwierigkeitsstufe durch Installierung eines

Holzstäbchen (Höhe 1 mm). Insgesamt wurden pro Tag 48 Pellets in je vier Trainingsblöcken angeboten. Am letzten Tag hatte jedes Tier nur 12 Versuche ein Futterpellet zu greifen. Als erfolgreicher Greifversuch galt, wenn das Pellet mit der Pfote gegriffen wurde und im ersten oder zweiten Versuch gefressen wurde. Für den Gesamterfolg wurden die erfolgreichen Greifversuche in Relation zu den insgesamt erfolgten Greifversuchen gesetzt. Als Verbesserung der motorischen Lernleistung galt, wenn insgesamt eine Verbesserung um mindestens einen erfolgreichen Greifversuch vorlag. Mehr als einmaliges Nachgreifen wurde als Fehlversuch gewertet. Die erfolgreichen Greifversuchen im ersten Durchgang wurden als N1, die des zweiten Durchgangs als N2 aufgeführt. Der Gesamtgreiferfolg wurde nach folgender Formel berechnet:

$$N_{\text{Greiferfolg gesamt}} = \frac{N1 \text{ erfolgreicher Greifversuch} + N2 \text{ erfolgreicher Greifversuch}}{\text{Greifdurchgänge total}}$$

2.4.2 Grobmotorik: Accelerated-Rotarod-Test

Zur Testung der grobmotorischen Fähigkeiten erfolgte die Durchführung des Rotarod-Tests. Es handelt sich um einen der bekanntesten und am häufigsten angewandten Tests zur motorischen Performance und Ausdauer einer Maus. Der Rotarod besteht aus einem rotierenden Zylinder, dessen Drehgeschwindigkeit zwischen 4 und 40 Umdrehungen pro Minuten (rpm) einstellbar ist und während des Tests stufenweisen erhöht wird. Gemessen werden die Zeit, die sich ein Tier bis zum Herabfallen (Distanz zwischen Zylinder und Boden: 12 cm) auf dem rotierenden Zylinder halten kann, und die Endgeschwindigkeit zu diesem Zeitpunkt. Mäuse mit motorischen Einschränkungen fallen schneller und erreichen geringere Umdrehungsgeschwindigkeiten. Der Test verfügt über eine hohe Sensitivität und wird aufgrund der leichten Handhabung gerne und häufig angewandt. Jedoch ist die Interpretation der Ergebnisse aufgrund einer niedrigen Spezifität eingeschränkt. Eine schlechte Performance kann unter anderem aufgrund von Muskelschwäche, hypo- oder hyperkinetischen Bewegungsstörungen, Defiziten im motorischen Lernen, epileptischen Anfällen, fehlender Motivation oder einem hohen Angstlevel auftreten (Jinnah und Hess, 2015). Die Durchführung erfolgte nach Bilkei-Gorzo et al. (2005). Einen Tag vor Beginn erfolgte zunächst die Habituation der Tiere an den Rotarod. Hierzu wurde zunächst die geringste Geschwindigkeitsstufe (4 rpm) gewählt, bis zu fünf Tiere gleichzeitig auf dem Zylinder platziert und gewartet, bis alle

Tiere eine ruhige und gleichmäßige Bewegungsabfolge zeigten (bis maximal 3 Min.). Am Folgetag wurden die Tiere erneut auf dem Zylinder platziert. Begonnen wurde erneut mit vier Umdrehungen pro Minute. Es folgte eine konstante Geschwindigkeitserhöhung mit einer Umdrehung pro Minute, bis die Maximalgeschwindigkeit von 20 Umdrehungen pro Minute erreicht wurde. Als Cut-off galten 90 Sekunden auf der höchsten Geschwindigkeitsstufe. Der Versuch wurde für jedes Tier beendet, sobald es vom Zylinder gefallen war. Es erfolgte eine automatische Detektion der Gesamtzeit auf dem Rotarod und der erreichten Maximalgeschwindigkeit. Ein heruntergefallenes Tier bekam eine einminütige Erholungspause, bevor es erneut auf den Rotarod gesetzt wurde und der Versuch für dieses Tier erneut mit der Startgeschwindigkeit von vier Umdrehungen pro Minute begann. Dies wurde so oft wiederholt, bis keine Verbesserung mehr festgestellt werden konnte bzw. bis die Zeitdifferenz zwischen drei aufeinander folgenden Versuchen < 30 Prozent lag. Zur Analyse wurde pro Tier die längste erreichte Zeit auf dem Rotarod als Funktion der benötigten Versuche für diese Performance (mit 95 % Konfidenzintervall) aufgetragen. Die längste erreichte Zeit galt als Lerngeschwindigkeit. Wendepunkt der so entstandenen sigmoidalen Lernkurve war die Anzahl der Versuche, die ein Tier benötigte, um 50 Prozent der maximalen Zeit auf dem Rotarod zu erreichen.

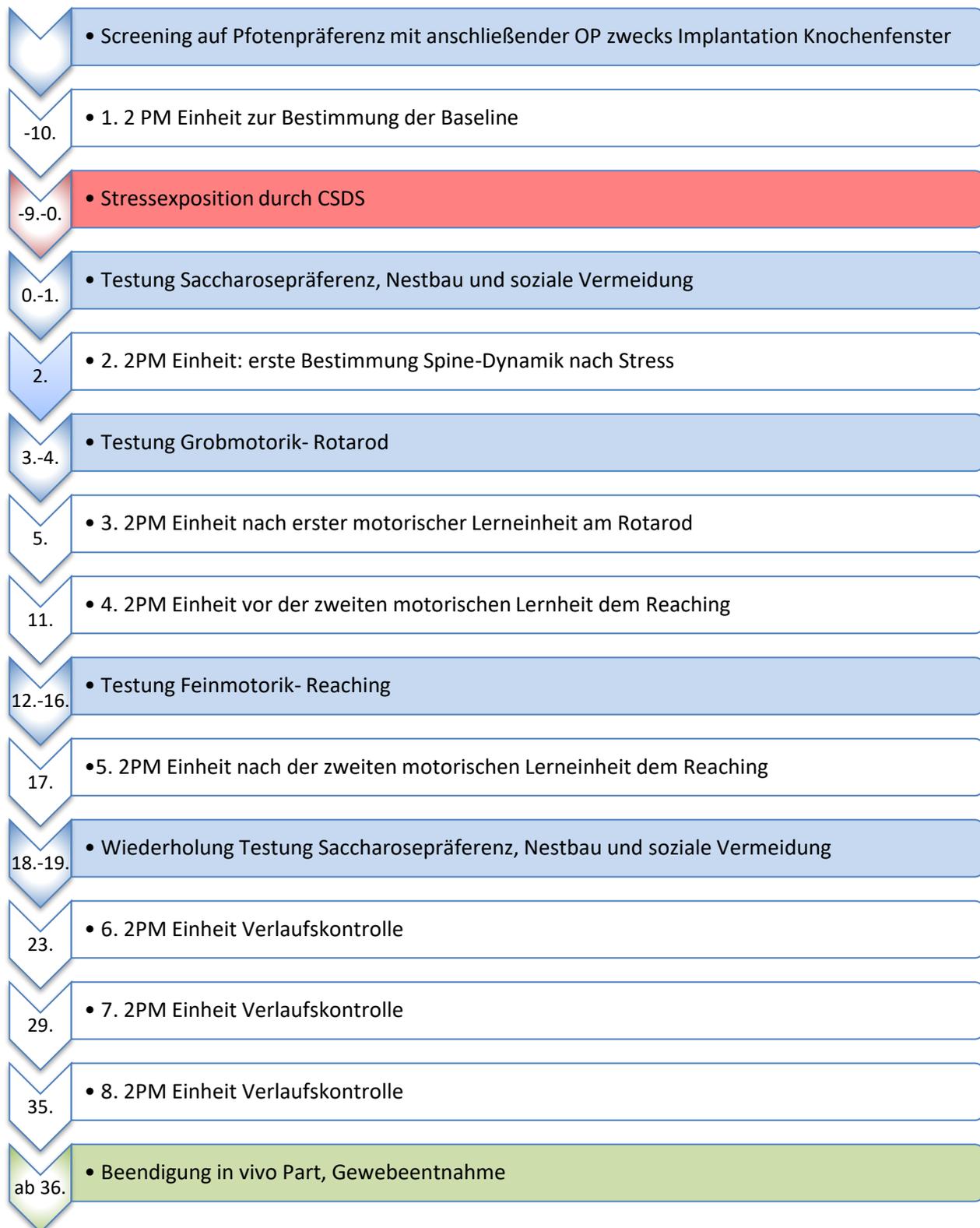


Abbildung 1. Versuchsablauf mit Übersicht der Abfolge von 2PM-Einheiten und Interventionen sowie Verhaltensversuchen. Zahlen kennzeichnen den Tag nach Stressexposition

2.5 Immunhistochemie

2.5.1 Allgemeines Prinzip

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf der Bindung eines Antikörpers mit einer spezifischen Gewebeeigenschaft, dem Epitop, welches sowohl intrazelluläre als auch oberflächengebundene oder extrazelluläre Proteine darstellen kann. Im Idealfall kommt es zu einer spezifischen Antigen-Antikörperreaktion. Durch Markierung des Antikörpers mit einem Fluoreszenzfarbstoff kann dieser durch Epifluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Hierfür erfolgt die Anregung des Farbstoffes mit Licht einer bestimmten Wellenlänge. Das emittierte Licht wird entsprechend der Wellenlänge gefiltert und hierdurch das spezifische Antigen nachgewiesen (Stoffels et al., 2012). Prinzipiell stehen die direkte und die indirekte Immunfluoreszenz zur Verfügung. Bei der direkten ist der verwendete Antikörper direkt mit einem Fluorochrom gekoppelt. Bei der indirekten Methode erfolgt die Färbung in zwei Schritten. Zunächst wird der primäre Antikörper auf das zu untersuchende Gewebe aufgebracht. In einem zweiten Schritt bindet dann der fluoreszenzmarkierte Antikörper an den ersten Antikörper. Um sicherzustellen, dass es sich hierbei um eine spezifische Bindung handelt und der zweite farbstoffmarkierte Antikörper nicht an andere Gewebsstrukturen bindet, erfolgt die Negativprobe. Durch Weglassen des ersten Antikörpers kann getestet werden, ob der zweite Antikörper auch unspezifisch im Gewebe bindet. Da die indirekte Immunfluoreszenz über eine höhere Signalintensität verfügt, zudem flexibler und kostengünstiger ist, wird ihr in der Praxis der Vorzug gegeben (Stoffels et al., 2012)

2.5.2 Verwendete Antikörper

Ionized calcium binding adapter molecule (Iba-1) ist ein zytoplasmatisches Protein, welches insbesondere in Makrophagen und Mikroglia vorkommt und während der Zellaktivierung verstärkt exprimiert wird. Zur Färbung der Mikroglia wurde in diesem Versuch Anti-Iba-1 als primärer Antikörper (Firma Wako, cat. 0191974, Verdünnung 1:1000, gewonnen aus Kaninchen) verwendet. Als sekundärer fluoreszenzmarkierter Antikörper diente Alexa568 (Firma Invitrogen, Verdünnung 1:1000, gewonnen aus Ziege gegen Kaninchen, Lagerung bei -20°C). Zur Färbung der Astrozyten wurde GFAP (glial fibrillary acidic protein) als Epitop gewählt. GFAP ist Bestandteil der zytoplasmatischen Intermediärfilamente von Gliazellen und kommt im ZNS insbesondere in Astrozyten vor. Als primärer Antikörper wurde Anti-GFAP (Firma ABCAM, Verdünnung 1:1000, gewonnen

aus Kaninchen) verwendet. Die Fluoreszenzmarkierung wurde mit Alexa647 (Firma Invitrogen, Verdünnung 1:1000, gewonnen aus Ziege gegen Kaninchen, Lagerung bei 4°C) als sekundärer Antikörper durchgeführt.

2.5.3 Gewebegewinnung und Aufarbeitung

Damit die Antikörper an ihrer Zielstruktur binden können, müssen die Zellwände permeabel gemacht werden. Daher können prinzipiell nur speziell aufgearbeitete, fixierte Zellen verwendet werden. Nach der letzten 2PM-Einheit erfolgte eine tiefe Anästhesie durch intraperitoneale Gabe von Ketamin 240 mg/kg KG und Xylazin 32 mg/kg KG. Die ausreichende Tiefe wurde am vollständigen Erlöschen des Zehenkneifreflexes überprüft. Für die anschließende 24-stündige kardiale Perfusion wurden nach Thorakotomie 50 ml kalte, phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, pH 7,4) genutzt. Es folgte die Entnahme der Gehirne, welche zunächst für weitere 24 Stunden in PFA (4 % in PBS, pH 7,4) gelegt wurden, um dann durch 30-prozentige Saccharoselösung (30 % in PBS, pH 7,4) vor Kälteschäden geschützt zu werden. Es erfolgte eine vorübergehende Lagerung auf Trockeneis bei -80°C. Die Herstellung der Gewebeschnitte für die weitere immunhistochemische Aufbereitung und Analyse erfolgte mit einem Kryomikrotom der Firma Leica Biosystems. Es wurden koronare Schnitte mit einer Dicke von 40 µm erstellt, die zunächst in einem selbst hergestellten Anti-Freeze-Medium (für 500 ml: 0,785 g NaH₂PO₄, 2,59 g Na₂HPO₄, 200 ml Aqua dest., 150 ml Glycerin, 150 ml Glycol) bei -80°C zwischengelagert wurden. Die Antikörperfärbung wurde an zwei Versuchstagen durchgeführt. Am ersten Tag erfolgte zunächst die Waschung der Hirnschnitte. Hierfür wurden diese in PBS überführt und im Anschluss für jeweils zehn Minuten in 0,5-prozentiger Tween 20 Lösung in PBS gewaschen. Um ggf. die Bindung unspezifischer Antikörper zu verhindern, folgte eine 60-minütige Inkubationsphase mit 3-prozentigem Ziegenserum in einer 0,1-prozentigen Lösung von Tween 20 in PBS. Im nächsten Schritt erfolgte die Herstellung einer Lösung mit 3-prozentigem Ziegenserum in 0,1-prozentigem Tween 20 in PBS und zusätzlich 5-prozentigem bovines Serumalbumin (BSA), welche durch einen Cellulosefilter mit 0,45 µm Porengröße gesiebt wurde. Es erfolgte die Zugabe im Rahmen einer primären Antikörperdoppelfärbung von Anti-Iba-1 und Anti-GFAP in der Konzentration 1:1000 und Verteilung auf die Proben mit Ausnahme der Negativkontrolle, die bei jeweils einem Gewebsschnitt von Mäusen aus derselben Gruppe mitlief. Nach

einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 4°C begann der zweiten Versuchstag zunächst erneut mit der Waschung für dreimal 10 Minuten in 0,5-prozentiger Tween 20 Lösung in PBS. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der sekundären Antikörper Alexa568 und Alexa647 in der Konzentration von jeweils 1:1000. Nach erneuter Waschung für jeweils dreimal 20 Minuten in PBS wurde im letzten Waschschrift zur Zellkernfärbung Hoest in der Konzentration 1:1000 zugefügt. Als letzten Schritt wurden die Gewebeproben auf Objektträgern fixiert. Zum Schutz der Proben wurde Fluoro-Gel als Eindeckmedium verwendet. Das Deckglas wurde mit Nagellack versiegelt und lichtgeschützt bei 4°C gelagert, um eine Anregung der Fluoreszenzmarker zu verhindern.

2.5.4 Darstellung der Mikroglia und Astrozyten im Motorkortex

Für die Darstellung der immunhistochemischen Hirnschnittfärbungen wurde das Fluoreszenzmikroskop LSM 510 von Zeiss verwendet. Die Aufnahmen der Mikroglia und der Dendriten erfolgte in Layer I-III des primär-motorischen Kortex. Für die Darstellung der Astrozyten wurde auch die tiefere Kortexschicht V separat aufgenommen. Zur Orientierung und Lokalisation der Zielregionen diente ein Atlas (Franklin und Paxinos, 2007). Die Bildgenerierung von Mikroglia und Dendriten erfolgte in sequenziellen Aufnahmen. Verwendet wurde ein Objektiv mit 20-facher Vergrößerung und einfacher Zoom. Die Bildgröße betrug 449,6 x 449,6 µm bei einer Pixelgröße von 0,44 µm in XY-Dimension, das Z-Intervall betrug 0,96 µm. Für die Mikroglia erfolgte die Anregung mit einer Wellenlänge von 543 nm, die Dendriten (GFP) wurde mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Unter Beachtung der Grenzen für Überbelichtung wurde die Laserenergie für jede Aufnahme gleich gewählt und die AU-Einstellungen gleich gehalten. Für die Darstellung der Astrozyten wurde ebenfalls ein Objektiv mit 20-facher Vergrößerung und eine Anregungsenergie von 633 nm verwendet. Es erfolgte eine Übersichtsaufnahme mit 0,7-fachem Zoom und einer Bildgröße von 900 x 900 µm bei einer Pixelgröße von 0,44 µm in XY-Dimension. Das Z-Intervall betrug 0,95 µm.

2.5.5 Auswertung der immunhistochemischen Bilder

Die weitere Auswertung der durch Fluoreszenzmikroskopie erstellten Bilder erfolgte mittels Fiji Is Just ImageJ (Fiji) und für die Auswertung der Mikrogliamorphologie

zusätzlich mit dem von J. Hansen zur Verfügung gestellten Fiji-Plugin MotiQ (Plescher et al., 2018).

2.5.5.1 Analyse der Astrozyten

Der zu analysierende Z-Stack wurde in Fiji geöffnet. Mit Hilfe der Bildanalysewerkzeugs „center grid on image“ wurde der Stack in vier Quadranten eingeteilt. Die Nummerierung erfolgte je nach Lokalisation im Hirnschnitt. Q1 und Q2 wurden für die oberen Kortexschichten entsprechend den Layern I-III verwendet, wobei Q1 der medialen und Q2 für den lateralen Quadranten verwendet wurde. Q3 und Q4 wurden dem entsprechend für das tiefere Layer V verwendet, wobei erneut Q3 für den medialen und Q4 für den lateralen Bildbereich verwendet wurde. Mit Hilfe der Softwareerweiterung „cell counter“ erfolgte die Zählung und morphologische Klassifikation der Zellen; zur qualitativen Auswertung erfolgte entsprechend der Zellmorphologie modifiziert nach Gellner et al. (Gellner et al., 2016) die Einteilung in vier Aktivitätsscores null bis drei, wobei null für keine und drei für den maximalen Aktivierungszustand definiert wurde (vergleiche hier Abbildung 21, Kapitel 3.4.4.2, Seite 60)

2.5.5.2 Analyse Kolokalisation Dendriten mit Mikroglia

In Fiji erfolgte für die weitere Bildbearbeitung zunächst die Trennung der beiden Kanäle in zwei separate Z-Stacks für Iba-1 (Mikroglia) und eGFP (Dendriten). Mit Hilfe der Binarisierungsgrenzwerte „Triangel“ der „Threshold-Funktion“ in Fiji wurde für beide Z-Stacks binarisierte Bilder erstellt. Diese wurden im nächsten Schritt erneut zu einem Stack mit zwei Kanälen fusioniert, welcher mit der „Stack to RGB“-Funktion von der 8bit Grauwertskala den RGB-Farbraum umgewandelt wurde. Dadurch wurden räumlich überlagerte Pixel beider Kanäle (GFP = grün, Iba1 = rot), im Sinne einer Kolokalisation für jedes Bild im Z-Stapel, durch die Farbe Gelb visualisiert. Bildebenen innerhalb des Stapels mit kompletten Dendritensegmenten von mindestens 30 µm Länge wurden jeweils als ROI ausgewählt mittels Umrandungswerkzeug und über die „Histogramm-Funktion“ von Fiji die Anzahl roter, gelber und grüner Pixel erhoben. Der Anteil gelber Pixel im Verhältnis zu grünen Pixeln (= relative Kolokalisation von Iba1- und GFP-Signal) ergab sich dann durch die folgende Formel: $\text{gelbe Pixel} / (\text{grüne Pixel} + \text{gelbe Pixel})$.

2.5.5.3 MotiQ Analyse

Die dreidimensionale Auswertung der Mikroglia erfolgte mittels Fiji-Plugin MotiQ nach Plescher et al. (Plescher et al., 2018). Hierfür wurden einzelne Zellen aus den Maximum-Z-Projektionen der Iba-1 Stacks herausgeschnitten und nach Binarisierung mit der 3D Funktion von MotiQ analysiert. Neben der von Mikroglia eingenommenen Gesamtfläche und dem von einer Zelle umspannten Areal, wurde der Ramifikationsindex als Maß für die Zellform bestimmt, wobei 1 einer runden Zelle entspricht. Je komplexer bzw. verzweigter die Zelle ist, desto größer ihr Ramifikationsindex. Des Weiteren erfolgte die quantitative Bestimmung der Zellausläufer mittels Gaußfilterung und Skelettierung durch das Fiji Plugin „Sceletonize3D“ und „Analyze Sceleton“.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte durch GraphPad Prism Version 8.0.1. Die Ergebnisse wurden als Standardfehler zum Mittelwert (SEM) angegeben. Zu Beginn des Versuchs erfolgte keine statistische Berechnung zur Festlegung auf eine bestimmte Tier- oder Zellanzahl. Als Referenzgröße dienten bereits veröffentlichte Studien zu vergleichbaren Themen bzw. Fragestellungen. Für die Validität der Daten erfolgte zu Beginn eine Testung auf Normalverteilung durch den D'Agostino-Pearson K^2 -Test. Entsprechend der Ergebnisse erfolgte bei Varianzheterogenität eine Anpassung der Freiheitsgrade. Bei fehlender Normalverteilung wurden nichtparametrische Tests verwendet. Die Varianzanalyse wurde sowohl mit einer einfachen ANOVA als auch mit einer zweifaktoriellen ANOVA (mixed model) bei Messwiederholungen durchgeführt. Bei mangelnder Sphärizität erfolgte die Anpassung der ANOVA mit wiederholter Messung mittels Greenhouse-Geisser-Korrektur. Als Post-hoc-Tests wurden der Dunnett-Test als Mehrfachvergleich zu einer Kontrollgruppe (Stressphänotypen versus Kontrolle) und der Holm-Sidak-Test für Vergleiche innerhalb der Gruppen (hier der unterschiedlichen Stressphänotypen) verwendet. Signifikanzniveaus waren $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ und $p \leq 0,001$. Erwähnte nicht signifikante Ergebnisse wurden auf die zweite Nachkommastelle gerundet. Die verwendeten statistischen Tests können dem Ergebnisteil für jeden Versuch einzeln entnommen werden.

3. Ergebnisse

Die in 3.1 und 3.2 dargestellten Ergebnisse der Verhaltensversuche sowie die 2PM-Aufnahmen wurden, wie im Material- und Methodenteil erwähnt, für diese Arbeit zur Verfügung gestellt, um sie mit den Veränderungen der Spinedynamik und Gliaveränderungen im Motorkortex zu korrelieren. Sie sind im Detail der Publikation „Stress vulnerability shapes disruption of motorcortical plasticity“ (Gellner et al., 2022) zu entnehmen. Die Ergebnisse der Verhaltensversuche in Prozentangabe wurden aufgrund der relativ kleinen Kohorten auf ganze Zahlen gerundet.

3.1 Verhaltensversuche

Nach Durchführung des CSDS mit 26 Versuchstieren ($n = 26$) zeigte die Stressgruppe entsprechend der Cut-off-Werte deutliche Verhaltensänderungen, sowohl in reduzierter Nestbauaktivität ($U = 95$, $p < 0,0001$, Mann-Whitney-U-Test), als auch in einer ausgeprägteren sozialen Vermeidung ($t(47) = 2,399$; $p = 0,021$; Student's t -Test). Bezüglich der Saccharosepräferenz konnte kein signifikanter Gruppenunterschied festgestellt werden ($U = 264$, $p = 0,493$; Mann-Whitney-U-Test). In der Stressgruppe erreichten insgesamt 14 Tiere ($n = 14$) in mindestens zwei Verhaltenstests den Cut-off-Wert für pathologisches Verhalten und wurden als stress-suszeptibel klassifiziert (54 %). Dementsprechend wurde 12 Tiere (46 %) als stress-resilient eingestuft. Aus der Kontrollgruppe mit 23 Tieren ($n = 23$) wurde drei Tiere (13 %) ausgeschlossen, da sie in mehr als einem Verhaltenstest ebenfalls Auffälligkeiten zeigten, sodass die Kontrollgruppe aus 20 Tieren ($n = 20$) bestand. Die phänotypische Einteilung zeigte sich in der wiederholten Verhaltenstestung drei Wochen nach Stressexposition als stabil. Die stress-suszeptiblen Tiere zeigten weiterhin als einzige Gruppe signifikante Verhaltensänderungen im Nestbau durch einen erniedrigten Score im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($F(2, 43) = 4,852$; $p = 0,013$; einseitige ANOVA mit Dunnett's Test als Post-hoc-Analyse). Auch die soziale Vermeidung, gezeigt durch eine reduzierte Interaktionszeit ($H(2) = 10,22$, $p = 0,006$, Kruskal-Wallis-Test mit Dunnett-Test als Post-hoc-Analyse), blieb in der stress-suszeptiblen Kohorte weiterhin auffällig. Für die stress-resilienten Tiere waren diese Unterschiede nicht nachweisbar.

3.2 Motorisches Lernen

3.2.1 Grobmotorik: Rotarod

Die Lernkurve der stress-suszeptiblen Tiere unterschied sich hier signifikant zu der Kontrollgruppe, sowohl in Bezug auf die maximal erreichte Zeit auf dem Rotarod ($F(2, 687) = 22,03$; $p < 0,0001$; einseitige ANOVA mit Dunnett-Test als Post-hoc-Analyse) als auch in Bezug auf die Lerngeschwindigkeit (Zeitpunkt, an dem ein Lernerfolg von 50 % erzielt wurde; $F(2, 687) = 10,08$; $p < 0,0001$; einseitige ANOVA mit Dunnett-Test als Post-hoc-Analyse). Die stress-suszeptible Kohorte versagte bei dieser Lernaufgabe, was sich in einer deutlich erniedrigten Zeit auf dem Rotarod von $28,02 \pm 1,63$ s im Vergleich zu $41,35 \pm 2,13$ s der Kontrolltiere ($p < 0,0001$) zeigte. Die stress-resilienten Tiere hingegen erreichten sowohl eine deutlich höhere Maximalzeit auf dem Rotarod ($49,55 \pm 2,55$ s v. $41,35 \pm 2,13$ s, $p < 0,0001$) und zeigten einen schnelleren Lerneffekt im Vergleich zu den Kontrollen ($3,09 \pm 0,61$ s v. $7,45 \pm 0,68$ s, $p < 0,0001$).

3.2.2 Feinmotorik: Reaching

Im Gegensatz zum grobmotorischem Lerntest versagten alle Stresstiere unabhängig vom Phänotyp in der feinmotorischen Lernaufgabe und konnten über die fünftägige Trainingszeit keine Verbesserung ihrer Performance erzielen (Zeit: $F(2,209, 70,70) = 3,606$, $p = 0,028$; Stress: $F(2, 32) = 5,211$, $p = 0,011$, Interaktion: $F(8, 128) = 0,762$, $p = 0,637$, ANOVA mit Messwiederholung und Dunnett-Test als Post-hoc-Analyse). Aufgrund der testspezifischen Ausschlusskriterien (s. Methodenteil) erfolgte der Test mit reduzierter Tierzahl (Kon.: $n = 15$, sus.: $n = 9$ und res.: $n = 9$).

3.3 Veränderung der strukturellen Plastizität

Im folgenden Kapitel werden anhand der phänotypischen Einordnung in stress-resilient und stress-suszeptibel die strukturellen Veränderungen in der 2PM-Mikroskopie und der Immunhistochemie beschrieben und in Bezug zu der Kontrollgruppe gesetzt. Zur Analyse der stress-assoziierten Effekte auf die strukturelle Neuroplastizität erfolgte zu insgesamt acht Zeitpunkten die 2PM-Analyse der dendritischen Spines im primären Motorkortex (1. vor Stressexposition als Baseline; 2. nach Stressexposition, 3. nach Rotarod, 4. vor Reaching, 5. nach Reaching, sowie zu drei weitere Verlaufszeitpunkte an Tag 23., 29. und 35. nach Stressexposition). Aus Tabelle 1 kann die Anzahl der pro Messung analysierten ROIs in der jeweiligen Tiergruppe entnommen werden.

Tabelle 1: Anzahl der analysierten ROIs und Tiere pro Gruppe und 2PM Einheit

Tage poststress	-10	2	5	11	17	23	29	35
Kontrolle	29/16	29/16	25/14	23/12	23/12	19/9	19/10	18/9
resilient	22/10	22/10	16/7	11/5	11/5	11/5	10/5	10/5
suszeptibel	16/10	16/10	13/8	13/8	13/8	7/6	5/4	4/3

ROI (Region of interest): Region von Interesse, 2PM: Zwei-Photonen-Mikroskop(ie)

3.3.1 Spineanalyse

3.3.1.1 Veränderung der Spinedichte

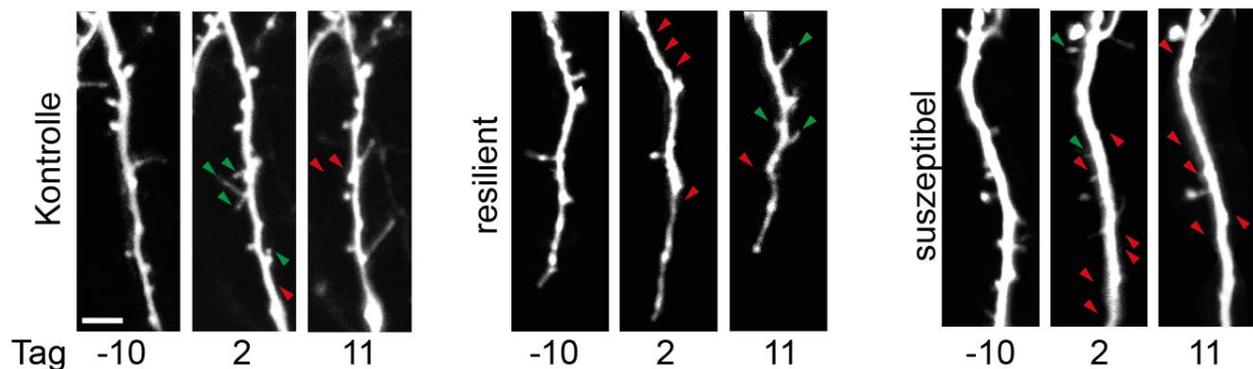


Abbildung 2: Exemplarische Darstellung der Spineveränderung zwischen drei 2PM-Einheiten in den drei Kohorten. Es wurde jeweils ein Dendrit aus den experimentellen Gruppen ausgewählt und die Spineveränderung im Verlauf an Tag 2 und Tag 11 nach Stressexposition dargestellt. Grüne Pfeile kennzeichnen neu gebildete Spines, rote zeigen Verluste an. In beiden Stressgruppen zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle ein deutlicher Verlust direkt nach Stressexposition (2. Tag), der an dem Dendriten aus einem stress-suszeptiblen Tier stärker ausgeprägt ist. An Tag 11 zeigt sich hier im Gegensatz zum Dendriten aus einem stress-resilienten Tier noch kein neugebildeter Spine. Maßstab entspricht 5 μm .

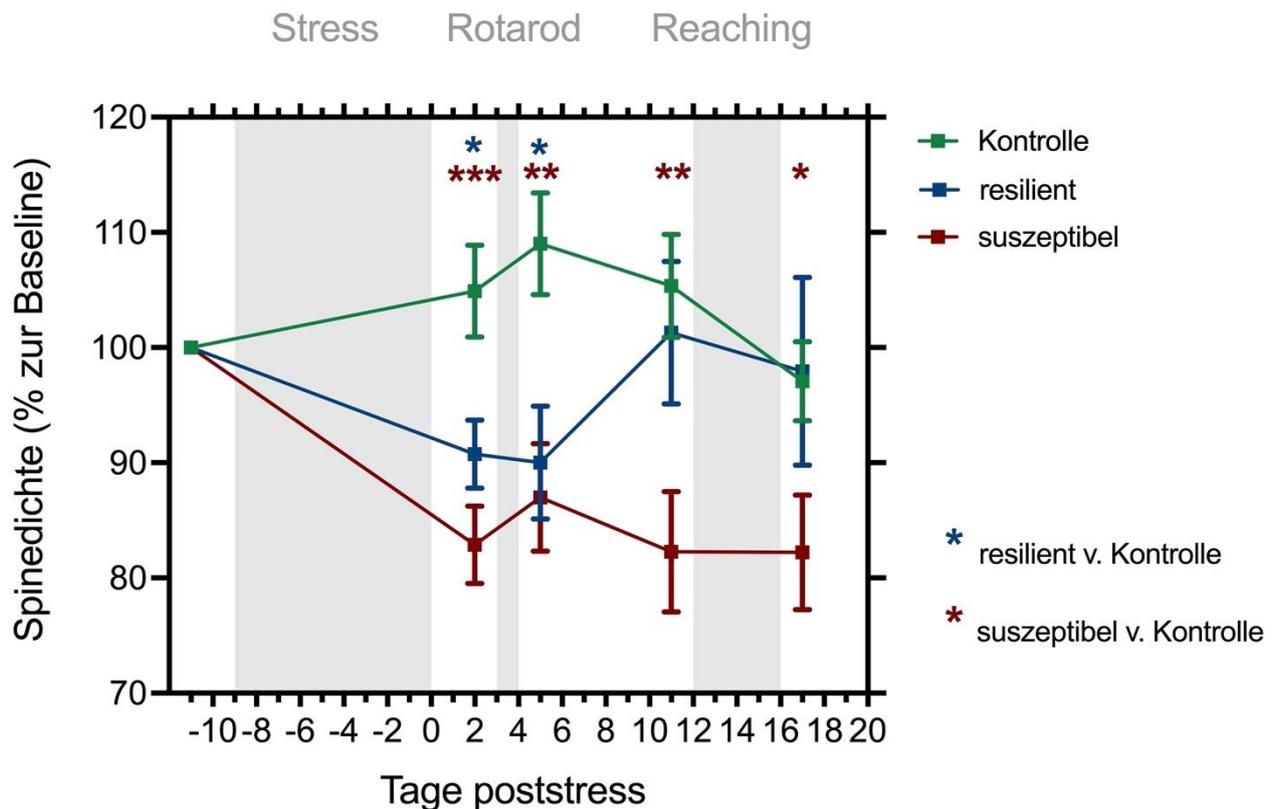


Abbildung 3: Entwicklung der Spinedichte in den drei Kohorten als Funktion der Zeit während und nach Stress. Die Stressphase dauerte von Tag -9 bis 0. Die Testungen zum motorischen Lernen erfolgte für die Grobmotorik am Rotarod an Tag 3, für die Feinmotorik im Reachingversuch an den Tagen 12 bis 16. Verglichen wurde die Veränderung der Spinedichte der stress-resilienten Gruppe bzw. der stress-suszeptiblen Gruppe in Relation zur Kontrollgruppe anhand eines gemischten Modells (mixed-effect model) mit Dunnett-Test als Post-hoc-Test; ***Signifikanzniveau 0,001, **Signifikanzniveau 0,01; *Signifikanzniveau 0,05. Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittelwerts. Die stress-suszeptiblen Tiere zeigten eine signifikant (***) niedrigere Spinedichte nach der Stressphase, sowie eine signifikante (**) Verringerungen nach dem Rotarod und vor dem Reaching-Test. Der Dichterunterschied blieb signifikant bis zur 2PM-Einheit nach dem Reaching-Test (*). Für die stress-resilienten Tieren war nur nach der Stressphase (*) und dem Rotarod-Training (*) eine signifikant niedrigere Spinedichte nachweisbar.

Die Hauptanalyse bestand aus der Veränderung der Spinedichte eines wiederholt aufgenommenen Dendritens. Es konnte gezeigt werden, dass für die allgemeine Dichteveränderung der Spines Zeit ($F(3,155, 163,3) = 3,425, p = 0,017$) und noch deutlich signifikanter Stress ($F(2, 64) = 8,324, p = 0,0006$) Faktoren für den Gruppenunterschied waren. Es bestand eine statistisch signifikante Interaktion zwischen Zeit und Stress ($F(8, 207) = 4,211, p = 0,0001$). Verwendet wurde als Varianzanalyse ein gemischtes Modell (mixed ANOVA) mit Dunnett-Test als Post-hoc-Analyse. Am zweiten Tag nach der

Stressphase zeigte die Kontrollgruppe eine Zunahme der Spinedichte um 4,9 Prozent ($104,91 \pm 3,99$ %). Hingegen konnte in den beiden anderen Tiergruppen eine deutliche Abnahme der Spinedichte beobachtet werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte die stress-suszeptible Gruppe eine signifikante Reduktion der Dichte von 22,04 Prozent ($82,87 \pm 3,37$ %, $p = 0,0003$). Diese war damit deutlich ausgeprägter als in der stress-resilienten Kohorte, welche sich um eine Dichtereduktion von 14,17 Prozent zur Kontrollgruppe unterschied ($90,74 \pm 2,95$ %, $p = 0,0123$). In der dritten 2PM-Einheit an Tag fünf poststress zeigte die Kontrollgruppe eine weitere Zunahme der Spinedichte und erreichte mit 109 Prozent zur Baseline den höchsten Wert. In den anderen beiden Gruppen lagen zu diesem Zeitpunkt weiterhin signifikante (res.: $p = 0,0133$, sus.: $p = 0,0035$) Dichtedefizite vor. Die stress-resiliente Mausgruppe zeigte jedoch im weiteren Verlauf in der Ruhephase zwischen den motorischen Lerneinheiten (5.-11.Tag) eine deutliche Erholung der Spinedichte. Bei einer Zunahme um 29 Prozent in diesem Zeitraum bestand vor dem Reaching-Test an Tag elf bereits kein signifikanter Unterschied mehr zur Kontrollgruppe ($p = 0,8273$). Die stress-suszeptible Gruppe unterschied sich sowohl vor ($p = 0,0044$) als auch nach ($p = 0,0418$) dem Reaching-Test noch signifikant von der Kontrollgruppe. Eine Dichtererholung der Spines ohne signifikanten Unterschied ($p = 0,533$) war erst in der sechsten 2PM-Einheit an Tag 23 nachweisbar (vergleiche hierzu Abbildung 2 und 3).

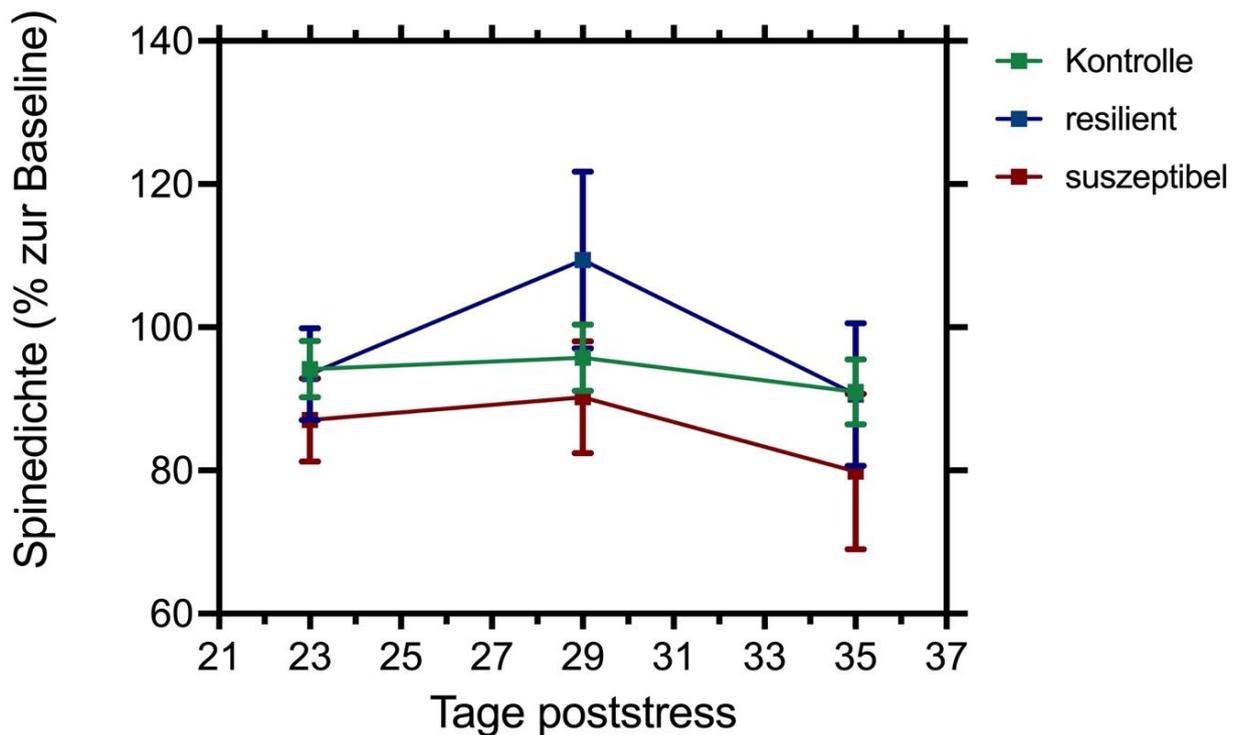


Abbildung 4: Entwicklung der Spinedichte in den drei Kohorten als Funktion der Zeit nach Stress; Langzeitverlauf. Verglichen wurde die Veränderung der Spinedichte der stress-resilienten Gruppe bzw. der stress-suszeptiblen Gruppe in Relation zur Kontrollgruppe anhand eines gemischten Modells mit Dunnett-Test als Post-hoc-Test. Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittelwerts. Mittels 2PM an den Tagen 23, 29 und 35 nach Stressexposition war kein statistisch signifikanter Gruppenunterschied mehr feststellbar. In den weiteren 2PM-Verlaufseinheiten an Tag 23, 29 und 35 nach Stressexposition ließ sich nur noch Zeit als signifikanter Einflussfaktor auf die Spinedichte nachweisen ($F(1,894, 50,20) = 3,257, p < 0,05$). Für Stress zeigte sich kein signifikanter Effekt mehr ($F(2, 32) = 0,6239, p \geq 0,05$). Auch Interaktionseffekte zwischen Stress und Zeit waren nicht mehr nachweisbar ($F(4, 53) = 0,166, p = \geq 0,05$).

Zwischen der Kontrollgruppe und der stress-suszeptiblen bzw. stress-resilienten Gruppe war kein signifikanter Dichteunterschied mehr feststellbar (vergleiche Abbildung 4). Alle drei Kohorten zeigten über den Gesamtzeitraum von 45 Tagen insgesamt eine Dichtereduktion. Für die Kontroll- und Resilienzgruppe lag diese bei knapp 10 Prozent (Kon.: 91 %, res.: 91 %), für die stress-suszeptibele Gruppe bei knapp 20 % unter der Baseline (79.85 %)

3.3.1.2 Spineverlust versus Neubildung direkt nach Stressexposition

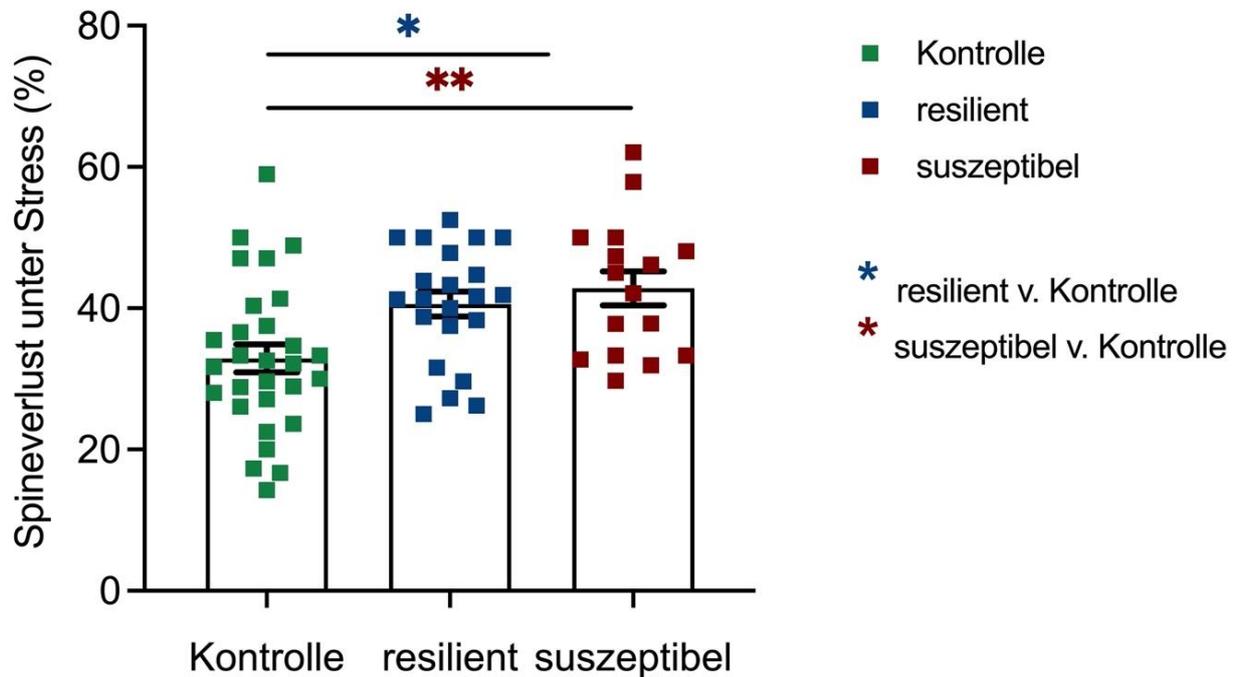


Abbildung 5: Spineverlust unter Stress für die drei Tiergruppen. Eine einseitige ANOVA zeigte einen signifikanten Gruppenunterschied ($F(2, 64) = 6,784, p = 0,002$). Dunnett-Test als Post-hoc-Test, **Signifikanzniveau 0,01, *Signifikanzniveau 0,05. Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittelwerts. Für die stress-suszeptiblen Tiere zeigt sich ein deutlich signifikanter Spineverlust ($p = 0,0032$).

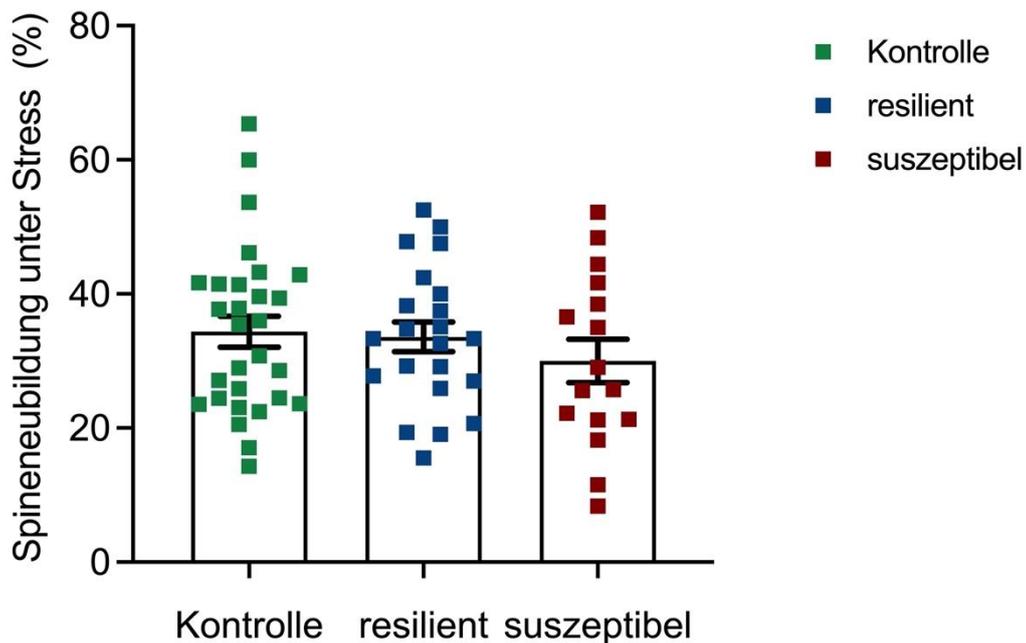


Abbildung 6: Bildung neuer Spines in den drei experimentellen Gruppen unter Stress. Eine einfache ANOVA konnte keinen Gruppeneffekt nachweisen. Fehlerbalken zeigen Standardabweichung. Der beschriebene Dichteverlust in der zweiten 2PM-Einheit an Tag zwei nach Stressexposition unterschied sich signifikant in den verschiedenen Tiergruppen ($F(2, 64) = 6,784$, $p = 0,002$). Für die stress-suszeptiblen Tiere zeige sich der Verlust am deutlichsten (sus.: $p = 0,0032$ v. res.: $p = 0,0129$).

Für die Spineneubildung konnte kein Gruppeneffekt nachgewiesen werden ($F(2, 64) = 0,767$, $p = 0,487$). Hieraus folgt, dass die Fähigkeit zur Spineneubildung in alle Kohorten unverändert vorhanden war, sodass der Dichteverlust durch einen Abbau vorhandener Spines bedingt war. Die Varianzanalyse erfolgte durch eine einfache ANOVA. Die Post-hoc-Testung wurde mittels Dunnett-Test durchgeführt (vergleiche Abbildung 6).

3.3.1.3. Spineverlust versus Spineneubildung im weiteren Verlauf

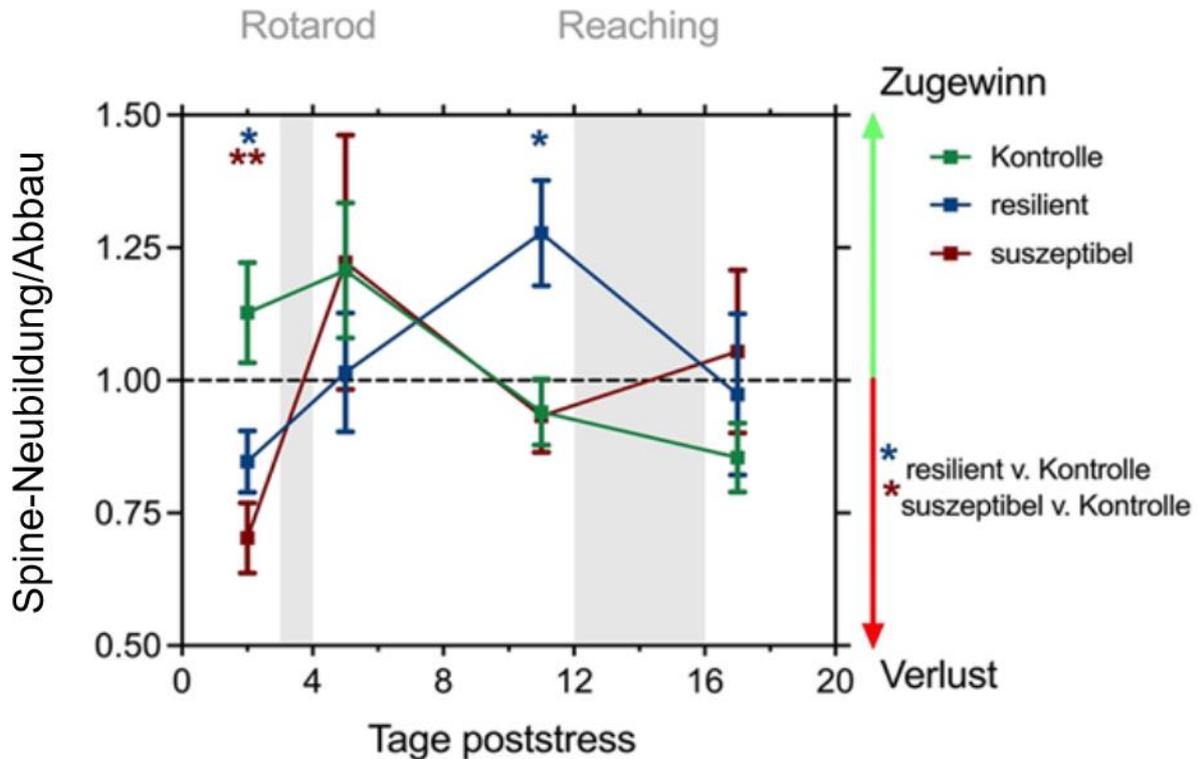


Abbildung 7: Verhältnis Neubildung zu Verlust der Spines in den drei Kohorten als Funktion der Zeit poststress. Ratio Neubildung/Abbau > 1 zeigt einen Spinezugewinn, Ratio < 1 zeigt einen Spineverlust. Die Testungen zum motorischen Lernen erfolgte für die Grobmotorik am Rotarod an Tag 3, für die Feinmotorik im Reaching-Versuch an den Tagen 12 bis 16. Mixed-Design-Analyse als Varianzmodell (mixed ANOVA) mit Dunnett-Test als Post-hoc-Test, **Signifikanzniveau 0,01; *Signifikanzniveau 0,05. Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittelwerts.

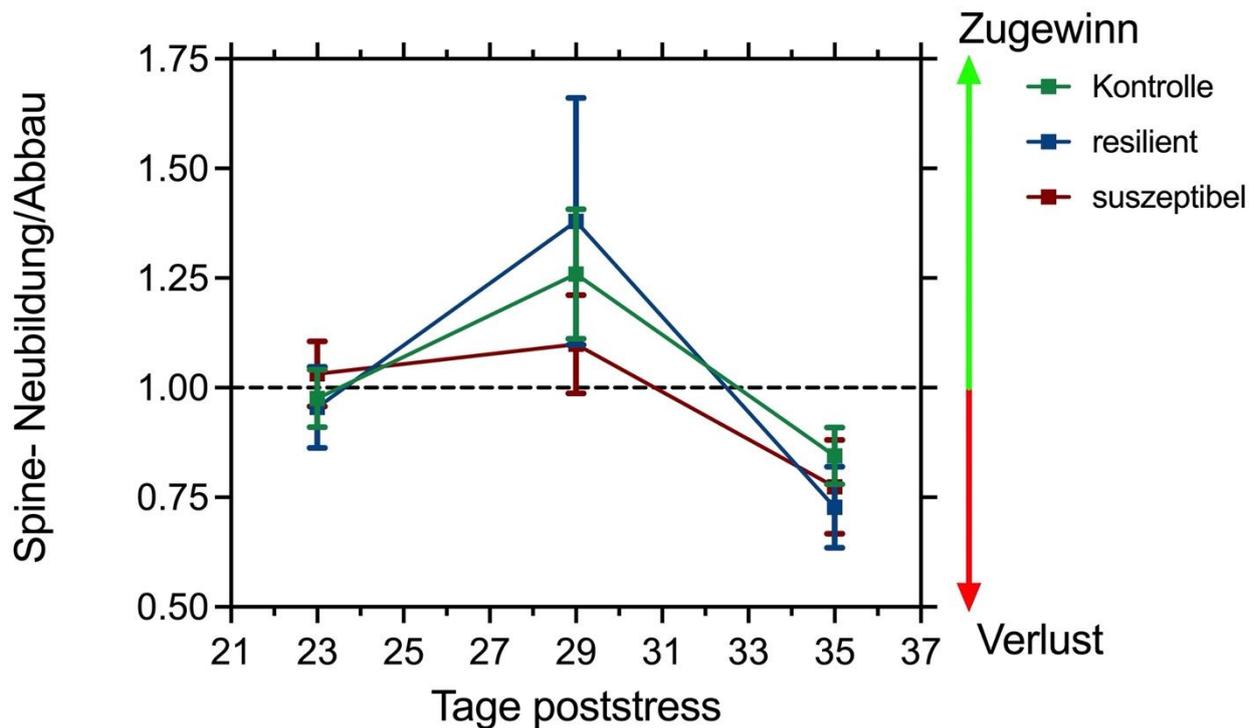


Abbildung 8: Die Grafik zeigt das Verhältnis Neubildung zu Verlust der Spines in den drei Kohorten als Funktion der Zeit poststress; Langzeitverlauf. Ratio > 1 zeigt einen Spinezugewinn, Ratio < 1 zeigt einen Spineverlust. Mixed-Design-Analyse als Varianzmodell (mixed ANOVA). Im Dunnett-Test als Post-hoc-Test konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. In den drei Tiergruppen überwog an Tag 35 ein Spineverlust. Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittelwerts.

Um die Dichteveränderungen über die motorischen Lernaufgaben besser nachvollziehen zu können, wurden das Verhältnis neugebildeter zu abgebauter Spines ermittelt. Für die Faktoren Stress und Zeit war ein signifikanter Interaktionseffekt nachweisbar ($F(6, 143) = 3,164, P \leq 0,01$). Wie aus den vorangegangenen Ergebnissen zu erwarten, zeigte sich durch den Spineverlust direkt nach der Stressphase in beiden Untersuchungsgruppen ein Unterschied durch die Verschiebung zu einem verstärkten Spineabbau (Ratio Neubildung/Verlust < 1), der für die stress-suszeptiblen Tiere, entsprechend des stärkeren Abbaus, deutlich ausgeprägter ($p = 0,0013$) im Vergleich zu der stress-resilienten Kohorte ($p = 0,0288$) war. Im weiteren Verlauf zeigte sich nur noch eine statistisch signifikante Verschiebung des Quotienten zugunsten eines Überwiegens der Spineneubildung (Ratio Neubildung/Verlust > 1) in der stress-resilienten Gruppe zwischen der dritten 2PM-Einheit nach dem Rotarod-Test und der vierten 2PM-Einheit vor dem Reaching-Test ($p = 0,0156$).

Bis auf das bereits erwähnte Überwiegen eines Spineabbaus während der Stressphase, war in der stress-suszeptiblen Gruppe in den weiteren 2PM-Einheiten bezüglich der Ratio neugebildeter zu abgebauter Spines kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mehr feststellbar. Auffallend ist in dieser Gruppe der ausgeprägte Wechsel von einem Überwiegen des Spineverlusts poststress hin zu einer deutlich stärkeren Spineneubildung nach der ersten motorischen Lerneinheit am Rotarod (poststress Ratio Neubildung/Verlust: $0,70 \pm 0,07$, nach Rotarod Ratio Neubildung/Verlust: $1,22 \pm 0,24$). Die Kontrollgruppe zeigte bis zur dritten 2PM-Einheit (nach dem Rotarod) ein Überwiegen der Spineneubildung (Ratio Neubildung/Verlust >1 ; vergleiche Abbildung 7). Für die vierte und fünfte 2PM-Einheit (vor und nach Reaching-Test), sowie den weiteren Verlaufsuntersuchungen an den Tagen 23, 29 und 35 poststress, überwog in der Kontrollgruppe ein Spineabbau (Ratio Neubildung/Verlust < 1). Auch für die stress-resiliente Kohorte war ab der fünften 2PM-Einheit, mit einem Überwiegen des Spineverlusts (Ratio Neubildung/Verlust < 1), kein statistischer Unterschied zur Kontrollgruppe mehr feststellbar. Es wurde eine Mixed-Design-Analyse als Varianzmodell (mixed ANOVA) mit Dunnett-Test als Post-hoc-Test durchgeführt (vergleiche Abbildung 8).

3.3.1.4 Stabilität ursprünglicher Spines

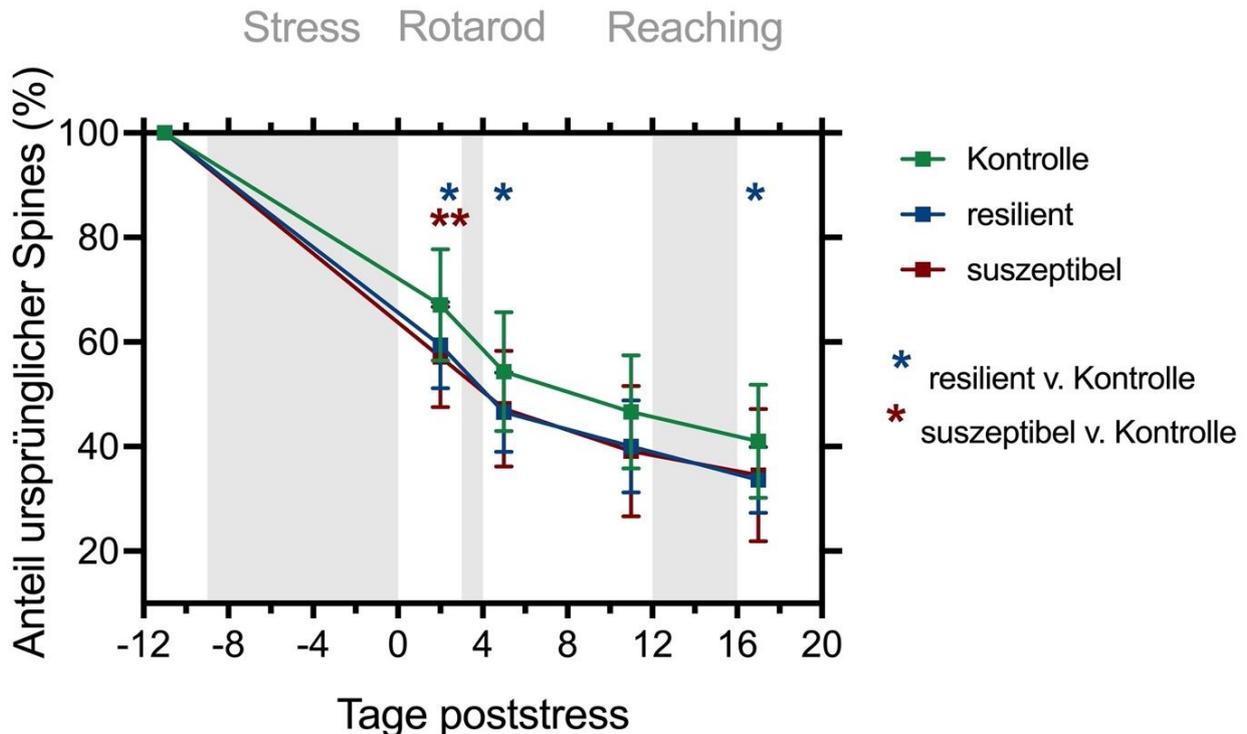


Abbildung 9: Stabilität ursprünglicher Spines als Funktion der Zeit nach Stress in den drei Tiergruppen. Die Stressphase dauerte von Tag -9 bis 0. Die Testungen zum motorischen Lernen erfolgte für die Grobmotorik am Rotarod an Tag 3, für die Feinmotorik im Reaching-Versuch an den Tagen 12 bis 16. Mixed-Design-Analyse als Varianzmodell (mixed ANOVA), Dunnett-Test als Post-hoc-Test, **Signifikanzniveau 0,01; *Signifikanzniveau 0,05. Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittelwerts.

Zur weiteren Differenzierung der Spinedynamik erfolgte zusätzlich eine Analyse der Stabilität ursprünglicher Spines für die ersten fünf Zeitpunkte. Stress war auch hier ein signifikanter Effektor ($F(2, 64) = 5,435$, $p = 0,0066$). Insbesondere zeigte sich dies in dem deutlichen Verlust ursprünglicher Spines während der Stressphase in der stress-suszeptiblen Gruppen im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0,006$). Im weiteren Verlauf konnte kein Unterschied bezüglich der Stabilität ursprünglicher Spines in dieser Kohorte gefunden werden. Die stress-resilienten Tieren reagierten auf die Stressphase mit einem weniger ausgeprägten Abbau ursprünglicher Spines ($p = 0,0109$), zeigten jedoch im Verlauf nach der 3. (nach Rotarod), sowie der 5. (nach Reaching) 2PM-Einheit einen signifikant höheren Verlust an ursprünglichen Spines ($p = 0,023$ bzw. $p = 0,0342$). Die

Varianzanalyse erfolgte anhand eines Mixed-Design-Modells (mixed ANOVA) mit Dunnett-Test als Post-hoc-Test (vergleiche Abbildung 9).

3.3.1.5 Stabilität neugebildeter Spines nach den motorischen Lerneinheiten

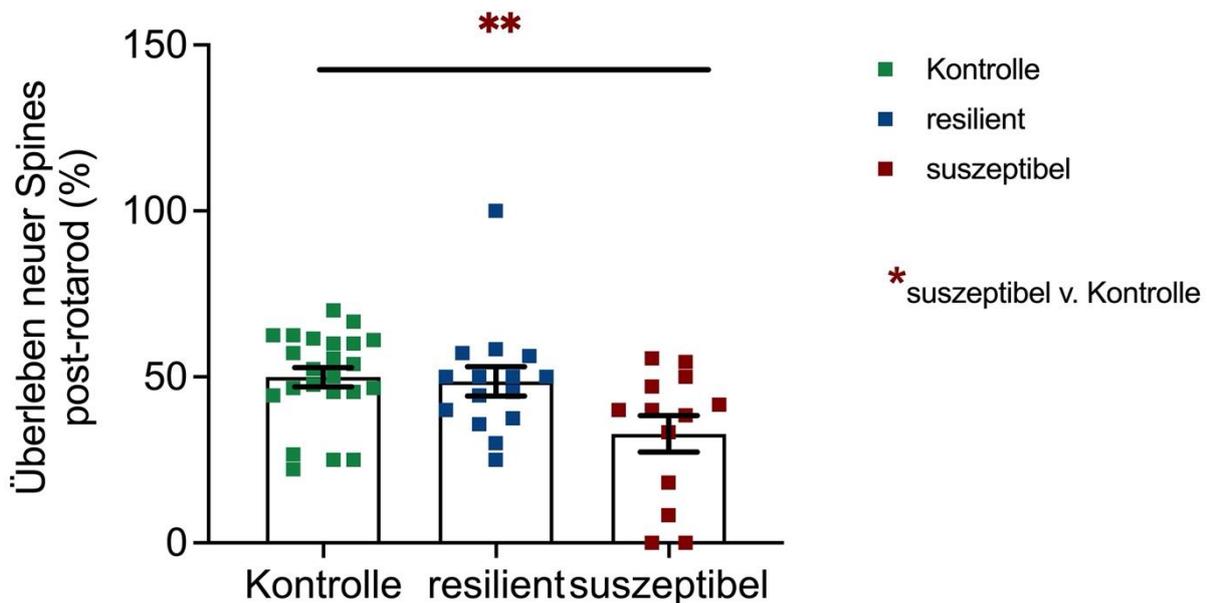


Abbildung 10: Überleben der neugebildeten Spines nach der ersten motorischen Lerneinheit Rotarod in den drei Tierkohorten. Die in der suszeptiblen Tiergruppe neu gebildeten Spines zeigte in der dritten 2PM-Einheit nach dem Rotarod eine signifikant reduzierte Überlebensdauer. Einfache ANOVA als Varianzmodell mit signifikantem Gruppenunterschied und Dunnett-Test als Post-hoc-Test, **Signifikanzniveau 0,01. Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittelwerts.

Um eine Aussage zu der Stabilität der neu gebildeten Spines unter den motorischen Lerneinheiten treffen zu können, wurde ihr prozentuales Überleben bis zum Versuchsende nachverfolgt. Eine einfache ANOVA zeigte hierfür einen signifikanten Gruppenunterschied ($F(2, 48) = 4,918, p = 0,01$). Mittels Dunnett-Test als Post-hoc-Test gelang der Nachweis, dass die in der dritten 2PM-Einheit nach dem Rotarod-Training neu gebildeten Spines in der suszeptiblen Tiergruppe deutlich instabiler waren, mit einem signifikant höherem Abbau von 17,08 Prozent ($p = 0,0087$) über den weiteren Versuch, im Vergleich zu den beiden anderen Tiergruppen (vergleiche Abbildung 10).

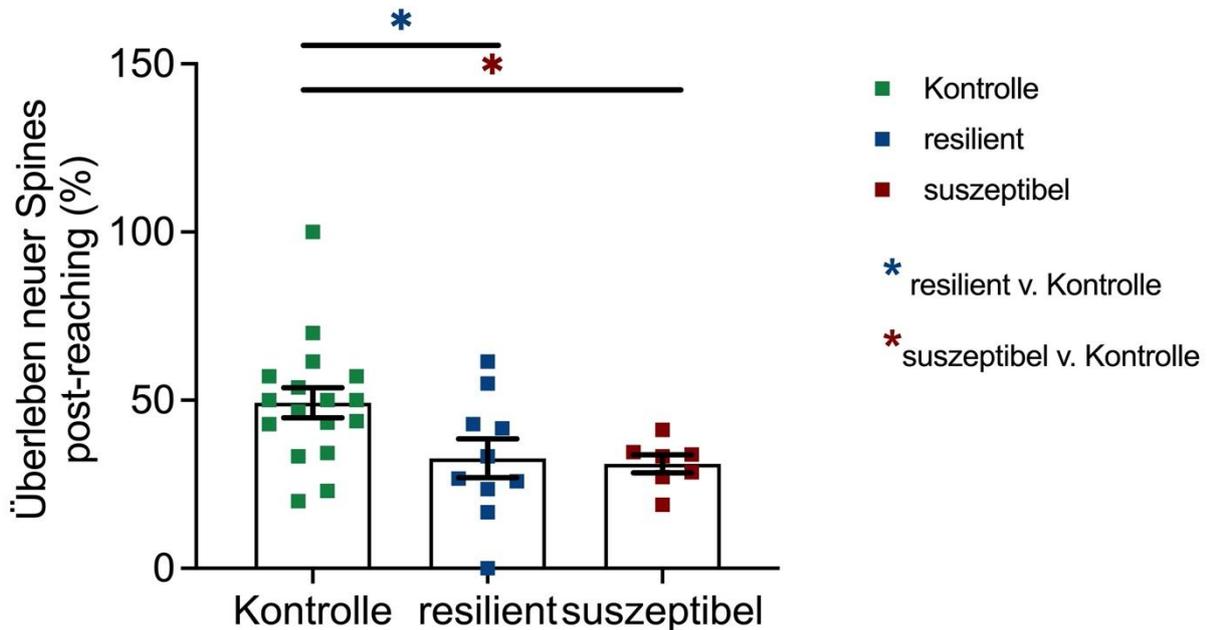


Abbildung 11: Überleben der neugebildeten Spines nach der zweiten motorischen Lerneinheit Reaching in den drei Tierkohorten. Die in beiden Stressgruppen neu gebildeten Spines zeigten in der dritten bzw. ab der fünften 5PM Einheit nach dem Reaching-Versuch eine signifikant reduzierte Überlebensdauer. Einfache ANOVA als Varianzmodell mit signifikantem Gruppenunterschied und Dunnett's-Test als Post-Hoc-Test, **Signifikanzniveau 0,01; Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittelwerts.

Nach der zweiten motorischen Lerneinheit, dem Reaching-Test, zeigte sich 17 Tage nach Stressexposition erneut in der einfachen ANOVA ein Gruppenunterschied in der der Spine Stabilität ($F(2, 31) = 4,477$, $p = 0,020$). Phänotypunabhängig zeigten mittels Dunnett-Post-hoc-Test beide Stressgruppen eine signifikant verringerte Stabilität der neu gebildeten Spines mit einem Verlust von 16,52 Prozent ($p = 0,037$) für die stress-resiliente Kohorte und 18,16 Prozent ($p = 0,042$) für die stress-suszeptible Kohorte (vergleiche Abbildung 11).

3.3.1.6 Zusammenfassung Spineanalyse

Zusammenfassend reagierten die stress-suszeptiblen Tieren auf die Stressexposition mit einem deutlich höheren Dichteverlust an Spines als die stress-resiliente Kohorte. Dieser war durch einen gesteigerten Abbau an Spines begründet. Trotz der erhaltenen Fähigkeit zur Spine Neubildung, welche nach dem ausgeprägten Verlust poststress deutlich gesteigert wurde, zeigten sich diese neu gebildeten Spines nach den motorischen

Lerneinheiten instabiler und eine Dichteerholung auf Kontrollniveau gelang erst nach 23 Tagen. Im Gegensatz hierzu zeigen die stress-resilienten Tiere nicht nur einen geringeren Dichteverlust unter Stress und eine höhere Stabilität der neugebildeten Spines, sie schafften auch durch eine gesteigerte Fähigkeit zur Spineneubildung bereits nach elf Tagen eine Erholung der Spinedichte auf Kontrollniveauhöhe. In der differenzierten Betrachtung der Spine Stabilität fiel jedoch auf, dass diese zwar nicht nach dem Rotarod, jedoch nach dem Reaching-Versuch ebenfalls reduziert war.

3.4 Immunhistochemie

Aufgrund des bereits in der Einleitung beschriebenen vielfältigen zell- und zytokinvermittelten Mechanismen und Interaktionen zur Einflussnahme auf die neuronale Plastizität und Synaptogenese erfolgte im zweiten Teil der Arbeit eine post-mortem immunhistochemische Analyse der Mikroglia und Astrozyten. Hierfür wurden die Hirne an Tag 35 entnommen und mittels Immunfluoreszenzfärbung und anschließender konfokalmikroskopischer Aufnahmen ausgewertet.

3.4.1. Mikroglia MotiQ-Auswertung

Für die Analyse der mikroglialen Zellmorphologie wurden 48 ROIs der Kontrollgruppe (11 Tiere), 45 ROIs der stress-resilienten Gruppe (9 Tiere) und 31 ROIs der stress-suszeptiblen Gruppe (6 Tiere) untersucht. Alle ROIs lagen im Layer I-III des primär motorischen Kortex.

3.4.1.1. Ausdehnung im Kortex

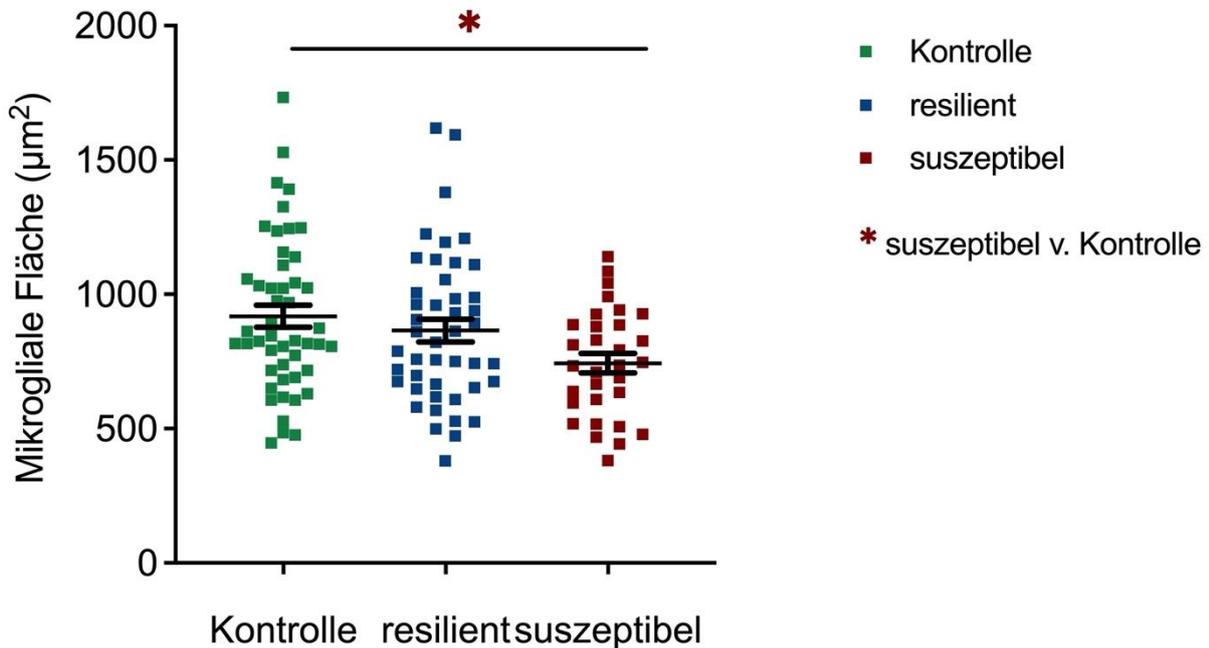


Abbildung 12: Insgesamt vorhandene mikrogliale Fläche in μm^2 pro Tier in den einzelnen Kohorten. Eine einseitige ANOVA zeigte einen signifikanten Gruppenunterschied ($F(2, 121) = 4,061$, $p = 0,020$). Holm-Sidak-Test mit signifikant kleinerer mikroglialer Fläche für die stress-suszeptiblen Tiere ($p = 0,016$) **Signifikanzniveau 0,01; *Signifikanzniveau 0,05. Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittelwerts.

Die kortikale Fläche, welche insgesamt von der Mikroglia eingenommen wurde, unterschied sich statistisch signifikant in den drei Tiergruppen ($F(2, 121) = 4,061$, $p = 0,020$). In der stress-suszeptiblen Gruppe war das Gebiet deutlich verkleinert ($p = 0,016$) im Vergleich zu der Kontrollgruppe. In der stress-resilienten Gruppe war kein Unterschied zur Kontrollgruppe nachweisbar ($p = 0,336$). Die Varianzanalyse erfolgte mit einer einseitigen ANOVA. Die Post-hoc-Analyse wurde mittels Holm-Sidak-Test durchgeführt (vergleiche Abbildung 12).

3.4.1.2 Umspannte Kortexfläche

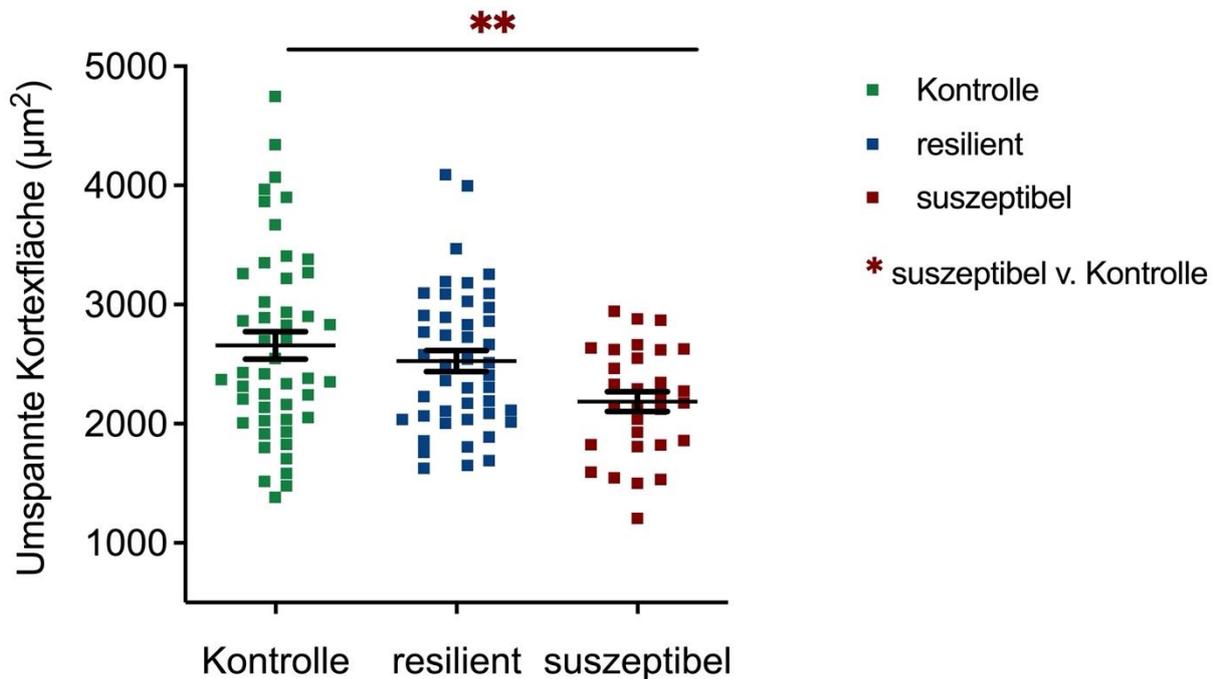


Abbildung 13. Insgesamt umspannte mikrogliale Kortexfläche in μm^2 pro Tier in den einzelnen Kohorten. Eine einseitige ANOVA zeigte einen signifikanten Gruppenunterschied ($F(2, 121) = 3,459, p = 0,035$). Holm-Sidak-Test mit signifikant kleinerer umspannter mikroglialer Kortexfläche für die stress-suszeptiblen Tiere ($p = 0,030$) **Signifikanzniveau 0,01; *Signifikanzniveau 0,05. Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittelwerts.

Für das insgesamt von der Mikroglia umspannte Kortexareal pro Tier zeigte sich ein signifikanter Gruppenunterschied ($F(2, 121) = 3,459, p = 0,035$). In der stress-suszeptiblen Kohorte lag ein signifikant ($p=0,030$) verkleinertes umspanntes Kortexareal im Vergleich zur Kontrollgruppe vor. Die stress-resilienten Tiere zeigten hier erneut keinen Unterschied. Die Varianzanalyse erfolgte mit einer einseitigen ANOVA. Die Post-hoc-Analyse wurden mit dem Holm-Sidak-Test durchgeführt (vergleiche Abbildung 13).

3.4.1.3 Zellmorphologie - Analyse der Ramifikation

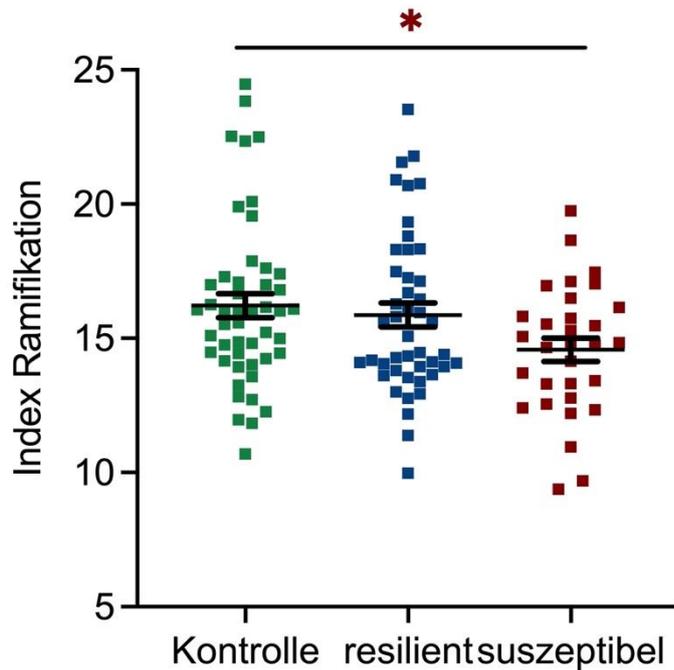


Abbildung 14: Ramifikationsindex pro Tier in den einzelnen Kohorten. Eine einseitige ANOVA zeigte einen signifikanten Gruppenunterschied. Holm-Sidak-Test mit signifikant kleinerem Ramifikationsindex für die stress-suszeptiblen Tiere ($p = 0,046$) *Signifikanzniveau 0,05. Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittelwerts.

In der weiteren morphologischen Auswertung konnte auch für den Ramifikationsindex mittels einfacher ANOVA ein Gruppenunterschied nachgewiesen werden ($F(2, 121) = 3,148$, $p = 0,047$). Im Holm-Sidak-Test zeigte sich der Index in der stress-suszeptiblen Kohorte um den Wert 1,643 verkleinert ($p = 0,046$). Die stress-resiliente Kohorte unterschied sich erneut nicht signifikant von der Kontrollgruppe (vergleiche Abbildung 14).

3.4.1.4 Zellmorphologie - Analyse Zellausläufer

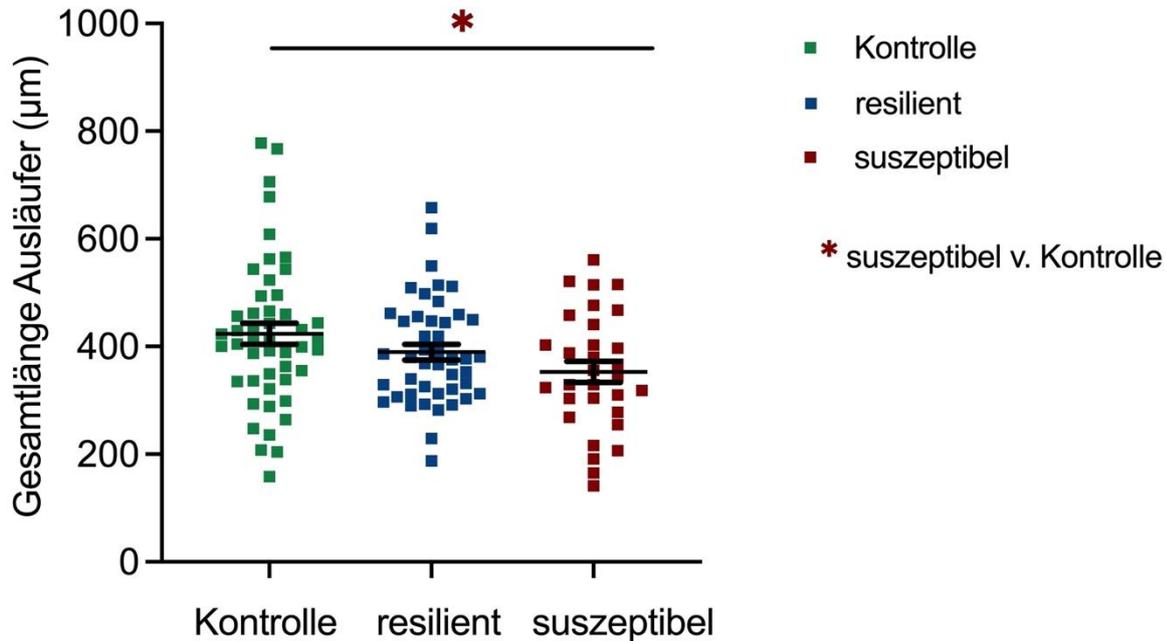


Abbildung 15: Gesamtlänge der mikroglialen Zellausläufer. Eine einseitige ANOVA zeigte einen signifikanten Gruppenunterschied. Holm-Sidak-Test mit reduzierter Gesamtlänge für die stress-suszeptiblen Tiere ($p = 0,027$). *Signifikanzniveau 0,05. Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittelwerts.

In einer einfachen ANOVA unterschied sich auch die gesamte Länge der Zellausläufer in den Gruppen ($F_{2, 121} = 3,576$, $p = 0,031$) mit einer reduzierten Gesamtlänge in den stress-suszeptiblen Tieren ($p = 0,027$) im Holm-Sidak-Test (vergleiche Abbildung 15).

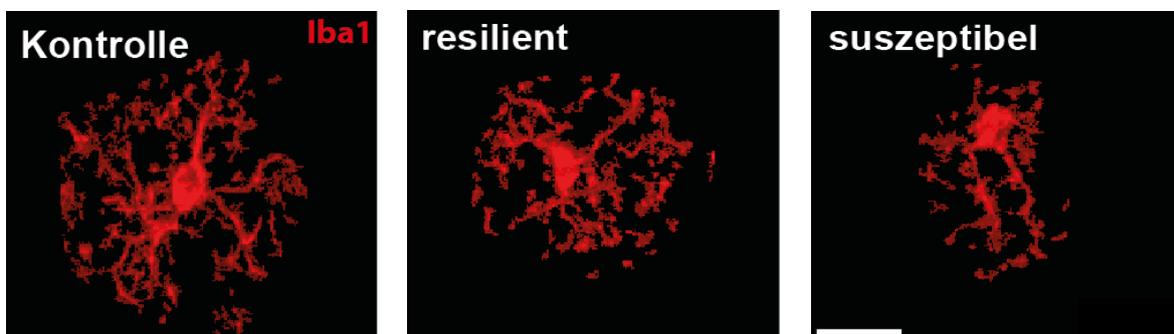


Abbildung 16: Exemplarische Darstellung jeweils einer repräsentativen Iba-1-markierten Mikrogliazelle der drei Versuchsgruppen. Die aus einem stress-suszeptiblen Tier aufgenommene Zelle zeigt, entsprechend der Analyseergebnisse, bereits mikroskopisch

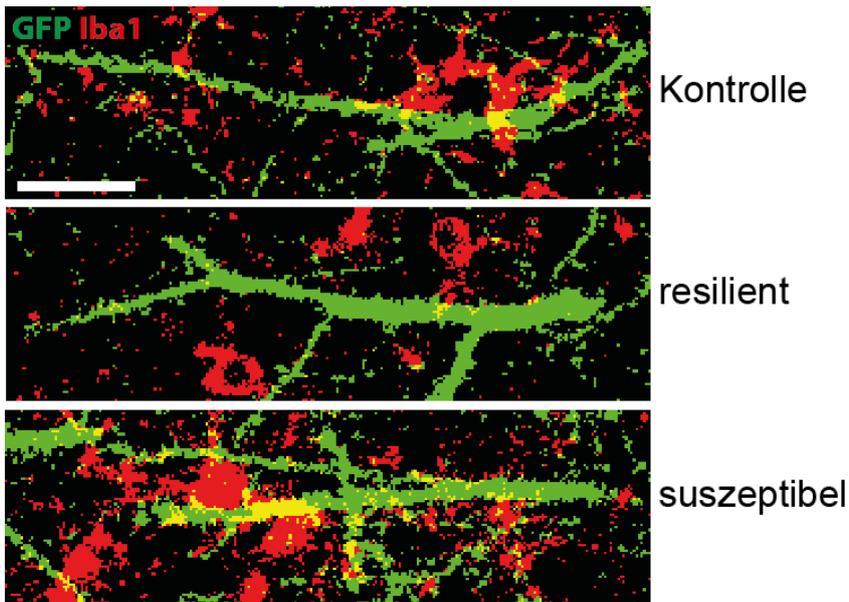


Abbildung 18: Beispielhafte Darstellung der Kolokalisation von Iba-1 markierter Mikroglia und GFP-markierten Dendriten in den drei Kohorten. Kolokalisation zeigt sich als Überlagerung der roten Iba-1-positiven Mikroglia und der grüne GFP-positiven Dendriten als gelbe Fläche, welche am ausgeprägtesten in den stress-suszeptiblen Tieren vorhanden war. Maßstab entspricht 20 μm .

Für die drei Tiergruppen konnte die Kolokalisation von Iba-1-positiver Mikroglia mit GFP-markierten Dendriten als signifikantes Unterscheidungsmerkmal aufgezeigt werden ($\chi^2 = 14,69$, $p = 0,0006$). In den stress-suszeptiblen Tieren lag eine signifikant höhere Kolokalisation von Iba-1-markierter-Mikroglia und GFP-markierten Dendriten vor ($p = 0,0463$, Dunnett-Testung). Tiere mit einem stress-resilienten Phänotyp zeigten im Vergleich zu der Kontrollgruppe in Bezug auf die Kolokalisation der Mikroglia mit Dendriten keinen Unterschied (vergleiche hierzu Abbildung 17 und 18).

3.4.3 Zusammenfassung Mikroglia

Zusammenfassend konnte für den Stressphänotyp zum einen gezeigt werden, dass die Mikroglia eine geringere Ramifikation aufwies und insgesamt morphologisch rundere Zellen mit verkürzte Zellausläufern vorlagen. Sowohl die insgesamt eingenommene Kortexfläche als auch das umspannte Kortexareal waren verkleinert. Zum anderen konnte eine erhöhte Kolokalisation von Mikroglia mit Dendriten nachgewiesen werden. Aufgrund der insgesamt jedoch verkleinerten mikroglialen Fläche kann hier eine wahrscheinlichsbedingte erhöhte Kolokalisation (bei größerer Flächenausdehnung

bestände eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine Überlappung) ausgeschlossen werden. Für die stress-resiliente Kohorte waren im Vergleich zur Kontrolle, sowohl in Bezug auf die mikrogliale Gesamtfläche, als auch auf das umspannte Kortexareal und die Kolokalisation, keine statistischen Unterschiede nachweisbar.

3.4.4 Astrozyten

Analysiert wurden 26 ROIs in der Kontrollgruppe (13 Tiere), 18 in der stress-resilienten (9 Tiere) und 14 in der stress-suszeptiblen Gruppe (7 Tiere).

3.4.4.1 Quantitative Analyse

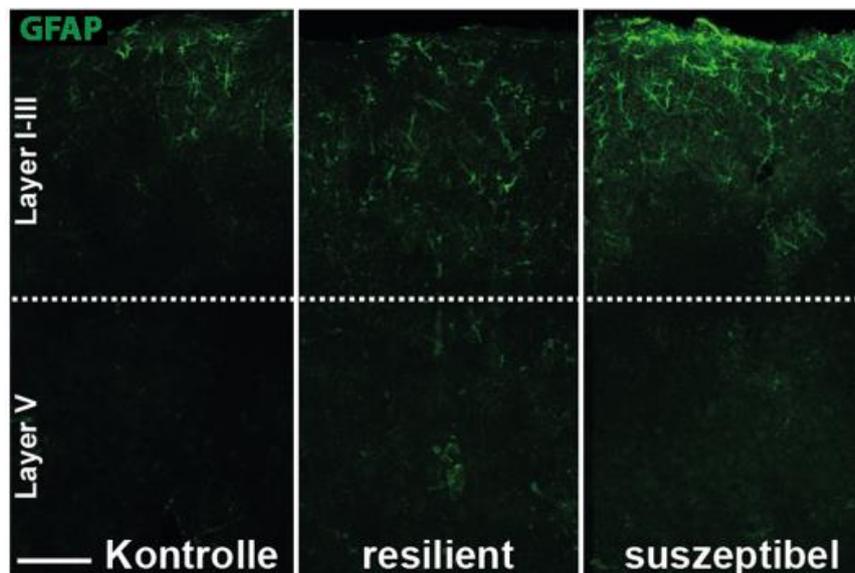


Abbildung 19: Vergleich zweier fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen von GFAP-markierten Astrozyten im primären motorischen Kortex. Beispielhaft zeigt die Abbildung den Unterschied zwischen der deutlich stärkeren Intensität von GFAP im Stresstier (rechts) im Vergleich zu einem Kontrolltier (links) in den oberen Kortexschichten Layer I-III (oberer Abbildungsteil). Maßstab entspricht 200 µm.

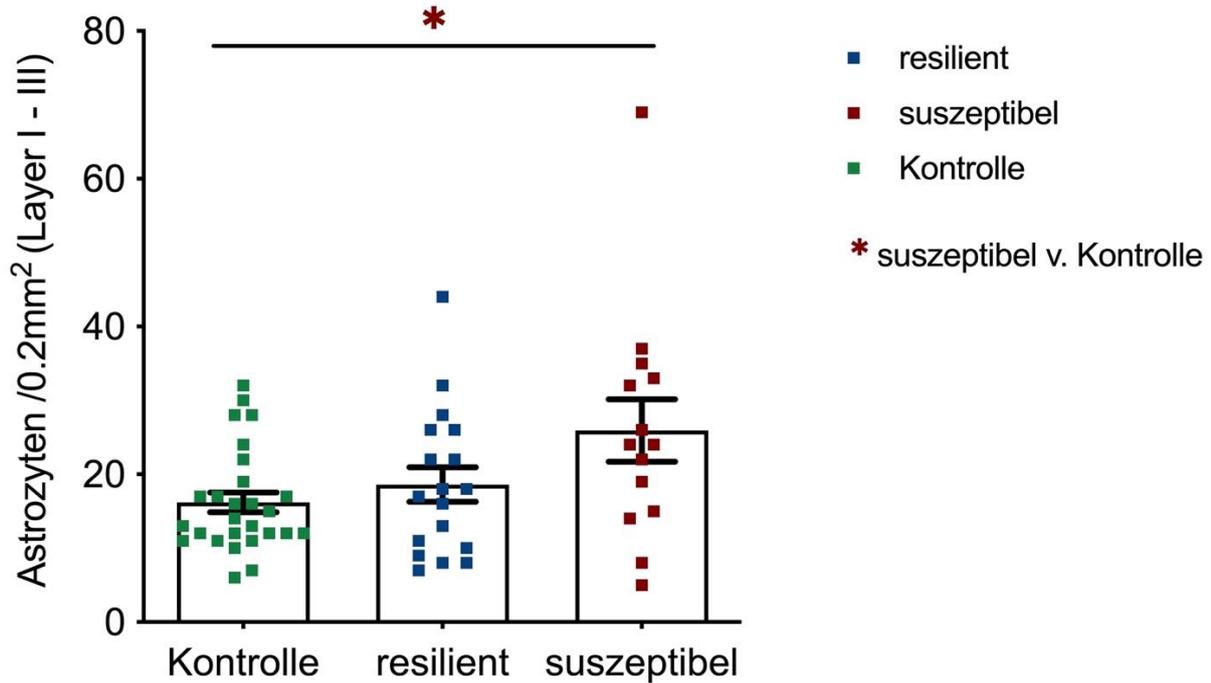


Abbildung 20: Anzahl GFAP-markierter Astrozyten pro 0.2 mm² pro Tier in den drei Kohorten für die Kortexschichten I-III. Eine einfache ANOVA zeigte einen signifikanten Gruppenunterschied ($F(2, 56) = 4,028, p = 0,0232$). Post-hoc-Analyse mittels Holm-Sidak-Test zeigte signifikant mehr Astrozyten/mm² in den stress-suszeptiblen Tieren ($p = 0,0197$); *Signifikanzniveau 0,05. Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittelwerts.

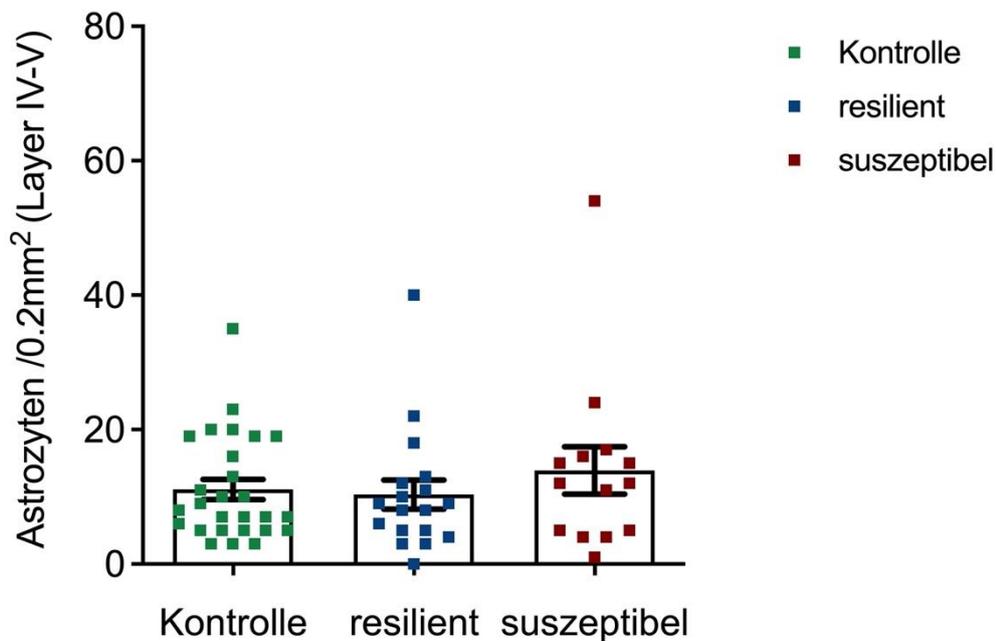


Abbildung 21: Anzahl GFAP-markierter Astrozyten pro 0.2 mm² pro Tier in den drei Kohorten für die Kortexschichten IV-V. Eine einfache ANOVA konnte keinen signifikanten Gruppenunterschied ($F(2, 53) = 0,5648, p = 0,5718$) zeigen.

Für die Verteilung der GFAP-markierten Astrozyten konnte für die oberen Kortexschichten (Layer I-III) ein signifikanter Gruppenunterschied festgestellt werden. ($F(2, 56) = 4,028$, $p = 0,0232$). In den unteren Kortexschichten war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar ($F(2, 53) = 0,5648$, $p = 0,5718$). Bei den stress-suszeptiblen Tieren zeigten sich in den oberen Schichten des primären Motorkortex (Layer I-III) signifikant mehr GFAP-positive Astrozyten als in der Kontrollgruppe ($p = 0,0197$). Für die stress-resiliente Gruppe war hier keine signifikante Abweichung ($p = 0,4502$) nachweisbar (vergleiche Abbildung 19 und 20). In den tieferen Kortexschichten (Layer IV-V) konnte in Bezug auf die Anzahl der Astrozyten kein Unterschied mehr zwischen den drei Tiergruppen detektiert werden. Sowohl bei den stress-suszeptiblen, als auch bei den stress-resilienten Tieren und der Kontrollgruppe nahm die Anzahl der Astrozyten in den tieferen Zellschichten IV-V ab (vergleiche Abbildung 19 und 21).

3.4.4.2 Qualitative Analyse

Für die qualitative Analyse erfolgte die Einteilung der Astrozyten gemäß ihrer Morphologie in die Aktivitätsscores 0-3 modifiziert nach Gellner et al. (Gellner et al., 2016).

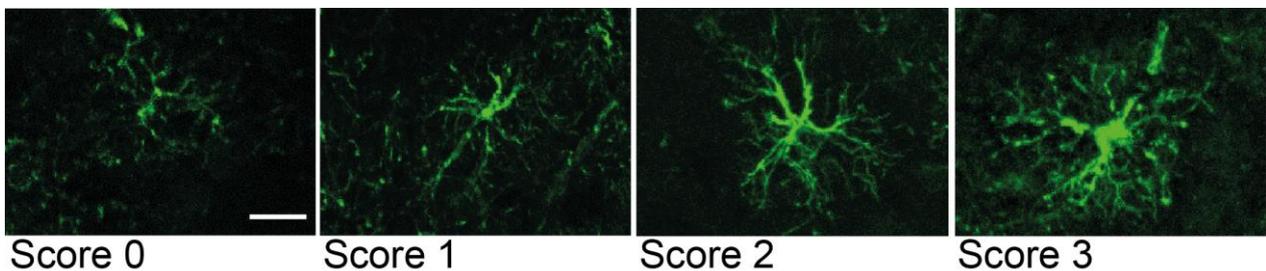


Abbildung 22: Morphologische Einteilung der Astrozyten in die vier Aktivitätsscores. Die Abbildung zeigt beispielhaft vier fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GFAP-markierten Astrozyten, die anhand ihrer Morphologie (dicke Zellkörper und Ausprägung Zellfortsätze) in vier Aktivitätszustände (Score 0-3) eingeteilt wurden. Je prominenter der Zellkörper und je verzweigter und dicker die Zytoplasmfortsätze, desto höher der Aktivitätsscore.

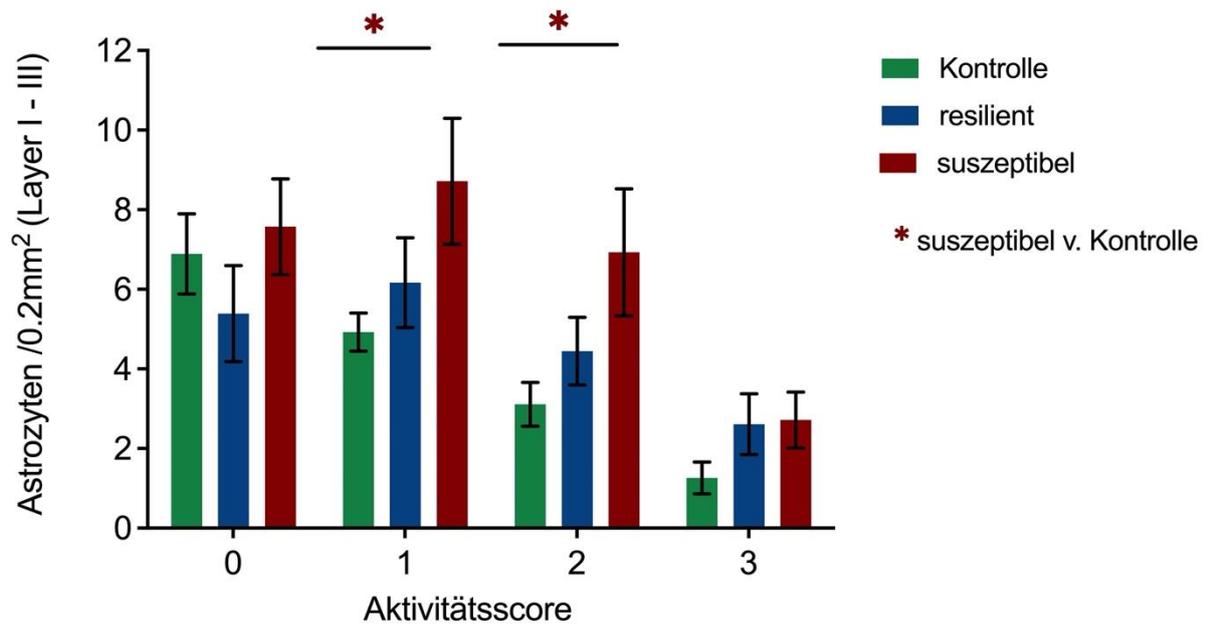


Abbildung 23: Morphologische Einteilung der Astrozyten in die Aktivitätsscores 0-3 in den drei Kohorten für die Kortexschichten I-III. Eine zweiseitige ANOVA zeigte einen signifikanten Gruppenunterschied für Stress in Bezug auf die Astrozytenaktivität (Stress: $F(2, 220) = 6,500$, $p = 0,02$, Aktivitätsscore: $F(3, 220) = 14,30$ $p < 0,0001$, Interaktion: $F(6, 220) = 1,140$, $p = 0,340$). Holm-Sidak-Test als post-hoc-Analyse zeigte signifikant mehr Astrozyten mit Aktivitätsscore 1 und 2 für die stress-suszeptiblen Tiere (Aktivitätsscore 1: $p = 0,0152$, Aktivitätsscore 2: $p = 0,0143$); *Signifikanzniveau 0,05. Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittelwerts.

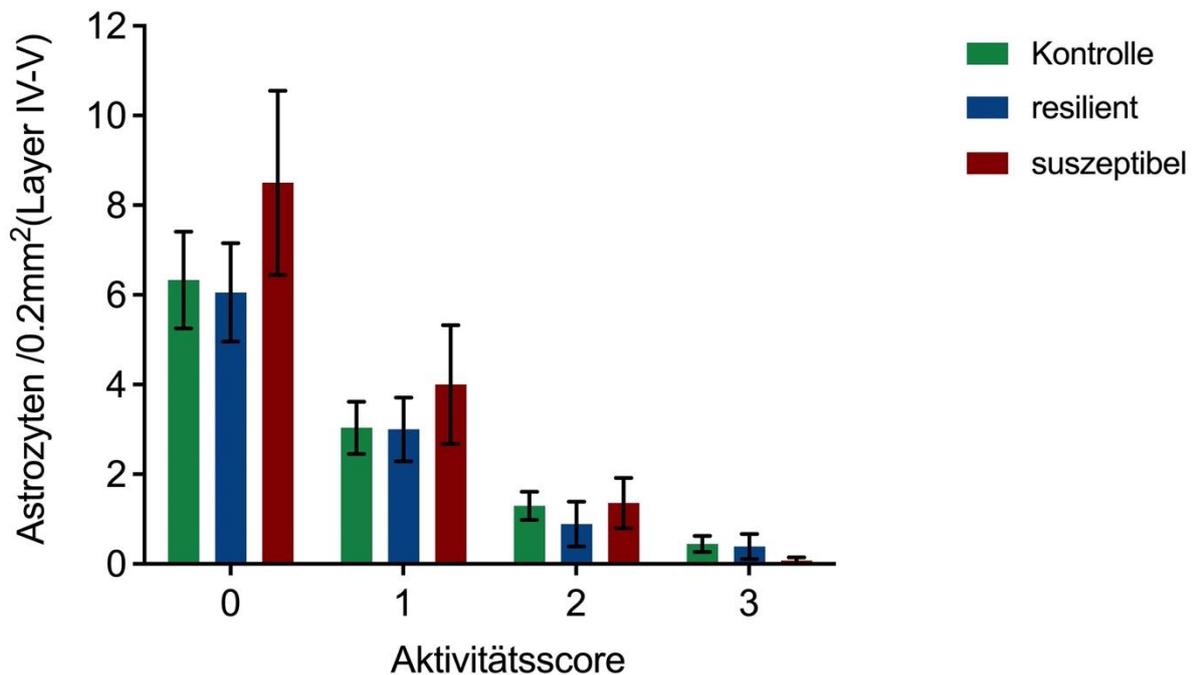


Abbildung 24: Die Grafik zeigt die morphologische Einteilung der Astrozyten in die Aktivitätsscores 0-3 in den drei Kohorten für die Kortexschichten IV-V. In einer zweiseitige ANOVA ließ sich für Stress kein Gruppenunterschied bezüglich der Aktivität der Astrozyten nachweisen (Stress: $F(2, 220) = 0,999$, $p = 0,370$, Aktivitätsscore: $F(3, 220) = 36,78$, $p < 0,0001$, Interaktion: $F(6, 220) = 0,509$, $p = 0,801$). Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittelwerts.

Bezüglich der Morphologie konnten in den oberen Kortexschichten bei den stress-suszeptiblen Tieren mehr Astrozyten mit einem prominenten Zellkörper und dicken, verzweigten Ausläufern, im Vergleich zur Kontrollgruppe, nachgewiesen werden (vergleiche Abbildung 22). Entsprechend der Einteilung des Aktivitätsscores 0-3 zeigten die stress-suszeptiblen Tiere mehr Astrozyten des Aktivitätsscores 1 ($p = 0,0152$) und 2 ($p = 0,0143$). Bei den Aktivitätsscores 0 und 3 ließen sich in den oberen Schichten keine Unterschiede zwischen den stress-suszeptiblen, den stress-resilienten und der Kontrollgruppe feststellen (vergleiche Abbildung 23). In den unteren Kortexschichten IV-V lagen bei allen drei Kohorten die meisten Astrozyten in einem inaktiven Zustand entsprechend eines Aktivitätsscores 0 vor. Die Anzahl nahm mit steigendem Aktivitätslevel in allen drei Gruppen gleichmäßig ab. Entsprechend konnten für alle drei Tiergruppen die wenigsten Astrozyten im höchsten Aktivitätsscore 3 nachgewiesen werden (vergleiche Abbildung 24).

3.4.4.3 Zusammenfassung Astrozyten

Zusammenfassend konnten in den oberen Layer I-III des primären motorischen Kortex, indem die untersuchten dendritischen Spines liegen, bei den stress-suszeptiblen Tieren ein quantitativer Unterschied im Sinne einer höheren Anzahl an Astrozyten detektiert werden. Diese zeigten darüber hinaus zusätzlich einen höheren Aktivierungsgrad, der im mittleren Bereich (Score 1-2) lag. Sowohl quantitativ als auch qualitativ lassen sich in den unteren Zellschichten des primären Motorkortex (IV-V), wo die Zellsomata der Pyramidenzellen zu finden sind, keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen feststellen.

4. Diskussion

4.1 Veränderung der strukturellen Neuroplastizität unter Stress

Um eine Aussage zur Validität des Versuchs und der erhobenen Daten treffen zu können, werden zunächst die Veränderungen der Kontrollgruppe betrachtet. Diese zeigte im ersten Teil des Versuchs bis zur dritten 2PM-Einheit (post-rotarod) eine Dichtezunahme bedingt durch eine gesteigerte Spineneubildung. Zu Beginn des Versuchs ist diese erklärbar durch eine neue physische und soziale Umgebungssituation für die Tiere, die hierdurch vielfältigen neuen sensorischen Stimuli ausgesetzt sind. Für den sensomotorischen Kortex konnte gezeigt werden, dass hierdurch Synaptogeneseprozesse durch eine gesteigerte Spineneubildung und Gesamtdichtezunahme ausgelöst werden (Jung und Herms, 2014). Der Versuch zeigt, dass dies auch für den primär-motorischen Kortex zutrifft. Die weitere Spineentwicklung mit einer weiteren Zunahme nach der grobmotorischen Lerneinheit am Rotarod, anschließendem Dichteverlust durch einen gesteigerten Spineabbau (Tag 11 bis 17) und Stabilisierung auf einer zum Ausgangsniveau erniedrigten Spinedichte entspricht den Ergebnissen anderer Arbeiten (Xu et al., 2009; Zuo et al., 2005) und zeigt die Validität der Versuchsanordnung.

Beide Stressgruppen reagierten auf den CSDS-Test mit einer Dichteabnahme an dendritischen Spines. Diese Reaktion auf Stress konnte zuvor schon für den präfrontalen Kortex (Penzes et al., 2011; Shu und Xu, 2017) und den Hippocampus (Penzes et al., 2011) gezeigt werden. Die anschließende Phase mit langsamerer, aber stabilerer Spineneubildung wird als Reorganisation neuronaler Schaltkreise mit einhergehender Gedächtniskonsolidierung verstanden. Auf der Verhaltensebene ist dieser Prozess mit anhaltenden depressiven Änderungen assoziiert (Shu und Xu, 2017), wie sie die stress-suszeptible Kohorte noch drei Wochen nach Stressexposition, bei weiterhin bestehender sozialer Vermeidungsreaktion, zeigte. Im Motorkortex konnte gezeigt werden, dass durch CSDS zunächst eine ähnliche Reaktion ausgelöst wird, sodass die Dichteabnahme als Ausdruck synaptischer Plastizität im Sinne einer neuronalen Neuorganisation verstanden werden kann. Stress-resiliente Tiere scheinen hier entsprechend ihres Phänotyps auch auf neuronaler Ebene aufgrund des geringeren Spineverlustes weniger vulnerable gegenüber Stressoren zu sein. Alle drei Kohorten zeigten einen Tag nach dem Rotarod-Training zunächst eine deutliche Zunahme an neu gebildeten dendritischen Spines,

sodass die Fähigkeit zur Neuformation als Grundbedingung für motorisches Lernen (Xu et al., 2009) in allen Tiergruppen unabhängig vom Stressphänotyp vorhanden war. Auffallend ist, dass die stress-suszeptiblen Tiere trotz der Fähigkeit zur Spineneubildung mit anschließender Elimination (Tag 5 bis 11 poststress) und damit ähnlicher Entwicklung wie die Kontrollgruppe erst im grobmotorischen Lernen am Rotarod versagten und dann auf die zweite feinmotorische Lernaufgabe, statt mit einer Spineelimination, wie die anderen beiden Gruppen, mit einer über die gesamte Trainingseinheit andauernden (zwischen Tag 11 und 17 poststress) Spineneubildung reagierten. Durch die nachgewiesene Instabilität dieser neugebildeten Spines konnten jedoch keine stabilen Synapsen gebildet werden, sodass keine Netzwerkkonsolidierung im Sinne eines „Rewiring“ erfolgte. Dies zeigte sich in einem grob- und feinmotorischem Lernversagen. Es überrascht, dass die stress-resiliente Kohorte in der grobmotorischen Lernaufgabe am Rotarod eine deutlich bessere motorische Performance im Vergleich zu der Kontrollgruppe zeigte, im Anschluss jedoch trotz Erholung der Spinedichte und anschließender Spineeliminierung, ähnlich der Kontrollgruppe in der feinmotorischen Trainingseinheit, keinen Lernerfolg erzielen konnte. Die hier neu gebildeten Spines zeigten ebenfalls eine höhere Instabilität, sodass auch hier eine fehlerhafte Synaptogenese mit ausbleibender Netzwerkkonsolidierung konstatiert werden kann. Zusammenfassend konnte in beiden Stressgruppen eine tiefgreifende neuronale Netzwerkstörung festgestellt werden. Bei gegebener Fähigkeit zur Spineneubildung scheint es innerhalb des Selektionsprozesses, der notwendig ist, um neu gebildete Spines zu stabilen funktionsfähigen Synapsen reifen zu lassen (Xu et al., 2009), zu Fehlern zu kommen. Hierdurch können sich keine neuen funktionalen neuronalen Schaltkreise zur Lernkonsolidierung bilden, was zu einem Versagen in der feinmotorischen Lernaufgabe führt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Fähigkeit zu einer deutlichen Steigerung der Spineneubildung ein wesentlicher Unterschied zwischen Stresssuszeptibilität und Stressresilienz ist.

4.2 Stressinduzierte Veränderungen der Mikroglia

Die in der stress-suszeptiblen Gruppe nachgewiesenen morphologischen Veränderungen der Mikroglia, wie das kleinere umspannte Kortexareal, die reduzierte flächenhafte Ausdehnung sowie eine weniger verzweigte Zellform, sind Marker für einen höheren

Aktivierungsgrad der Mikroglia. Mehrfach konnten diese Gestaltänderungen im Rahmen einer Hochregulation von Iba-1 markierter Mikroglia in Stressmodellen gezeigt werden (Hinwood et al., 2012; Kopp et al., 2013; Tynan et al., 2010), welche im Sinne einer Aktivierung verstanden wurde. Morphologisch zeigten sich verdickte Zellkörper mit kürzeren und weniger verzweigten Ausläufern, die so ein kleineres Kortexgebiet umspannten (Kopp et al., 2013; Tynan et al., 2010). Da aktivierte Mikroglia ihre proximale Umgebung deutlich häufiger absuchen (Iida et al., 2019), geht die im Versuch nachgewiesene reduzierte kortikale Ausbreitung mit einer höheren Mikroglia-Dendrit-Kolokalisation einher, was zu einem höheren Spineverlust in direkter Nähe der Mikrogliazelle führt (Iida et al., 2019). Dies konnte in den stress-suszeptiblen Tieren gezeigt werden, welche besonders direkt nach der initialen Stressphase mit einer deutlichen Abnahme dendritischer Spines reagierten. Da die immunhistologischen Untersuchungen jedoch erst fünf Wochen nach Stressexposition durchgeführt werden konnten, kann aufgrund der zeitlichen Diskrepanz zwischen akutem Spineverlust und nur langsamer Erholung auf das Ausgangsniveau in den stress-suszeptiblen Tieren kein direkter Kausalschluss gezogen werden. Wie bereits erwähnt, wurde die These, dass eine Mikrogliaaktivierung mit einer Verringerung der Zellausläufer einhergeht, durch gegenteilige Befunde (Hinwood et al., 2013; Walker et al., 2013) kontrovers diskutiert. Unter der Annahme, dass unterschiedliche Stressparadigmen zu divergierender Mikrogliaamorphologie führen, konnte jedoch dasselbe Verhalten von Wohleb et al. (2011) unter CSDS nachgewiesen werden. Mikroglia der Amygdala und des präfrontalen Kortex zeigten eine Verkürzung der Zellausläufer, was mit einer Zunahme depressiv-ängstlichem Verhalten korrelierte (Wohleb et al., 2011). Bei den hier zitierten mikroglialen Veränderungen handelt es sich um Kurzzeiteffekte, die morphologischen Analysen erfolgten unmittelbar bis maximal eine Woche nach Stressexposition. Zu Langzeiteffekten ist bisher nur wenig bekannt, die Ergebnisse decken sich jedoch mit dieser Arbeit. Rodriguez-Arias et al. (2018) konnten noch neun Wochen nach CSDS in juvenilen Mäusen ähnliche morphologische mikroglialen Veränderungen nachweisen und postulierten erstmals bislang unterschätzte Langzeiteffekte. Aufgrund des bereits erwähnten zeitlichen Abstands zwischen den einzelnen 2PM-Einheiten und der immunhistochemischen Auswertung von bis zu fünf Wochen, konnte mit dieser Arbeit ebenfalls ein chronischer Stresseffekt auf die Mikroglia nachgewiesen werden, sodass,

entsprechend der Annahme von Rodriguez-Arias et al. (2018), es zu deutlich unterschätzten Langzeitfolgen auch in adulten Tieren zu kommen scheint. Die stress-resilienten Tiere zeigten keinen Hinweis auf eine mikrogliale Aktivitätsänderung. Ob diese jedoch zu einem früheren Zeitpunkt z. B. direkt nach Stressexposition vorlagen, bleibt offen. Die zeitliche Diskrepanz, durch die Korrelationen zwischen den erhobenen Spinedaten und der Immunhistochemie nur bedingt möglich sind, wird im Folgenden für die Diskussion der Astrozytenergebnisse nochmals aufgenommen.

4.3 Stressinduzierte Form- und Funktionsänderung der Astrozyten

Entgegen der bislang beschriebenen Astrozytenabnahme bzw. Astrozytenatrophie im Depressionsmodell (Bernard et al., 2011; Cobb et al., 2013; Cotter et al., 2001; Torres-Platas et al., 2016; Tynan et al., 2013) konnte gezeigt werden, dass es im Motorkortex unter chronischem sozialem Stress zu einer Astrozytenaktivierung mit deutlicher Zunahme GFAP-positiver Zellen kommt. Diese Reaktion der Astrozyten mit deutlicher Zunahme der Intermediärfilamenten, insbesondere von GFAP, zeigt sich sonst als Antwort auf akute Zellschäden im ZNS wie z. B. nach einem Trauma, Schlaganfall oder einer Infektion (Bushong et al., 2002, 2004). Durch biochemische Veränderungen des geschädigten Gewebes werden unter anderem durch Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen Astrozyten aktiviert, welche eine Vielzahl von eigenen Botenstoffsystemen wie Transforming Growth Factor (TGF- β), Tumornekrosefaktor (TNF- α), Interferon gamma (IFN- γ) und Interleukinen (IL-1 und IL-6) ausschütten (Kang und Hébert, 2011). Die dadurch induzierte neuroinflammatorische Reaktion mit Einwanderung von Glia-Vorläuferzellen, Makrophagen, Fibroblasten und die Einnahme einer dichten, sternförmigen Formation der Astrozyten dient zum Schutz des restlichen noch intakten ZNS-Gewebes. Trotz dieser protektiven Rolle verhindert die so entstandene physische und chemische Barriere weitgehend eine axonale Regeneration mit der Konsequenz, dass Glianarben nach ZNS-Schädigung zu bleibenden funktionalen Defiziten führen können. Astrogliose lässt sich bereits wenige Stunden nach ZNS-Schädigung nachweisen und ist je nach Ausmaß der Schädigung über mehrere Wochen zunehmend (Sharma et al., 2015). Die durch uns gezeigte Astrozytenzunahme pro mm^2 ist eines der Kriterien, welche für die Klassifizierung der Schwere bei Astrogliose dient. Bei der milden bis moderaten Zellreaktion finden sich astrogliale Hypertrophien des Zellkörpers und der Ausläufer, jedoch ohne Überlappungen mit dem benachbarten Astrozyten. Zellproliferation und

Überschreitung des individuellen Zellterritoriums sind Kriterien einer ausgeprägten Astrogliose, wie sie bei schweren ZNS-Verletzungen zu finden sind (Sharma et al., 2015; Sofroniew, 2015). Der protektive Effekt einer Glianarbe ist unumstritten hoch und essentiell (Faulkner et al., 2004; Sofroniew, 2009, 2015), verhindert jedoch – unter anderem durch Produktion neuronaler Wachstumsinhibitoren – eine Axonregeneration (Sharma et al., 2015; Silver und Miller, 2004). Festzuhalten bleibt, dass die stress-suszeptiblen Tiere eine Astrogliose zeigten, welche durch das Kriterium der vorhandenen Zellproliferation als schwerer zu klassifizieren ist. Da nur eine leichte bis moderate Astrogliose die Möglichkeit zur vollständigen Remission zeigt (Sofroniew, 2015), lässt sich hier ein anhaltender Effekt im Sinne einer Narbenbildung postulieren.

4.4 Schlussfolgerung

Es konnte gezeigt werden, dass in den stress-suszeptiblen Tieren noch fünf Wochen nach Stressexposition histologische Kriterien für eine Neuroinflammation auf Ebene der Mikroglia und Astrozyten in der Kortexregion, welche auch zur Analyse der Neuroplastizität ausgewertet wurde (Layer I-III des primär-motorischen Kortex), vorlagen. Es kann jedoch keine Aussage darüber gemacht werden, inwieweit die stress-resilienten Tiere ähnliche Reaktionen im Rahmen einer Mikrogliaaktivierung und/oder einer Astrozytose zu einem früheren Zeitpunkt gezeigt haben. Da beide Tiergruppen zunächst mit einer deutlichen Spineabnahme post-stress reagierten wäre es denkbar, dass auch die stress-resilienten Tiere initial eine Neuroinflammation zeigten, welche jedoch deutlich geringer ausgeprägt war und z. B. auf Astrozytenebene mit einer milden bis moderaten Aktivierungsreaktion einherging. Der dadurch deutlich geringere inhibitorische Einfluss auf die neuronale Regeneration passt zu der deutlich schnelleren Erholung der Spinedichte und zu der nicht mehr nachweisbaren Neuroinflammation fünf Wochen später. Eine passagere Entzündungsreaktion in den stress-resilienten Tieren könnte die Spineinstabilität mit gestörter Synaptogenese und in deren Folge Unmöglichkeit zum feinmotorischen Lernen erklären. Hierzu passt auch das Zeitfenster der Vollausbildung einer akuten inflammatorischen Reaktion von zwei bis zehn Tage nach Schädigung des ZNS (DiSabato et al., 2016). Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass Mikrogliazellen, die in ihrer Funktion der Beseitigung von neuronalen Abfallstoffen und Zellresten eingeschränkt sind, zu Störungen der synaptischen Konnektivität und

generellen Funktionalität führen. Als Grund wird unter anderem ein Anstieg immaturer excitatorischer Synapsen (Paolicelli et al., 2011) diskutiert. Dies wäre eine Erklärung für die fehlenden motorischen Lerneinschränkungen im Rotarod-Test. Mit Testung an Tag vier und fünf nach dem CSDS könnte man nur Einschränkungen einer beginnenden inflammatorischen Reaktion detektieren, welche hiernach im resilienten Phänotyp noch nicht durch Defizite im grobmotorischen Lernen nachweisbar wären. Trotzdem überrascht die überdurchschnittliche motorische Lern- und Leistungsfähigkeit mit einem besseren Lernerfolg als die Kontrollgruppe.

4.5 Einschränkungen der Interpretierbarkeit

Wie bereits in den Methoden aufgeführt, verfügt der Rotarod-Test über eine niedrige Spezifität mit mannigfaltigen Gründen für eine schlechte Performance wie Muskelschwäche, hypo- oder hyperkinetischen Bewegungsstörungen, epileptischen Anfällen, fehlender Motivation oder einem hohen Angstlevel (Jinnah und Hess, 2015). Da kein Screening der Kontrolltiere auf diese Einschränkungen erfolgte, ist eine Verzerrung der Ergebnisse möglich. Andererseits kann eine Schädigung in anderen an der Bewegungskoordination beteiligten Zentren wie z. B. dem Kleinhirn das besonders schlechte Abschneiden der stress-suszeptiblen Gruppe mitbedingen. Ezra-Nevo et al. (2018) konnten zeigen, dass CSDS eine niedrigere Expression von Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) im Kleinhirn bedingen kann, was zu einer deutlich schlechteren motorischen Leistung im Rotarod führte. Inwieweit es sich bei den beschriebenen motorischen Störungen um passagere Funktionseinschränkungen handelt, welche durch eine spätere synaptische Reifung, z. B. durch Abklingen neuroinflammatorischer Störfaktoren, sich zurückbilden, kann nicht beurteilt werden. Hierzu sind weitere motorische Lernaufgaben im Verlauf nötig. Auch ist eine histologische Analyse zu einem früheren Zeitpunkt z. B. kurz nach der feinmotorischen Testung im Reaching-Versuch, idealerweise mit biochemischer Analyse von typischen Inflammationsmarkern, notwendig, um die These einer durch sozialen Stress ausgelösten passageren Entzündungsreaktion der stress-resilienten Tieren zu belegen. Im Umkehrschluss kann durch die deutlich stärkere Mikroglia- und Astrozytenreaktion und die so induzierten Inhibierungsmechanismen eine Behinderung bzw. Verzögerung der neuronalen Regenerationsmechanismen postuliert werden, was sich in der deutlich verlängerten

Erholungszeit der Spinedichte in den stress-suszeptiblen Tieren zeigte. Offen bleibt die Frage, was letztlich zu der stärkeren Mikroglia- und Gliosereaktion geführt hat.

Denkbar wäre, dass der chronisch soziale Stress und die damit einhergehenden Veränderungen der neuronalen Plastizität aufgrund einer Vulnerabilität zu einer stärkeren lokalen Entzündungsreaktion mit ausgeprägter Neuroinflammation führen. Lehmann et al. (2018) konnten zeigen, dass bei Mäusen, welche nach dem CSDS-Test mit einem Stressphänotyp reagierten, die Mikroglia mehr neuroinflammatorische Botenstoffe und reaktive Sauerstoffspezies produzierten sowie eine höhere Aktivität in der Phagozytose zeigten. Auch konnte eine höhere Permeabilität der Blut-Hirnschranken nachgewiesen werden. Aufgrund zusätzlicher Genanalysen, die eine Hochregulation von Transkriptionsfaktoren für Zytokine zeigten, die sonst z. B. bei Ischämien des ZNS oder Hirnverletzungen zu erwarten wären, wurde eine anhaltende chronische proinflammatorischen Reaktion angenommen, die sich von der gängigen mikroglialen Zytokinantwort (IL-1 β , TNF α , IFN γ , CSF1, IL-6) unterscheidet. Lehmann et al. (2018) diskutierten hier eine alternative neuroinflammatorische Aktivierung aufgrund einer mikroglial bestehenden Stressvulnerabilität (Lehmann et al., 2018). Eine weitere mögliche und viel diskutierte Erklärung könnte auch ein zusätzliches gesteigertes reaktives Verhalten auf Ebene der Astrozyten sein. In der Vergangenheit wurden Astrozytenpathologien in Zusammenhang mit diversen neurologischen Krankheitsbildern diskutiert. Als maßgeblich ursächlich für schwere neuronalen Dysfunktionen konnten z. B. astrozytäre Genmutationen für die Amyotrophe Lateralsklerose (Lobsiger und Cleveland, 2007) oder für die Alexanderkrankheit gezeigt werden (Messing et al., 2012). Jedoch sind auch jenseits von spezifischen Erkrankungen endogene Astrozytenpathologien als Pathomechanismus für neuronale Dysfunktionen, wie eine verzögerte Regeneration oder erhöhte epileptische Anfallsbereitschaft, mehr in den wissenschaftlichen Fokus gerückt (Verkhratsky et al., 2012). Ob eine veränderte Astrozytenfunktion ursächlich z. B. durch Mutation und dem daraus resultierendem abnormalem astroglialem Verhalten zu sekundären neuronalen Dysfunktionen und Degeneration führt oder reaktiv durch gesteigerte Ausschüttung von mikroglialen Chemokinen und Zytokinen die Stresssuszeptibilität beeinflusst, bleibt offen.

Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass es im Motorkortex unter einem Stressmodell zu neuroinflammatorischen Prozessen kommt, die einhergehen mit

tiefgreifenden neuronalen Netzwerkstörungen, nicht nur in der stress-suszeptiblen Kohorte, sondern auch in der vermeintlich stress-resilienten Gruppe.

4.6 Ausblick

Die hier diskutierten Ergebnisse werfen weitere Frage auf: Sind die Schäden durch chronischen sozialen Stress auch auf uns Menschen viel verheerender als bisher angenommen? Behalten wir, nicht nur im übertragenen Sinn, sondern tatsächlich Narben mit bleibenden Veränderungen in unserem Verhalten und Einschränkungen unserer motorischen Lernfähigkeit zurück? Und hat chronischer sozialer Stress auch bei vermeintlicher Resilienz doch viel tiefgreifendere Auswirkungen im Sinne einer anhaltenden Störung der synaptischen Plastizität? Diese Arbeit liefert erstmals die Grundlage, um stressassoziierte Störungen von Struktur und Funktion des Motorkortex tiefergehend nachzuweisen und zu verstehen. Zukünftige Studien sollten sich daher zum einen mit den bis jetzt unterschätzten Langzeiteffekten beschäftigen. Zum anderen unterstreicht diese Arbeit aber zusätzlich die Bedeutung von Präventionsmaßnahmen zur Stressreduktion, um das Risiko von stressassoziierten Erkrankungen und ihren schädlichen Effekten auf unser psychisches und physisches Wohlbefinden zu senken.

5. Zusammenfassung

Chronisch sozialer Stress gilt als eine der weltweit führenden Gesundheitsgefahren des 21. Jahrhunderts. Zu den Kernsymptomen assoziierter Folgeerkrankungen wie Depressionen zählen, neben kognitiven und affektiven Veränderungen, auch Störungen der Motorik mit den Kernsymptomen psychomotorische Verlangsamung und Antriebsarmut. Ziel dieser Arbeit war erstmalig im Motorkortex stressassoziierte Veränderungen der Neuroplastizität und Inflammation im Mausmodell nachzuweisen, diese mit Lern- und Verhaltensdaten der Tiere zu korrelieren und dysfunktionsspezifische Mechanismen zu identifizieren, um Hinweise auf neurobiologische Resilienzfaktoren zu erhalten. Die Klassifizierung als stress-resilient bzw. stress-suszeptibel erfolgte durch spezifische Verhaltensversuche. Vor und nach Stressexposition sowie während der grob- und feinmotorischen Lernaufgaben erfolgte zu acht Zeitpunkten über insgesamt 35 Tage in Th1-GFP-Mäusen mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie die Analyse dendritischer Spines des primären Motorkortex (Layer II-III). Es folgte mittels Immunhistochemie, und Fluoreszenzmikroskopie eine Zellzählung und Aktivitätsklassifikation der GFAP-markierten Astrozyten in den tieferen (Layer V) und oberflächlicheren Hirnschichten (Layer I-III). Die Iba-1-markierte Mikroglia wurde in ihrer Ausdehnung, umspannter Kortexfläche, Morphologie und Kollokalisierung mit GFP-markierten Dendriten untersucht. Die als stress-suszeptibel klassifizierten Tiere zeigten, entsprechend ihres Phänotyps, anhaltenden Verhaltensauffälligkeiten mit einem erniedrigtem Score im Nestbau und reduzierter Interaktionszeit noch drei Wochen nach Stressexposition. Unabhängig des Stressphänotyps zeigten alle Tiere in der Spineanalyse einen stressinduzierten Spineverlust, im Vergleich zur Kontrollgruppe, und eine Instabilität neugebildeter Spines, was in einem feinmotorischen Lernversagen beider Tiergruppen resultierte. Für die stress-resiliente Kohorte war eine deutlich gesteigerte Fähigkeit zur Spineneubildung mit Erholung der Spinedichte auf Kontrollniveau bereits nach 11 Tagen nachweisbar. In der Immunhistochemie zeigten die stress-suszeptiblen Tiere in den oberen Zellschichten mehr GFAP-positive Zellen mit zusätzlich höherem Aktivierungsscore. Auch die morphologischen mikroglialen Änderungen waren, neben einer höheren dendritischen Kollokalisierung, nur in den stress-suszeptiblen Tieren nachweisbar. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass psychomotorische Symptome stressassoziiierter Erkrankungen mit stressphänotypisch unabhängigen Störungen der Neuroplastizität im Motorkortex und

motorischen Lerndefiziten korrelieren. Regenerationsfähigkeit und fehlende Neuroinflammation waren Resilienzmerkmale. Offen bleibt, ob die nachgewiesene Netzwerkstörung nur ein passagerer Effekt ist, oder ob chronischer sozialer Stress auch bei scheinbarer Resilienz eine anhaltende neuronale Schädigung verursacht.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Versuchsablauf mit Übersicht der Abfolge von 2PM-Einheiten und Interventionen, sowie Verhaltensversuchen	S. 31
Abb. 2: Exemplarische Darstellung der Spineveränderung zwischen drei 2PM- Einheiten in den drei Kohorten	S. 39
Abb. 3: Entwicklung der Spinedichte in den drei Kohorten als Funktion der Zeit während und nach Stress	S. 40
Abb. 4: Entwicklung der Spinedichte in den drei Kohorten als Funktion der Zeit während und nach Stress; Langzeitverlauf	S. 42
Abb. 5: Spineverlust unter Stress für die drei Tiergruppen	S. 43
Abb. 6: Bildung neuer Spines in den drei experimentellen Gruppen unter Stress	S. 44
Abb. 7: Verhältnis Neubildung zu Verlust der Spines in den drei Kohorten als Funktion der Zeit poststress	S. 45
Abb. 8: Verhältnis Neubildung zu Verlust der Spines in den drei Kohorten als Funktion der Zeit poststress; Langzeitverlauf	S. 46
Abb. 9: Stabilität ursprünglicher Spines als Funktion der Zeit nach Stress in den drei Tiergruppen	S. 48
Abb. 10: Überleben der neugebildeten Spines nach der ersten motorischen Lerneinheit Rotarod in den drei Tierkohorten	S. 49
Abb. 11: Überleben der neugebildeten Spines nach der zweiten motorischen Lerneinheit Reaching in den drei Tierkohorten	S. 50
Abb. 12: Insgesamt vorhandene mikrogliale Fläche in μm^2 pro Tier in den einzelnen Kohorten	S. 52
Abb. 13: Insgesamt umspannte mikrogliale Kortexfläche in μm^2 pro Tier in den einzelnen Kohorten	S. 53
Abb. 14: Ramifikationsindex pro Tier in den einzelnen Kohorten	S. 54
Abb. 15: Gesamtlänge der mikroglialen Zellausläufer	S. 55
Abb. 16: Exemplarische Darstellung jeweils einer repräsentativen Iba-1-markierten Mikrogliazelle der drei Versuchsgruppen	S. 55
Abb. 17: Prozentuale Kolo-kalisation Iba-1-positiver Mikroglia mit GFP-markierten Dendriten pro Tier in den drei Kohorten	S. 56

Abb. 18: Beispielhafte Darstellung der Koloalisation von Iba-1 markierter Mikroglia und GFP-markierten Dendriten in den drei Kohorten	S. 57
Abb. 19: Vergleich zweier fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme von GFAP-markierten Astrozyten im primären motorischen Kortex	S. 58
Abb. 20: Anzahl GFAP-markierter Astrozyten pro 0.2 mm ² pro Tier in den drei Kohorten für die Kortexschichten I-III	S. 59
Abb. 21: Anzahl GFAP-markierter Astrozyten pro 0.2 mm ² pro Tier in den drei Kohorten für die Kortexschichten IV-V	S. 59
Abb. 22: Morphologische Einteilung der Astrozyten in die vier Aktivitätsscores	S. 60
Abb. 23: Morphologische Einteilung der Astrozyten in die Aktivitätsscores 0-3 in den drei Kohorten für die Kortexschichten I-III	S. 61
Abb. 24: Morphologische Einteilung der Astrozyten in die Aktivitätsscores 0-3 in den drei Kohorten für die Kortexschichten IV-V	S. 62

7. Literaturverzeichnis

- Atwoli L, Stein DJ, Koenen KC, McLaughlin KA. Epidemiology of posttraumatic stress disorder: Prevalence, correlates and consequences. *Curr Opin Psychiatry* 2015; 28: 307-311
- Bailey CH, Kandel ER, Harris KM. Structural components of synaptic plasticity and memory consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; 7: 1-29
- Bains JS, Oliek SHR. Glia: they make your memories stick! *Trends Neurosci* 2007; 30: 417-424
- Banasr M, Duman RS. Glial Loss in the Prefrontal Cortex Is Sufficient to Induce Depressive-like Behaviors. *Biol Psychiatry* 2008; 64: 863-870
- Battista D, Ferrari CC, Gage FH, Pitossi FJ. Neurogenic niche modulation by activated microglia: Transforming growth factor β increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 2006; 23: 83-93
- Bennabi D, Vandell P, Papaxanthis C, Pozzo T, Haffen E. Psychomotor retardation in depression: A systematic review of diagnostic, pathophysiologic, and therapeutic implications. *Biomed Res Int* 2013;
- Berger I, Werdermann M, Bornstein SR, Steenblock C. The adrenal gland in stress - Adaptation on a cellular level. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2019; 190: 198-206
- Bernard R, Kerman IA, Thompson RC, Jones EG, Bunney WE, Barchas JD, et al. Altered expression of glutamate signaling, growth factor, and glia genes in the locus coeruleus of patients with major depression. *Mol Psychiatry* 2011; 16: 634-646
- Bilkei-Gorzo A, Racz I, Valverde O, Otto M, Michel K, Sarstre M, et al. Early age-related cognitive impairment in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 15670-15715
- Birbaumer N, Schmidt RF. Bewegung und Haltung. in: Birbaumer N, Schmidt RF, Hrsg. *Biologische Psychologie*. Berlin - Heidelberg: Springer, 2010: 255-295
- Bolmont B, Gangloff P, Vouriot A, Perrin PP. Mood states and anxiety influence abilities to maintain balance control in healthy human subjects. *Neurosci Lett* 2002; 329: 96-100
- Bourne JN, Harris KM. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci* 2008; 31: 47-67
- Brown GW, Prudo R. Psychiatric disorder in a rural and an urban population: 1. Aetiology of depression. *Psychol Med* 1981; 11: 581-599

- Bushong EA, Martone ME, Ellisman MH. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int J Dev Neurosci* 2004; 22: 73-86
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 2002; 22: 183-192
- Butler MP, O'Connor JJ, Moynagh PN. Dissection of tumor-necrosis factor- α inhibition of long-term potentiation (LTP) reveals a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism which maps to early - But not late - Phase LTP. *Neuroscience* 2004; 124: 319-326
- Buwalda B, Kole MHP, Veenema AH, Huininga M, De Boer SF, Korte SM, et al. Long-term effects of social stress on brain and behavior: A focus on hippocampal functioning. *Neurosci Biobehav Rev* 2005; 29: 83-97
- Cao X, Li LP, Wang Q, Wu Q, Hu HH, Zhang M, et al. Astrocyte-derived ATP modulates depressive-like behaviors. *Nat Med* 2013; 19: 773-777
- Cardona AE, Piro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, et al. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci* 2006; 9: 917-924
- Di Castro MA, Chuquet J, Liaudet N, Bhaukaurally K, Santello M, Bouvier D, et al. Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nat Neurosci* 2011; 14: 1276-1284
- Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sandersont MJ. Intercellular signaling in glial cells: Calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* 1991; 6: 983-992
- Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol* 2009; 5: 374-381
- Cobb JA, Simpson J, Mahajan GJ, Overholser JC, Jurjus GJ, Dieter L, et al. Hippocampal volume and total cell numbers in major depressive disorder. *J Psychiatr Res* 2013; 47: 299-306
- Costandi M. Neuroplastizität. in: Costandi M, Hrsg. 50 Schlüsselideen Hirnforschung. Berlin - Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015: 132-135
- Costello DA, Lyons A, Denieffe S, Browne TC, Cox FF, Lynch MA. Long term potentiation is impaired in membrane glycoprotein CD200-deficient mice: A role for toll-like receptor activation. *J Biol Chem* 2011; 286: 34722-34732

- Cotter D, Mackay D, Landau S, Kerwin R, Everall I. Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2001; 58: 545–553
- Dalmau I, Finsen B, Zimmer J, González B, Castellano B. Development of microglia in the postnatal rat hippocampus. *Hippocampus* 1998; 8: 458-474
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 2005; 8: 752-758
- Deacon RMJ. Assessing nest building in mice. *Nat Protoc* 2006; 1: 1117-1119
- Dimsdale JE, Jolla L. Psychological Stress and Cardiovascular Disease. 2008; 51: 1237-1246
- DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem* 2016; 139: 136-153
- Downer EJ, Cowley TR, Lyons A, Mills KHG, Berezin V, Bock E, et al. A novel anti-inflammatory role of NCAM-derived mimetic peptide, FGL. *Neurobiol Aging* 2010; 31: 118-128
- Duman CH, Duman RS. Spine synapse remodeling in the pathophysiology and treatment of depression. *Neurosci Lett* 2014; 601: 20-29
- Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 13632-13637
- Emsley JG, Macklis JD. Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biol* 2006; 2: 175-186
- Ezra-Nevo G, Volk N, Ramot A, Kuehne C, Tsoory M, Deussing J, et al. Inferior olive CRF plays a role in motor performance under challenging conditions. *Transl Psychiatry* 2018; 8
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV. Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury. *J Neurosci* 2004; 24: 2143-2155
- Fénelon K, Xu B, Lai CS, Mukai J, Markx S, Stark KL, et al. The pattern of cortical dysfunction in a mouse model of a schizophrenia-related microdeletion. *J Neurosci* 2013; 33: 14825-14839
- Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, et al. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron*

2000; 28: 41-51

Fink G. Stress: Concepts, definition and history. in: The Curated Reference Collection in Neuroscience and Biobehavioral Psychology. Elsevier Science Ltd.; 2016: 549–555

Fiske BK, Brunjes PC. Microglial activation in the developing rat olfactory bulb. *Neuroscience* 2000; 96: 807-815

Fortin DA, Srivastava T, Soderling TR. Structural modulation of dendritic spines during synaptic plasticity. *Neuroscientist* 2012; 18: 326-341

Franklin KB und Paxinos G. Parts of the Mouse Brain. in: Franklin KB und Paxinos G. Hrsg. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Compact 5th Edition. London: Academic Press, 2019: 23-25

Gellner AK, Reis J, Fritsch B. Glia: A neglected player in non-invasive direct current brain stimulation. *Front Cell Neurosci* 2016; 10

Gellner AK, Voelter J, Schmidt U, Beins EC, Stein V, Philippsen A, et al. Molecular and neurocircuitry mechanisms of social avoidance. *Cell Mol Life Sci* 2021; 78: 1163-11689

Gellner AK, Sitter A, Rackiewicz M et al. Stress shapes disruption of motor cortical neuroplasticity. *Transl Psychiatry*, 2022; 12(1): 91

Geraedts P. Motorisches Lernen. in: Geraedts P, Hrsg. *Motorische Entwicklung und Steuerung*. Berlin - Heidelberg: Springer, 2020: 111-134

Golden SA, Covington HE, Berton O, Russo SJ. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat Protoc* 2011; 6: 1183-1191

Götz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 777-788

Hammen C. Stress and depression. *Annu Rev Clin Psychol* 2005; 1: 293-319

Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 2007; 10: 1387-1394

Harris KM, Kater SB. Dendritic spines: Cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci* 1994; 17: 341-371

Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, et al. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 10896-10901

- Hebb D. The Organization of Behavior: a neuropsychological approach. in: Hebb D, Hrsg. The first stage of Perception: Growth of the Assembly. New York: Wiley and Sons, 1949: S.62
- Hellwig S, Brioschi S, Dieni S, Frings L, Masuch A, Blank T, et al. Altered microglia morphology and higher resilience to stress-induced depression-like behavior in CX3CR1 deficient mice. *Brain Behav Immun* 2016; 55: 126-137
- Hinwood M, Morandini J, Day TA, Walker FR. Evidence that Microglia Mediate the Neurobiological Effects of Chronic Psychological Stress on the Medial Prefrontal Cortex. *Cereb Cortex* 2012; 22: 1442-1454
- Hinwood M, Tynan RJ, Charnley JL, Beynon SB, Day TA, Walker FR. Chronic stress induced remodeling of the prefrontal cortex: Structural re-organization of microglia and the inhibitory effect of minocycline. *Cereb Cortex* 2013; 23: 1784-1797
- Holtmaat AJGD, Trachtenberg JT, Wilbrecht L, Shepherd GM, Zhang X, Knott GW, et al. Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron* 2005; 45: 279-291
- Iida T, Tanaka S, Okabe S. Spatial impact of microglial distribution on dynamics of dendritic spines. *Eur J Neurosci* 2019; 49: 1400-1417
- Jinnah HA, Hess EJ. Assessment of Movement Disorders in Rodents. in: LeDoux MS, ed. *Movement Disorders: Genetics and Models: Second Edition*. Elsevier Inc., 2014: 59–76
- Jung CKE, Herms J. Structural dynamics of dendritic spines are influenced by an environmental enrichment: An in vivo imaging study. *Cereb Cortex* 2014; 24: 377-384
- Kalisch R, Baker DG, Basten U, Boks MP, Bonanno GA, Brummelman E, et al. The resilience framework as a strategy to combat stress-related disorders. *Nat Hum Behav* 2017; 1: 784-790
- Kang W, Hébert JM. Signaling pathways in reactive astrocytes, a genetic perspective. *Mol Neurobiol* 2011; 43: 147-154
- Kessler RC. The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol* 1997; 48: 191-214
- Kettenmann H, Verkhratsky A. Neuroglia, der lebende Nerven Kitt. *Fortschritte der Neurol Psychiatr* 2011; 79: 588-597
- Kopp BL, Wick D, Herman JP. Differential effects of homotypic vs. heterotypic chronic stress regimens on microglial activation in the prefrontal cortex. *Physiol Behav* 2013; 122:

246-252

Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, et al. Molecular Adaptations Underlying Susceptibility and Resistance to Social Defeat in Brain Reward Regions. *Cell* 2007; 131: 391-404

Kunzler AM, Gilan DA, Kalisch R, Tüscher O, Lieb K. Current concepts of resilience research. *Nervenarzt* 2018; 89: 747-753

Lehmann ML, Weigel TK, Cooper HA, Elkahloun AG, Kigar SL, Herkenham M. Decoding microglia responses to psychosocial stress reveals blood-brain barrier breakdown that may drive stress susceptibility. *Sci Rep* 2018; 8

Lima A, Sardinha VM, Oliveira AF, Reis M, Mota C, Silva MA, et al. Astrocyte pathology in the prefrontal cortex impairs the cognitive function of rats. *Mol Psychiatry* 2014; 19: 834-841

Lobsiger CS, Cleveland DW. Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. *Nat Neurosci* 2007; 10: 1355-1360

Lyons A, Downer EJ, Crotty S, Nolan YM, Mills KHG, Lynch MA. CD200 ligand-receptor interaction modulates microglial activation in vivo and in vitro: A role for IL-4. *J Neurosci* 2007; 27: 8309-8313

Magalhães R, Ganz E, Rodrigues M, Barrière DA, Mériaux S, Jay TM, et al. Biomarkers of resilience and susceptibility in rodent models of stress. in: Chen A, ed. *Stress Resilience: Molecular and Behavioral Aspects*. Academic Press 2019: 311-321

Margraf J, 2016: Anhedonie. in: Psychrembel online 2016. <https://www.psychrembel.de/Anhedonie/K0QEK> (Zugriffsdatum 26.02.2022)

Margraf J, Bengel J, 2021: Psychomotorik [Bewegungs- und Ausdrucksverhalten]. in: Psychrembel online 2021. <https://www.psychrembel.de/Psychomotorik%20%5BBewegungs%20und%20Ausdrucksverhalten%5D/K0J1U> (Zugriffsdatum 26.02.2022)

Marsden WN. Synaptic plasticity in depression: Molecular, cellular and functional correlates. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 2013; 43: 168-184

McEwen BS, Stellar E. Stress and the Individual: Mechanisms Leading to Disease. *Arch Intern Med* 1993; 153: 2093-2101

McEwen BS, Wingfield JC. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav* 2003; 43: 2-15

- Mergl R, Pogarell O, Juckel G, Rihl J, Henkel V, Frodl T, et al. Hand-Motor Dysfunction in Depression: Characteristics and Pharmacological Effects. *Clin EEG Neurosci* 2007; 38: 82-88
- Messing A, Brenner M, Feany MB, Nedergaard M, Goldman JE. Alexander disease. *J Neurosci* 2012; 32: 5017-5023
- Metz GA, Jadavji NM, Smith LK. Modulation of motor function by stress: A novel concept of the effects of stress and corticosterone on behavior. *Eur J Neurosci* 2005; 22: 1190-1200
- Mildner A, Schlevogt B, Kierdorf K, Böttcher C, Erny D, Kummer MP, et al. Distinct and non-redundant roles of microglia and myeloid subsets in mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2011; 31: 11159-11171
- Miyamoto A, Wake H, Ishikawa AW, Eto K, Shibata K, Murakoshi H, et al. Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nat Commun* 2016; 7
- Miyamoto A, Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J. Microglia and synapse interactions: Fine tuning neural circuits and candidate molecules. *Front Cell Neurosci* 2013; 7
- Nelson TE, Hao C, Manos J, Ransohoff RM, Gruol DL. Altered hippocampal synaptic transmission in transgenic mice with astrocyte-targeted enhanced CCL2 expression. *Brain Behav Immun* 2011; 25: 106-119
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Neuroscience: Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 2005; 308: 1314-1318
- Öngür D, Drevets WC, Price JL. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13290-13295
- Otabi H, Goto T, Okayama T, Kohari D, Toyoda A. Subchronic and mild social defeat stress alter mouse nest building behavior. *Behav Processes* 2016; 122: 21-25
- Otabi H, Goto T, Okayama T, Kohari D, Toyoda A. The acute social defeat stress and nest-building test paradigm: A potential new method to screen drugs for depressive-like symptoms. *Behav Processes* 2017; 135: 71-75
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 2011; 333: 1456-1458
- Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, Lafaille JJ, et al. Microglia promote

- learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 2013; 155: 1596-1609
- Parpura V, Verkhratsky A. Neuroglia at the crossroads of homeostasis, metabolism and signalling: Evolution of the concept. *ASN Neuro* 2012; 4: 201-205
- Pascual O, Ben Achour S, Rostaing P, Triller A, Bessis A. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 197-205
- Penzes P, Cahill ME, Jones KA, Vanleeuwen JE, Woolfrey KM. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 2011; 14: 285-293
- Pérez-Tejada J, Arregi A, Gómez-Lázaro E, Vegas O, Azpiroz A, Garmendia L. Coping with chronic social stress in mice: Hypothalamic-pituitary-adrenal/ sympathetic-adrenal-medullary axis activity, behavioral changes and effects of antalarmin treatment: Implications for the study of stress-related psychopathologies. *Neuroendocrinology* 2013; 98: 73-88
- Perry VH, Hume DA, Gordon S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 1985; 15: 313-326
- Phillips AC, Carroll D, Der G. Negative life events and symptoms of depression and anxiety: stress causation and/or stress generation. *Anxiety, Stress Coping* 2015; 28: 357-371
- Plescher M, Seifert G, Hansen JN, Bedner P, Steinhäuser C, Halle A. Plaque-dependent morphological and electrophysiological heterogeneity of microglia in an Alzheimer's disease mouse model. *Glia* 2018; 66: 1464-1480
- Pocock JM, Kettenmann H. Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci* 2007; 30: 527-535
- Pologruto TA, Sabatini BL, Svoboda K. ScanImage: Flexible software for operating laser scanning microscopes. *Biomed Eng Online* 2003; 2
- Post RM. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. *Am J Psychiatry* 1992; 149: 999-1010
- Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci* 2011; 14: 1227-1235
- Qiao H, Li MX, Xu C, Chen HB, An SC, Ma XM. Dendritic Spines in Depression: What We Learned from Animal Models. *Neural Plast* 2016

- Radley JJ, Rocher AB, Miller M, Janssen WGM, Liston C, Hof PR, et al. Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 2006; 16: 313-320
- Rodríguez-Arias M, Montagud-Romero S, Guardia Carrión AM, Ferrer-Pérez C, Pérez-Villalba A, Marco E, López Gallardo M, Viveros MP and Miñarro J. Social stress during adolescence activates long-term microglia inflammation insult in reward processing nuclei. *PloS one* 2018; 13 (10)
- Rusch S. Einführung in die Stresstheorie. in Rusch S, Hrsg. *Stressmanagement*. Berlin - Heidelberg: Springer; 2019: 11-27
- Sabbe B, Hulstijn W, Van Hoof J, Zitman F. Fine motor retardation and depression. *J Psychiatr Res* 1996; 30: 295-306
- Salameh G, Jeffers MS, Wu J, Pitney J, Silasi G. The home-cage automated skilled reaching apparatus (HASRA): Individualized training of group-housed mice in a single pellet reaching task. *eNeuro* 2020; 7: 1-11
- Sapolsky RM. The influence of social hierarchy on primate health. *Science* 2005; 308: 648-652
- Schafer DP, Lehrman EK, Stevens B. The 'quad-partite' synapse: Microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia* 2013; 61: 24-36
- Schafer DP, Stevens B. Synapse elimination during development and disease: Immune molecules take centre stage. *Biochem Soc Trans* 2010; 38: 476-481
- Schmaal L, Hibar DP, Sämann PG, Hall GB, Baune BT, Jahanshad N, et al. Cortical abnormalities in adults and adolescents with major depression based on brain scans from 20 cohorts worldwide in the ENIGMA Major Depressive Disorder Working Group. *Mol Psychiatry* 2017; 22: 900-909
- Selye H. Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J* 1950; 1: 1383-92
- Selye H. Stress and disease. *Science* 1955; 122: 625-631
- Sendtner M, Henn FA. Tiermodelle für neurodegenerative Erkrankungen - Von Tiermodellen zur Analyse spezifischer zellulärer Funktionen zu Tiermodellen zur des Nervensystems. in: Holsboer F, Gründer G, Benkert O, Hrsg. *Handbuch der Psychopharmakologie*. Berlin - Heidelberg. Spinger, 2008: 202
- Sharma K, Zhang G, Li S. Astrogliosis and Axonal Regeneration. in: So KF, Xu XM eds. *Neural Regeneration*. Elsevier Inc., 2015: 181-196

- Sherwood CC, Stimpson CD, Raghanti MA, Wildman DE, Uddin M, Grossman LI, et al. Evolution of increased glia-neuron ratios in the human frontal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 13606-13611
- Shu Y, Xu T. Chronic Social Defeat Stress Modulates Dendritic Spines Structural Plasticity in Adult Mouse Frontal Association Cortex. *Neural Plast* 2017
- Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 146-156
- Smit F, Shields L, Petrea I, 2016: Preventing depression in the WHO European Region. https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0003/325947/New-Preventing-depression.pdf (Zugriffsdatum 26.02.2022)
- Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 2009; 32: 638-647
- Sofroniew MV. Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; 7
- Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OFX, Paula-Barbosa MM. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience* 2000; 97: 253-266
- Statistisches Bundesamt, 2017: Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Kosten. https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2017/09/PD17_347_236.html (Zugriffsdatum 26.02.2022)
- Steel Z, Marnane C, Iranpour C, Chey T, Jackson JW, Patel V, et al. The global prevalence of common mental disorders: A systematic review and meta-analysis 1980-2013. *Int J Epidemiol* 2014; 43: 476-493
- Sterlemann V, Ganea K, Liebl C, Harbich D, Alam S, Holsboer F, et al. Long-term behavioral and neuroendocrine alterations following chronic social stress in mice: Implications for stress-related disorders. *Horm Behav* 2008; 53: 386-394
- Sterling P. Allostasis: A model of predictive regulation. *Physiol Behav* 2012; 106: 5-15
- Stoffels I, von der Stück H, Boy C, Pöppel T, Körber N, Weindorf M, et al. Fluoreszenz-Markierung mittels Indocyanin-Grün bei der Sentinel-Lymphknoten-Exstirpation in der Dermatookologie. *JDDG J der Dtsch Dermatologischen Gesellschaft* 2012; 10: 51-58
- Torres-Platas SG, Nagy C, Wakid M, Turecki G, Mechawar N. Glial fibrillary acidic protein is differentially expressed across cortical and subcortical regions in healthy brains and downregulated in the thalamus and caudate nucleus of depressed suicides. *Mol*

Psychiatry 2016; 21: 509-515

Tremblay MÈ, Lowery RL, Majewska AK. Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. PLoS Biol 2010; 8:

Tynan RJ, Beynon SB, Hinwood M, Johnson SJ, Nilsson M, Woods JJ, et al. Chronic stress-induced disruption of the astrocyte network is driven by structural atrophy and not loss of astrocytes. Acta Neuropathol 2013; 126: 75-91

Tynan RJ, Naicker S, Hinwood M, Nalivaiko E, Buller KM, Pow D V., et al. Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. Brain Behav Immun 2010; 24: 1058-1068

Vasconcelos M, Stein DJ, de Almeida RMM. Social defeat protocol and relevant biomarkers, implication for stress response physiology, drug abuse, mood disorders and individual stress vulnerability: a systematic review of the last decade. Trends Psychiatry Psychother 2015; 37: 51-66

Verkhatsky A, Sofroniew MV, Messing A, deLanerolle NC, Rempe D, Rodríguez JJ, et al. Neurological diseases as primary gliopathies: A reassessment of neurocentrism. ASN Neuro 2012; 4: 131-149

Vollmayr B, Henn FA. Tiermodelle für depressive Störungen - Chronischer Stress. in: Holsboer F, Gründer G, Benkert O, Hrsg. Handbuch der Psychopharmakologie. Berlin - Heidelberg. Springer, 2008: 223-225

Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: The revolution continues. Nat Rev Neurosci 2005; 6: 626-640

Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. J Neurosci 2002; 22: 6810-6018

Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. J Neurosci 2009; 29: 3974-3980

Walker F, Nilsson M, Jones K. Acute and Chronic Stress-Induced Disturbances of Microglial Plasticity, Phenotype and Function. Curr Drug Targets 2013; 14: 1262-1276

WHO, 2017: Depression and other common mental disorders: global health estimates. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Zugriffsdatum 26.02.2022)

- Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)* 1987; 93: 358-364
- Wohleb ES, Hanke ML, Corona AW, Powell ND, Stiner LM, Bailey MT, et al. β -Adrenergic receptor antagonism prevents anxiety-like behavior and microglial reactivity induced by repeated social defeat. *J Neurosci* 2011; 31: 6277-6288
- Xu T, Yu X, Perlik AJ, Tobin WF, Zweig JA, Tennant K, et al. Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature* 2009; 462: 915-919
- Yirmiya R, Rimmerman N, Reshef R. Depression as a Microglial Disease. *Trends Neurosci* 2015; 38: 637-658
- Zhu LJ, Liu MY, Li H, Liu X, Chen C, Han Z, et al. The different roles of glucocorticoids in the hippocampus and hypothalamus in chronic stress-induced HPA axis hyperactivity. *PLoS One* 2014; 9
- Zuo Y, Lin A, Chang P, Gan WB. Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron* 2005; 46: 181-189

8. Danksagung

Mein erster Dank gilt Frau Prof. Dr. Philipsen, deren Offenheit und großzügige Unterstützung mir den Freiraum gab, meinen Interessen für die Grundlagenforschung nachgehen zu können und hier erste eigene wissenschaftliche Erfahrungen machen zu dürfen.

Gleiches gilt für meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Valentin Stein, der mir diese Promotion ermöglichte. Seine enge Begleitung, Hilfestellung und das großzügige Angebot sämtliche ihm verfügbare Mittel vom Konfokalmikroskop bis zur Petrischale jeder Zeit nutzen zu können, haben mir mit dieser Arbeit erste weite und inspirierende Einblicke in die Wissenschaftswelt geschenkt.

Ganz besonders danken möchte ich außerdem Frau Dr. Anne-Kathrin Gellner. Neben ihren kreativen Ideen, ihrem Tatendrang und ihrer ansteckenden wissenschaftlichen Begeisterung war es vor allem ihre Bereitschaft, verbunden mit unendlicher Geduld und enormer Unterstützung, die es mir ermöglichten, Teil ihres Forschungsprojekts zu werden. Ihre freundschaftliche Supervision machen mich ihr sehr verbunden.

Zuletzt gilt mein größter Dank im Rahmen dieser Arbeit meinen Eltern für ihre liebevolle und unbedingte Unterstützung und Förderung meines bisherigen beruflichen Werdegangs.